



**HAL**  
open science

# Immunomodulation par les anticorps monoclonaux thérapeutiques bloquant CTLA-4 : rôle de la flore intestinale et de ses métabolites

Clélia Coutzac

► **To cite this version:**

Clélia Coutzac. Immunomodulation par les anticorps monoclonaux thérapeutiques bloquant CTLA-4 : rôle de la flore intestinale et de ses métabolites. Immunothérapie. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS396 . tel-02003359

**HAL Id: tel-02003359**

**<https://theses.hal.science/tel-02003359>**

Submitted on 1 Feb 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT: 2017SACLS396

UNIVERSITE PARIS SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE : Cancérologie, Biologie, Médecine, Santé

DISCIPLINE : Sciences de la vie et de la santé

ÉTABLISSEMENT : Gustave Roussy Cancer Campus

Laboratoire d'Immunomonitoring en Oncologie, UMS 3655/US 23

## THESE DE DOCTORAT

Présentée et soutenue publiquement le 14 novembre 2017

par

**Clélia COUTZAC**

Immunomodulation par les anticorps monoclonaux  
thérapeutiques bloquant le CTLA-4 : rôle de la flore  
intestinale et de ses métabolites

**Directrice de thèse** : Pr. Nathalie CHAPUT

Gustave Roussy Cancer Campus

### Composition du jury :

Président du jury : Pr. Eric SOLARY

Gustave Roussy Cancer Campus

Rapporteur : Pr. Julien TAIEB

Hôpital Européen Georges Pompidou

Rapporteur : Dr. Michelle ROSENZWAJG

Hôpital la Pitié Salpêtrière

Examineur : Dr. Magali TERME

Hôpital Européen Georges Pompidou

Examineur : Dr. Aurélien MARABELLE

Gustave Roussy Cancer Campus

# SOMMAIRE

## Table des matières

REMERCIEMENTS .....	5
ABREVIATIONS .....	7
FIGURES .....	8
INTRODUCTION .....	9
<b>I. Immunité anti-tumorale.....</b>	<b>9</b>
<b>A. Les dix caractéristiques biologiques du cancer .....</b>	<b>9</b>
<b>B. L'immunosurveillance .....</b>	<b>10</b>
<b>C. Immunogénicité des tumeurs .....</b>	<b>12</b>
1. Les antigènes tumoraux .....	12
2. L'immunomodulation via la tumeur.....	12
3. Le microenvironnement tumoral .....	14
<b>II. Généralités sur l'immunothérapie anti-cancéreuse .....</b>	<b>16</b>
<b>A. Les immunomodulateurs.....</b>	<b>18</b>
<b>B. Les immunothérapies cellulaires.....</b>	<b>18</b>
<b>C. Les vaccins .....</b>	<b>19</b>
<b>D. Les anticorps monoclonaux .....</b>	<b>20</b>
<b>III. Immunothérapies via les anticorps monoclonaux dirigés contre le CTLA-4 .....</b>	<b>24</b>
<b>A. L'activation lymphocytaire .....</b>	<b>24</b>
1. La synapse immunologique.....	24
2. L'axe CD28 et CTLA-4 : régulation de l'activation T .....	26
<b>B. Régulation de l'expression du CTLA-4 à la surface des LT .....</b>	<b>27</b>
<b>C. Fonctions intrinsèques et extrinsèques du CTLA-4. ....</b>	<b>30</b>
1. Fonctions intrinsèques aux cellules T.....	30

a)	CTLA-4 en compétition avec le CD28 pour leurs ligands communs .....	30
b)	Induction de signaux négatifs.....	31
c)	Signalisation intrinsèque indépendante du ligand .....	33
d)	Fonctions sur l'adhésion et la motilité cellulaire.....	33
2.	Les fonctions extrinsèques.....	33
a)	Stimulation des Treg par le CTLA-4.....	34
b)	Activation d'IDO par le CTLA-4 .....	35
c)	Modulation du phénotype des CPA par le CTLA-4.....	36
d)	Production du CTLA-4 soluble .....	36
<b>D.</b>	<b>Blocage du CTLA-4 en oncologie médicale.....</b>	<b>37</b>
1.	Efficacité de l'anti-CTLA-4 : résultats des essais cliniques .....	37
2.	Biomarqueurs de réponses à l'anti-CTLA-4.....	41
3.	Toxicités reliées à l'anti-CTLA-4.....	43
4.	Cas particulier de la colite induite à l'anti-CTLA-4 .....	44
<b>IV.</b>	<b>Le microbiote intestinal et ses métabolites. ....</b>	<b>47</b>
<b>A.</b>	<b>La composition du microbiote intestinal .....</b>	<b>47</b>
1.	La distribution des micro-organismes dans le tube digestif .....	47
2.	Les phyla majoritaires du microbiote intestinal.....	49
a)	Le phylum des <i>Firmicutes</i> .....	49
b)	Le phylum <i>Bacteroidetes</i> .....	50
c)	Le phylum <i>Acinetobacteria</i> .....	50
<b>B.</b>	<b>Développement et facteurs influençant le microbiote intestinal chez l'Homme .....</b>	<b>50</b>
1.	Le microbiote intestinal au cours de la vie.....	50
2.	Les facteurs influençant la composition du microbiote intestinal.....	51
a)	Les facteurs génétiques .....	51
b)	Les facteurs environnementaux.....	52
<b>C.</b>	<b>Les fonctions du microbiote intestinal.....</b>	<b>54</b>

1. Fonctions trophiques sur l'épithélium digestif. ....	54
2. Fonctions protectrices : effet barrière .....	55
3. Les fonctions métaboliques .....	56
4. Fonctions sur l'immunité et l'inflammation.....	59
a) Réponses immunitaires à la colonisation du tractus digestif .....	59
b) Rôle du microbiote intestinal sur l'immunité innée.....	62
c) Le rôle du microbiote intestinal sur l'immunité adaptative .....	64
d) Rôle des AGCC sur l'immunité.....	68
<b>D. Microbiote intestinal et maladie de Crohn : cause ou conséquence ?.....</b>	<b>70</b>
<b>E. Microbiote et réponse clinique aux traitements anti-cancéreux.....</b>	<b>71</b>
<b>OBJECTIFS DE THESE .....</b>	<b>75</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>75</b>
<b>Article 1. ....</b>	<b>78</b>
<b>Article 2. ....</b>	<b>92</b>
<b>Article 3. ....</b>	<b>123</b>
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>171</b>
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>189</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>192</b>

## REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Eric Solary,  
Merci de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici la marque de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Julien Taieb,  
Vous me faites d'honneur d'avoir accepté d'être le rapporteur de ce travail, j'en suis profondément heureuse et touchée. Vous connaissez mon admiration pour votre expertise et votre enthousiasme, et je mesure la chance que j'ai de pouvoir travailler et apprendre à vos côtés. Trouvez ici, le témoignage de toute ma reconnaissance et de mon admiration.

A Madame le Docteur Michelle Rosenwagj,  
Vous me faites d'honneur d'avoir accepté d'être le rapporteur de ce travail. Votre expertise en immunologie enrichira incontestablement cette étude. Veuillez trouver ici la marque de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Docteur Magali Terme et à Monsieur le Docteur Aurélien Marabelle,  
Merci de m'honorer de votre présence et de vos compétences au sein de ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A Nathalie Chaput,  
Je te remercie de m'avoir accueilli dans ton laboratoire, de m'avoir confié ce travail ambitieux et surtout de me faire confiance quotidiennement. Merci pour ton soutien sans faille, tes encouragements, ta générosité. Tu connais mon admiration pour ton ouverture d'esprit, ton expertise et ta pédagogie. Tu es un véritable exemple pour moi, et je suis très fière de t'avoir comme directrice. Trouve ici, le témoignage de toute ma reconnaissance et de mon admiration. Merci pour tout.

Je voudrais remercier les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail : Franck Carbonnel, Caroline Robert, Christina Mateus, Angelo Paci, Atmane Seck, Vahé Asvatourian, Emilie Lanoy, Jean-Yves Scoazec, Julien Adam, Patricia Lepage.

A mes collègues, mes amis du LIO,  
Lydie, tu as été un réel soutien tout au long de cette thèse. Tu m'as beaucoup appris, beaucoup encouragé et je te remercie profondément pour cette aide précieuse et rassurante.  
Jean, merci pour ton aide précieuse au cours de mes manip. Tu as été une bouffée d'oxygène quand tu es arrivé dans le laboratoire, et j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi.  
Lisa, Jo, merci de mettre l'ambiance dans le labo ! Lisa, merci d'avoir toujours accueilli mes demandes avec le sourire et de m'avoir aidé tout au long de cette thèse.  
Kari, merci pour ta générosité et ta disponibilité. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite.  
Mélanie, Stéphane, Aurore, Emilie, Claudia, Louise, Nass, Melinda, Boris...et ceux que j'oublierai ; merci d'avoir été là pendant mon aventure de thèse !

A mes collègues médecins,  
Merci à Simon, Anne-Laure, Bruno, Céline, Aziz, Jean-Nicolas, Géraldine, Zineb et tous les internes. Merci pour votre accueil dans le service, votre disponibilité et votre soutien. J'ai énormément de plaisir à travailler avec vous tous.

A ma famille,

Merci à ma belle-famille pour votre soutien et vos encouragements. Promis, je me calme après...enfin, un peu...

A ma fraterie, merci pour toute l'attention et le soutien que vous me portez. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble.

A mes parents, merci de toujours croire en moi, de m'apporter tant de soutien dans les projets que j'entreprends, et de m'avoir appris à aller jusqu'au bout de mes limites.

A mon fils, Martin, tu es arrivé dans ma vie pendant ces années de thèse, mais t'apporter amour, sérénité et confiance en toi reste et restera pour toujours le but principal de ma vie.

A Jean, merci pour ton amour, ta patience, tes encouragements, ton optimisme...Je te dédie ce travail, en espérant te rendre aussi fier que je le suis de toi.

## ABREVIATIONS

Ac : anticorps

Ac Mo : Ac monoclonaux

Ag: antigène

AGCC : acides gras à chaînes courtes

AMM: autorisation de mise sur le marché

ARNm : acide ribonucléique messager

BCR: B cell receptor

CPA : cellules présentatrices d'antigènes

CMH : Complexes Majeur  
d'Histocompatibilité

DC : cellules dendritiques

GITR : glucocorticoid-induced tumor  
necrosis factor receptor

ICAM-1 : intercellular Adhesion

Molecule1

ICOS: inducible T-cell COStimulator

IDO : indoleamine 2,3-dioxygenase

IFN $\gamma$ : interféron gamma

IL : interleukine

ILC : innate lymphoid cell

LAK : lymphocytes activated killer

LFA : Lymphocyte function-associated  
antigen

LB : lymphocyte B

LT: lymphocyte T

MICI : maladies inflammatoires  
chroniques de l'intestin

MDSC : myeloid-derived suppressor cells

MLN : mesenteric lymph node

RAG: recombination activating gene

SI : système immunitaire

TCR : T-cell receptor

TGF $\beta$  : transforming growth factor beta

TIL : lymphocytes infiltrant la tumeur

Treg : lymphocyte T régulateur



## FIGURES

Figure 1 Les dix caractéristiques biologiques de la cellule tumorale

Figure 2. Deux modèles d'échappement tumoral selon l'infiltrat immunitaire

Figure 3 : Les 4 domaines en immunothérapie

Figure 4: mécanismes d'action des anticorps monoclonaux en cancérologie

Figure 5: les interactions co-activatrices ou co-inhibitrices régulant les réponses lymphocytaires T.

Figure 6 : synapse immunologique

Figure 7 : Mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression du CTLA-4 à la surface cellulaire.

Figure 8 : Voies de signalisation du CTLA-4 médiée par son domaine intra-cytoplasmique.

Figure 9: Distribution des microorganismes non-pathogènes le long du tractus digestif humain.

Figure 10: Principaux facteurs influençant le développement et la stabilité du microbiote intestinal humain au cours de la vie.

Figure 11: Principales fonctions du microbiote intestinal.

Figure 12: Fermentation des carbohydrates par les bactéries du microbiote intestinal.

Figure 13: Production d'IgA dans la muqueuse intestinale.

Figure 14: Familles des cellules lymphoïdes innées (ILC) non cytotoxiques.

Figure 15: ILC3 et microbiote intestinal.

Figure 16: Induction de Th17 par le microbiote intestinal.

Figure 17: Influence du microbiote intestinal sur les Treg.

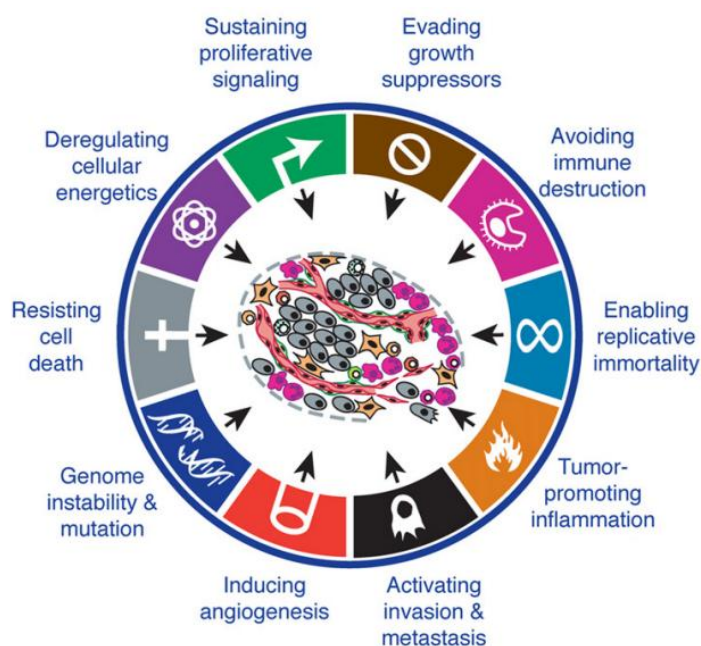
Figure 18 : Butyrate et efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA-4

# INTRODUCTION

## I. Immunité anti-tumorale

### A. Les dix caractéristiques biologiques du cancer

Le cancer est une pathologie propre aux organismes complexes tels que les mammifères. Il a été décrit par Hanahan et Weinberg (1) comme un processus évolutif mettant en jeu dix caractéristiques biologiques distinctes et complémentaires. Les cellules ayant acquis des anomalies génétiques (altérations sur les gènes suppresseurs de tumeur, pro-oncogènes, ou gènes impliqués dans la réplication/différenciation/apoptose cellulaire) développent de nouvelles capacités telles que l'insensibilité aux signaux de cessation de la division cellulaire, la résistance à l'apoptose, la prolifération cellulaire illimitée, la dissémination sous forme de métastases, ou encore l'induction des néo-vaisseaux (2). Une dérégulation du métabolisme cellulaire, une instabilité du génome, une cancérogénèse induite par l'inflammation ainsi qu'un échappement tumoral au système immunitaire ont ensuite complété les propriétés caractérisant les cellules tumorales (1).



**Figure 1. Les dix caractéristiques biologiques de la cellule tumorale d'après Hanahan et Weinberg, Cell (2011)**

## **B. L'immunosurveillance**

L'immunité anti-tumorale est le concept à la base de l'immunothérapie. William Coley fut le premier en 1891, à observer une corrélation entre la régression des sarcomes osseux et la survenue d'une surinfection bactérienne à *Streptococcus pyogenes* en post-opératoire. Au début du XXème siècle, Paul Ehrlich émet l'hypothèse que le système immunitaire jouerait un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération des cellules tumorales. Se basant sur ces travaux, ce n'est que dans les années 1970 que Frank Macfarlane Burnet (3) puis Lewis Thomas (4) proposent la théorie de l' "immunosurveillance anti-tumorale". Les lymphocytes auraient la capacité de reconnaître les cellules tumorales et de les éliminer. Malheureusement, le manque d'outils disponibles pour valider cette hypothèse entraîna un rejet de la part de la communauté scientifique.

Ce n'est que dans les années 90, avec l'apparition des souris immunodéficientes pour le gène RAG (recombination activating gene) que l'immunosurveillance anti-tumorale est validée scientifiquement. En effet, les souris déficientes en lymphocytes B et T matures, présentaient une fréquence accrue de tumeurs spontanées et de tumeurs chimio-induites par comparaison à des souris sauvages (5–7). D'autres travaux ont confirmé ces résultats en montrant que des souris déficientes en cellules ou molécules importantes pour l'immunité innée ou adaptative développent également des tumeurs avec une fréquence accrue (8–10) . Chez l'Homme, la corrélation positive entre l'infiltrat lymphocytaire associé à la tumeur et la survie des patients est en accord avec les données murines (11–14). Les patients immunodéprimés par le virus du SIDA ont un risque plus élevé de développer un lymphome (15). De la même manière, l'incidence accrue des pathologies malignes chez les patients sous immunosuppresseurs post-transplantation d'organes est en faveur d'un rôle actif du système immunitaire système immunitaire (SI) contre le développement des cancers (16,17).

Revisitant le concept d'immunosurveillance, Robert Schreiber formule le concept d'immunoédition en 2002 (18) définit par trois phases: l'élimination ou immunosurveillance, l'équilibre et l'échappement tumoral. Dès l'apparition d'une cellule transformée par un stress (carcinogènes: UV, inflammation chronique, virus...), celle-ci est immédiatement reconnue et éliminée par le SI. Cette élimination peut être complète et permettre de revenir à un état physiologique, ou d'évoluer vers la phase d'équilibre. Dans cette situation, le SI contrôle la tumeur sans l'éradiquer. On parle aussi de dormance, mais cette phase reste encore peu décrite. Enfin, sous la pression de sélection du SI, la tumeur développe des propriétés immunosuppressives qui inhibent la réponse anti-cancéreuse conduisant à un échappement tumoral (18,19).

Pour Blankenstein et Willimsky, l'échappement tumoral ne serait pas lié à une sélection de clones les moins immunogènes mais à la mise en place d'une tolérance immunitaire. Les modèles murins jusqu'alors étudiés, utilisaient soit des tumeurs transplantables soit des tumeurs d'apparition rapide induites par des carcinogènes chimiques ou physiques. Chez l'Homme, la carcinogénèse est multifactorielle s'installant relativement lentement dans le temps. Pour justifier leur hypothèse, ils utilisent le modèle de tumeur sporadique SV40 qui autorise de rares mutations aléatoires et est connue pour être fortement immunogène. Dans leurs travaux, la tumeur n'échappait pas à la reconnaissance du système immunitaire, cependant les lymphocytes T spécifiques de la tumeur n'étaient pas fonctionnels. La tolérance immunitaire induite par la tumeur entraînait son échappement (20).

Les théories de Schreiber et de Blankenstein et Willimsky sont vraisemblablement complémentaires et dépendent de la variabilité intra- et inter-individuelle de chaque tumeur et de son microenvironnement.

## **C. Immunogénicité des tumeurs**

Trois principaux facteurs influencent les réponses immunologiques innées et adaptatives contre la tumeur: i) les antigènes tumoraux, ii) les molécules immunomodulatrices produites par la tumeur et iii) le microenvironnement tumoral.

### **1. Les antigènes tumoraux**

La biologie moléculaire a permis de faire des avancées spectaculaires dans le domaine de l'immunité anti-tumorale. En 1991, Thierry Boon et son équipe identifient le premier antigène tumoral chez l'Homme (21). Les antigènes tumoraux sont présentés aux lymphocytes T par les Complexes Majeurs d'Histocompatibilité (CMH) ou directement par le BCR (B cell receptor) des lymphocytes B. Des centaines d'antigènes tumoraux reconnus par le SI ont été isolés. Plus récemment la découverte de néoantigènes par séquençage du génome tumoral constitue une avancée majeure dans le domaine de la recherche.

Les antigènes associés aux tumeurs sont classés en 5 groupes:

- Les antigènes spécifiques du groupe *cancer testis* (exemples: MAGE1-10, NY-ESO-1) exprimés par les cellules normales et germinales.
- Les antigènes de différenciation (exemples: MART-1, gp100, PSA) spécifiques à un tissu donné.
- Les antigènes surexprimés par la tumeur (exemples: Her2/Neu, ACE).
- Les antigènes uniques et spécifiques de tumeurs issus de mutation ou de néoantigènes (exemples:  $\beta$ -catenin, CDK-4, Ras).
- Les antigènes viraux (exemples: HPV, VHB, VHC, EBV).

### **2. L'immunomodulation via la tumeur**

Bien que les cellules cancéreuses expriment des antigènes tumoraux capables d'être reconnus par les cellules immunitaires comme des cellules du non-soi, elles peuvent neutraliser la réponse immunitaire ce qui conduit à un échappement tumoral.

Le recrutement de cellules effectrices (polynucléaires neutrophiles, cellules NK, lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques...) ou au contraire immunosuppressives (lymphocytes T régulateurs, cellules myéloïdes suppressives...) par la tumeur dépend de l'état inflammatoire. Cet état pro ou anti-inflammatoire du microenvironnement tumoral module la réponse immunitaire selon le concept du "Danger" décrit par Polly Matzinger (22). En revanche, un contexte immunosuppresseur favorise l'évasion tumorale.

L'activation des lymphocytes T (LT) nécessite un 1<sup>er</sup> signal induit par la reconnaissance spécifique par le T-cell receptor (TCR) du complexe majeur d'histocompatibilité classe II (pour les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>) ou de classe I (pour les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>) associé à un peptide antigénique (CMH II/I-peptide) présent à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Un 2<sup>nd</sup> signal est indispensable via l'interaction des molécules B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) exprimées par les CPA avec la molécule CD28 exprimée par les lymphocytes T, appelé signal de co-stimulation. Un troisième signal fait intervenir l'engagement de récepteurs aux cytokines. La combinaison de ces trois signaux est requise pour une pleine activation du LT entraînant la survie et la prolifération clonale grâce à l'interleukine-2 (IL-2), la différenciation lymphocytaire (Th1, Th2, Th9, Treg, Th17...) et l'induction d'une réponse mémoire (23).

La perte du CMH de classe I sur les cellules tumorales est un mécanisme bien connu d'échappement tumoral (24). L'engagement du TCR en l'absence de signal de co-stimulation empêche les LT de se différencier et induit l'anergie des LT spécifiques. Ainsi, un défaut d'expression des molécules B7.1 et B7.2 impliqué dans le signal de co-stimulation, contribue à une faible immunogénicité des cancers.

Les facteurs solubles sécrétés par la tumeur peuvent favoriser sa croissance via un effet autocrine, mais également influencer la réponse immunitaire. Par exemple, la production de cytokines immuno-régulatrices telles que l'IL-10 et/ou le TGFβ par les cellules tumorales, inhibe la maturation de cellules dendritiques (DC). En diminuant l'expression des molécules

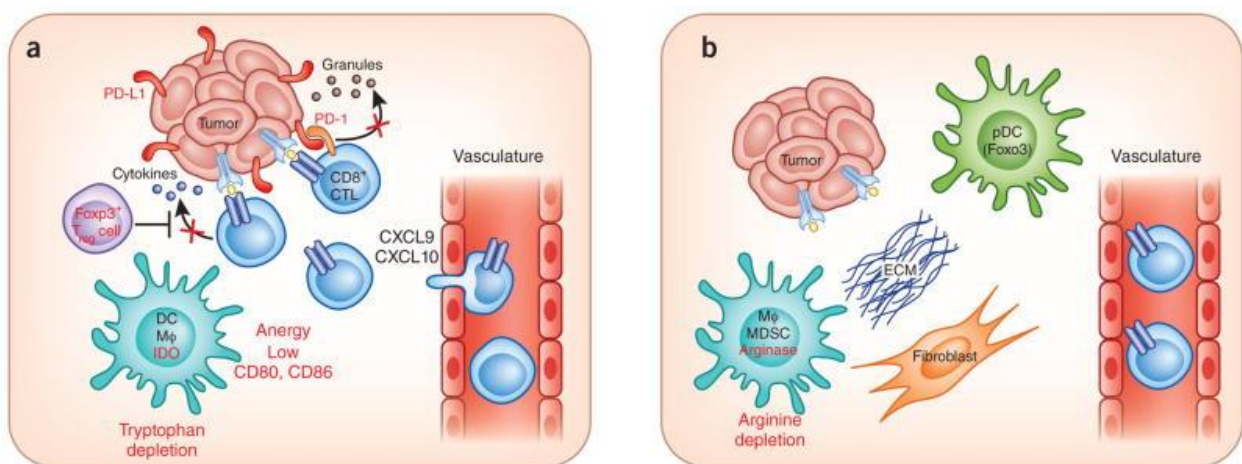
de classe II du CMH sur les cellules dendritiques, il existe une inhibition du 1<sup>er</sup> signal de l'activation des LT (25,26). Similairement, le lymphocyte T activé peut exprimer des molécules co-inhibitrices telles que le PD-1 (Programmed death 1) afin de réprimer une réponse immunitaire effectrice. L'interaction entre le PD-1 et son ligand (PDL-1) exprimé à la surface de certaines cellules tumorales induit l'anergie lymphocytaire T (27). Ce phénomène inhibe ainsi la réponse immunitaire adaptative et spécifique contre la tumeur. L'échappement tumoral au système immunitaire est multifactoriel, et fait l'objet de nombreux travaux afin d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles.

### **3. Le microenvironnement tumoral**

Limiter le recrutement de cellules immunitaires représente un autre moyen d'échappement tumoral. Les fibroblastes composant le stroma tumoral peuvent sécréter du fibrinogène ou du collagène limitant son accès (28). Le stroma est également constitué de cellules endothéliales par le phénomène d'angiogenèse. La néovascularisation est souvent associée à des zones d'hypoxie qui limitent le recrutement de cellules immunitaires (29).

L'hétérogénéité du microenvironnement tumoral peut expliquer les différences observées concernant le pronostic ou la réponse aux traitements chez les patients. L'infiltrat immunitaire est maintenant communément étudié dans le but d'identifier des facteurs pronostiques et/ou prédictifs de la réponse aux traitements. Les lymphocytes T sont connus pour avoir une valeur pronostique dans de nombreux cancers solides. Initialement, la présence de LT Th1 et LT CD8<sup>+</sup> dans l'infiltrat immunitaire péri-tumoral a été associée à un bon pronostic dans le cancer colorectal (30). Une corrélation positive entre la présence de LT et la réponse clinique est retrouvée dans de nombreux cancers solides (31). L'inhibition des réponses immunitaires effectrices peut être liée à la présence de LT CD4<sup>+</sup> régulateurs (Treg) dans le microenvironnement tumoral. L'augmentation de l'infiltrat Treg dans le cancer ovarien (32), le mélanome (33) et le cancer du sein (34) est associée à un mauvais pronostic. Les Treg exprimant le facteur de transcription FoxP3 et la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (CD25) jouent

un rôle majeur dans les phénomènes tolérance périphérique. Différents mécanismes d'immunosuppression sont décrits : la sécrétion de cytokines régulatrices (TGF $\beta$ , IL-10), l'expression de molécules co-inhibitrices (CTLA-4, PD-1, LAG-3...), le blocage métabolique des LT conventionnels par privation d'IL-2, d'adénosine (via CD39/CD73) ou de tryptophane (via IDO). L'étude de l'infiltrat immunitaire associé à la tumeur est en plein essor et pourrait permettre d'orienter la stratégie thérapeutique et notamment le choix d'une immunothérapie. Les modèles d'échappement tumoral à l'infiltrat immunitaire sont résumés dans la Figure 2.



**Figure 2. Deux modèles d'échappement tumoral selon l'infiltrat immunitaire**

- a) Tumeur avec infiltrat lymphocytaire T: les LT associés aux tumeurs sont recrutés par des chemokines, la tumeur crée un microenvironnement immunosuppresseur par l'expression de PDL-1, la production d'IDO, le recrutement de cellules immunosuppressives (Treg) et l'anergie.
- b) Tumeur sans infiltrat lymphocytaire T: la mise en place d'une barrière physique (molécules de la matrice extra-cellulaire) et une faible expression de chemokines limitent leur recrutement. *Illustration extraite de Gajewski et al, Nature Immunology (2013)*

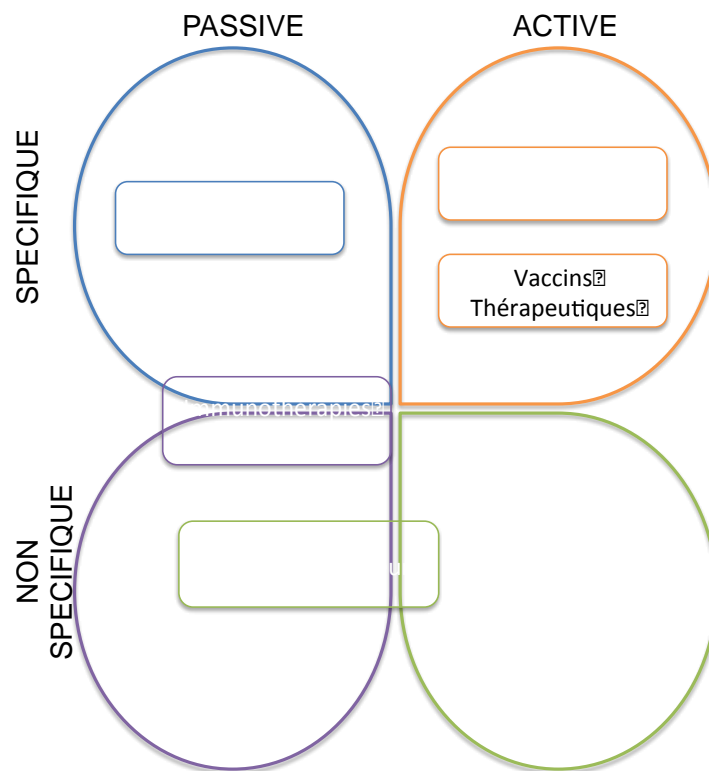


## II. Généralités sur l'immunothérapie anti-cancéreuse

Les traitements anti-cancéreux n'ont cessé d'évoluer durant les cinquante dernières années afin d'augmenter non seulement la survie des patients mais également leur survie sans progression et leur qualité de vie. La chirurgie d'exérèse reste le standard thérapeutique dans les stades localisés, associée ou non à un traitement adjuvant par la chimiothérapie et/ou de la radiothérapie. Pour les tumeurs localement avancées ou dans les formes métastatiques, la prise en charge est le plus souvent palliative, traitement systémique par chimiothérapie était alors la référence. Le manque d'efficacité des traitements conventionnels anti-tumoraux contre les cancers de stade avancé, a permis de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Parmi celles-ci, il y a tout d'abord une approche visant à agir sur une cible moléculaire impliquée soit dans le processus de carcinogénèse, soit dans le processus de prolifération tumorale. Ce sont les thérapies dites ciblées qui peuvent avoir un effet direct sur les cellules tumorales ou sur le microenvironnement tumoral comme l'angiogénèse. La deuxième approche consiste en l'activité anti-tumorale via le système immunitaire décrit précédemment. La mise en évidence du rôle du système immunitaire dans la carcinogénèse a fait naître le développement des immunothérapies ces 40 dernières années.

L'immunothérapie anti-tumorale est définie comme un outil thérapeutique ayant pour but la stimulation des cellules effectrices de la réponse innée et adaptative contre les cellules tumorales, tout en neutralisant les mécanismes immunosuppresseurs (35). De nombreuses stratégies sont étudiées afin d'agir sur les différents mécanismes mis en jeu par le SI contre la tumeur. L'immunothérapie dite « passive » est basée sur l'administration d'effecteurs isolés ou activés : anticorps monoclonaux, cytokines, cellules (LAK, TIL). A l'inverse, l'immunothérapie « active » est définie par la stimulation *in vivo* du SI du patient. Elle se pratique selon 2 modalités : spécifique c'est-à-dire ciblée vers les cellules tumorales (par

exemple les vaccins tumoraux) et, non spécifique visant à stimuler l'activité globale du système immunitaire sans cibler la tumeur particulièrement (Figure 3)



**Figure 3 : Les 4 domaines en immunothérapie**

Les outils thérapeutiques en immunothérapie anti-cancéreuse en fonction de leurs caractéristiques à induire une réponse immunitaire spécifique ou non, active ou passive. Extrait modifié du *Rapport – Immunothérapies 2025, LEEM 2011*

## **A. Les immunomodulateurs**

Les cytokines immunomodulatrices sont les molécules les plus anciennement utilisées à des fins anti-tumorales. A ce jour, seulement trois cytokines ont été approuvées par la FDA aux États-Unis: l'IL-2 (Proleukin®), l'IFN $\alpha$ 2a (Roferon®) et l'IFN $\alpha$ 2b (Intron-A®).

L'IL-2 produits par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs, induit la prolifération et la survie lymphocytaire. A doses élevées, l'IL-2 a montré son efficacité dans le traitement du mélanome et du cancer du rein métastatique avec des réponses tumorales durables (36,37). Malgré son efficacité sur la survie de certains patients, la toxicité de l'IL-2 peut être sévère (hypotension, hypoxie, défaillance rénale, arythmie cardiaque). Cette molécule est approuvée dans le mélanome aux États-Unis, ce qui n'est pas le cas en France. L'IL-2 a l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le cancer du rein métastatique même si son utilisation reste actuellement anecdotique.

L'IFN $\alpha$ 2a et l'IFN $\alpha$ 2b permettent à la fois d'activer les acteurs de l'immunité innée (macrophages, cellules NK) et adaptative (LT) et d'induire de l'apoptose sur les cellules tumorales (38). Il est indiqué dans le traitement adjuvant du mélanome (39). Associé à un anti-angiogénique (le bevacizumab, un anti-VEGF), il peut également être utilisé dans le cancer du rein métastatique (40).

Les études pré-cliniques cherchent à développer l'utilisation d'autres cytokines comme l'IL-21 et l'IL-15 partageant des propriétés anti-tumorales similaires avec l'IL-2 mais potentiellement moins toxiques. Les cytokines G-CSF sont couramment proposés en pratique clinique pour prévenir la neutropénie chimio-induite en mobilisant les progéniteurs hématopoïétiques mais n'ont aucune action anti-tumorale directe.

## **B. Les immunothérapies cellulaires**

Le transfert adoptif est l'une des thérapies cellulaires largement étudiée depuis les dernières décennies. Elle correspond à un traitement *ex vivo* des cellules du patient avant

réimplantation. Dans la fin des années 1980, Rosenberg et al, ont pu montrer des résultats positifs dans le traitement des cancers solides, en traitant *in vitro* des LT par de fortes doses d'IL-2 permettant leur activation et l'acquisition de propriétés cytotoxiques contre la tumeur (41). L'utilisation concomitante d'IL-2 était la principale limite de cette approche. De la même manière, les lymphocytes infiltrants la tumeur (Tumor-infiltrating lymphocytes ou TIL) autologues peuvent être isolés à partir de biopsies tumorales, amplifiés *in vitro* par faible doses d'IL-2 puis réinjectés aux patients. L'efficacité de cette procédure a été démontré chez l'Homme dans le traitement du mélanome (42). Plus récemment, une réponse complète chez 22% de patients atteints de mélanome métastatique lourdement prétraités a été observée après transfert adoptif de TIL autologues. Au préalable une chimiothérapie lymphodéplétante associée ou non à une radiothérapie avaient été conduite, et de fortes doses d'IL-2 avaient également été administrées (43).

Une autre stratégie prometteuse consiste à faire des transferts adoptifs de LT modifiés génétiquement (CAR-T cells). Le clonage de la partie hypervariable d'un anticorps (scFv, chaînes lourde et légère) et son couplage avec les domaines intracellulaires transduisant le signal des TCR, peut générer un récepteur aux antigènes chimérique (CAR). Les CAR n'ont pas de restriction au CMH, or la majorité des cellules tumorales perdent l'expression du CMH comme décrit précédemment. Les cellules CAR-T reconnaissant un antigène tumoral spécifique, induisent l'activation T via leurs domaines de signalisation intra-cellulaire CD3zeta et CD28 de manière indépendante du CMH. Le développement de cellules CAR-T est en plein essor en oncologie mais le coût reste une des limites de ce traitement (44).

### **C. Les vaccins**

Il existe deux types de vaccinations anti-tumorales:

- les vaccinations prophylactiques pour prévenir le développement de cancer viro-induits. Par exemple, les vaccins contre le virus de l'hépatite B permettent de prévenir le développement de carcinome hépatocellulaire sur hépatite B chronique. De la même

manière, le vaccin contre le papillomavirus (HPV) permet de prévenir les cancers du col utérin HPV-induits.

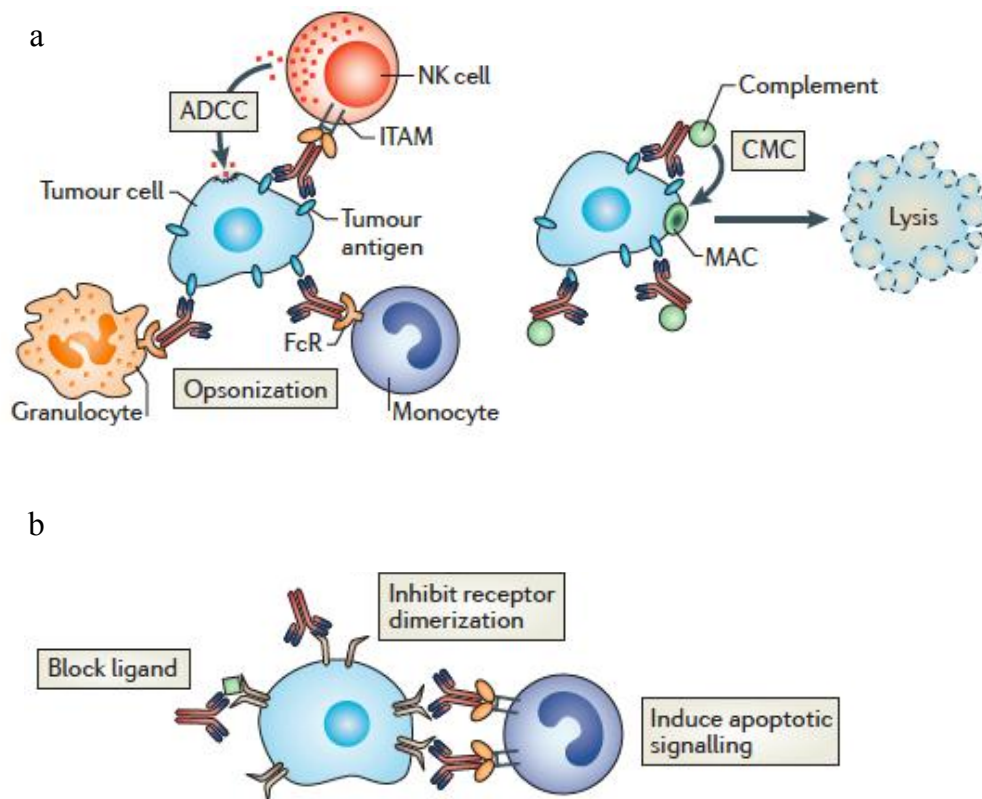
- les vaccinations thérapeutiques dont l'objectif est de créer *in vivo* une réaction immunitaire spécifique à la tumeur. Ces vaccins peuvent être basés sur l'injection de cellules présentatrices d'Ag (CPA), de peptides, de protéines, d'ADN ou encore de vecteurs recombinants. Afin que les vaccins anti-tumoraux soient efficaces, plusieurs facteurs doivent être considérés tels que: la perte de l'expression du CMH par les tumeurs, la faible immunogénicité de certains Ag tumoraux, la sécrétion de molécules immunosuppressives par les cellules tumorales ou du microenvironnement et la diminution de l'expression d'antigènes de tumeurs.

Depuis 2013, le premier vaccin thérapeutique ayant reçu l'AMM en France a été commercialisé. Il s'agit du Sipuleucel-T utilisé pour les patients atteints de cancer de la prostate résistant à la castration peu ou asymptomatiques. Après extraction de cellules présentatrices d'antigènes autologues par leucophérèse, la protéine (PA2024) issue de la fusion entre la cytokine GM-CSF et des phosphatases acides prostatiques (PAP) est activée *ex vivo*. Les cellules présentatrices d'antigènes activés présentent les PAP-GM-CSF à leurs surfaces et sont réinjectées au patient. Ce traitement a montré son efficacité dans une étude de phase III avec une amélioration de la survie globale de 4,1 mois par rapport au groupe placebo (45). Son utilisation reste rare en raison de son coût élevé.

#### **D. Les anticorps monoclonaux**

Depuis une quinzaine d'années, les anticorps monoclonaux (AcMo) font partie de l'arsenal thérapeutique anti-cancéreux. Ils peuvent avoir une action soit directe sur la cible via la portion Fab (fragment *antigen binding*), soit indirecte via la portion Fc (fragment *constant*) de l'AcMo. La plupart des AcMo sont des immunoglobulines de classe G (IgG). Leur région Fc permet l'activation de certaines cellules du système immunitaire exprimant leurs récepteurs

activateurs, les récepteurs pour la région Fc des IgG (RFc $\gamma$ ) conduisant à une cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC : antibody dependent cell mediated cytotoxicity) ou à une cytotoxicité dépendante du complément (CDC : complement-dependent cytotoxicity) (Figure 4). Les Ac monoclonaux peuvent agir sur différentes cibles i) la tumeur, ii) les effecteurs de l'immunité et iii) l'immunosuppression induite par le microenvironnement (46).



#### Figure 4: Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux en cancérologie

a. Effets immunologiques médiés par les Ac monoclonaux. Figure de gauche : mécanisme d'ADCC par des cellules exprimant des récepteurs ITAM (immunorecepteur tyrosine-based activation motif) ie cellules NK, monocytes, macrophages et granulocytes. Mécanisme d'opsonisation via le complément entraînant la phagocytose et la lyse cellulaire par les cellules de l'immunité innée avec les récepteurs de la partie Fc des IgG (Fc $\gamma$ R). Figure de droite : mécanisme de CDC.

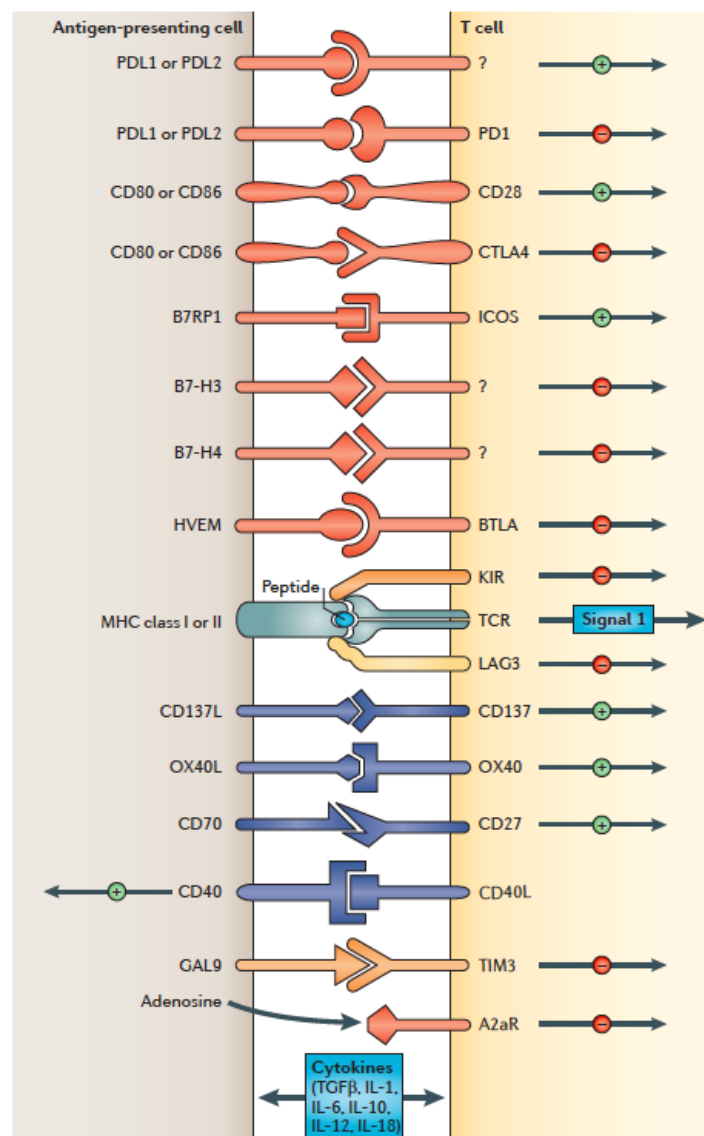
b. Effets directs des mAb. Les mAb peuvent inhiber la dimérisation d'un récepteur, bloquer un signal d'activation ou enfin induire l'apoptose. Extrait de *Weiner, Nat Rev Cancer 2015*

De nombreux AcMo sont utilisés en onco-hématologie. Le plus ancien et le plus couramment utilisé reste le rituximab bloquant le CD20 approuvé en 1997 par le FDA dans le lymphome non-Hodgkinien et la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Beaucoup d'autres AcMo sont disponibles ciblant : le CD20 (ibritumomab tiuxetan, tositumomab, ofatumumab, obinutuzumab), mais également le CD33 (gemtuzumab dans la leucémie myéloïde aigüe), le CD52 (alemtuzumab dans la LLC), le CD30 (brentuximab vedotin dans le lymphome de Hodgkin) ou encore plus récemment le CD38 (daratumumab dans le myélome multiple).

Dans les cancers solides, des anticorps monoclonaux ont été développés pour cibler des antigènes surexprimés par la tumeur tels que : HER2/Neu en adjuvant dans le cancer du sein mais également en 1<sup>ère</sup> ligne dans les formes métastatiques de cancer du sein (trastuzumab et pertuzumab) et de l'estomac (trastuzumab) et l'EGFR (epidermal growth factor) dans le cancer colorectal métastatique avec des gènes RAS de type sauvage (cetuximab et panitimumab). Au contraire le bevacizumab ciblant le VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A) inhibe la néovascularisation et non pas la cellule tumorale directement. Cet anti-VEGF a été approuvé dans les cancers colorectaux, bronchiques non à petites cellules, de l'ovaire, du rein ou encore dans le glioblastome.

De nouvelles stratégies visent à augmenter l'efficacité des AcMo via l'ADCC en modifiant la portion Fc par des mutations ou des glycosylations ou via le CDC en modifiant les IgG1 pour faciliter la liaison avec le C1q (46). Les anticorps monoclonaux bispécifiques (BiTE) ciblant deux antigènes sont également en cours d'évaluation dans de nombreuses indications après le succès du blinatumumab (anti-CD19 et -CD3) dans le traitement des leucémies aigües lymphoblastiques (47). L'approche bispécifique permet dans ce cas, d'amener à proximité des cellules cancéreuses (les lymphocytes B dans les leucémies aigües lymphoblastiques), les cellules effectrices (lymphocytes T cytotoxiques) permettant ainsi l'élimination des cellules cancéreuses.

Une nouvelle génération de AcMo est actuellement en plein essor, ciblant les LT dans l'intention de stimuler ou de réactiver des réponses T spécifiques dirigés contre la tumeur. Parmi ces AcMo, on retrouve des Ac agonistes stimulant les récepteurs activateurs des LT et les Ac antagonistes bloquant les voies inhibitrices. Ainsi, les molécules comme le Cytotoxic-T-Lymphocyte-Antigen 4 protein (CTLA-4) (ipilimumab et tremelimumab), le Programmed Cell Death-1 (PD-1) (nivolumab et pembrolizumab), ou son ligand (PD-L1) (atezoliumab) sont devenues des cibles privilégiées (Figure 5) (48). Ces derniers feront l'objet du prochain chapitre.



**Figure 5: les interactions co-activatrices ou co-inhibitrices régulant les réponses lymphocytaires T.** Les interactions PD-1/PDL-1 et 2, CTLA-4/CD80 et 86, BTLA/HVEM, LAG3/CMH I etII, TIM3/GAL9 sont inhibitrices. Les interactions CD28/CD80 et 86, ICOS/B7RP1, CD137/CD137L, CD40/CD40L, CD27/CD70 sont activatrices  
Extrait de *Pardoll, Nat Rev 2012*



### **III. Immunothérapies via les anticorps monoclonaux dirigés contre le CTLA-4**

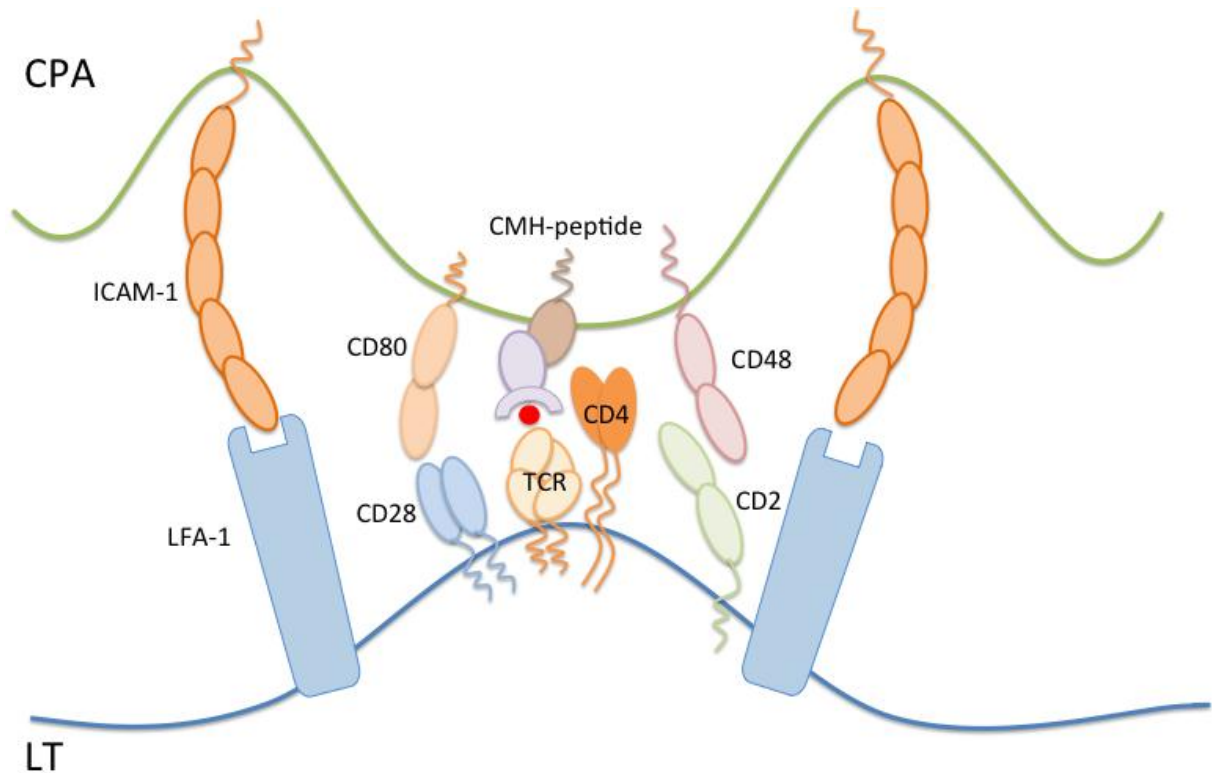
L'AcMo anti-CTLA-4 est le premier inhibiteur de checkpoint immunologique à avoir montré son efficacité en terme de survie globale dans le mélanome métastatique dans 2 essais de phase III (49,50). Dans ce chapitre, nous reprendrons les fonctions immunologiques du CTLA-4 qui ont permis d'aboutir au développement de thérapies ciblant cette molécule co-inhibitrice du système immunitaire adaptatif dans un but anti-tumoral. Nous évoquerons également son efficacité clinique et ces limites notamment en terme de toxicité.

#### **A. L'activation lymphocytaire**

##### **1. La synapse immunologique**

C'est au niveau des organes lymphoïdes secondaires que les lymphocytes T naïfs interagissent avec les cellules présentatrices d'antigène (CPA) afin de s'activer. L'activation lymphocytaire nécessite un 1<sup>er</sup> signal médié par la reconnaissance par le T cell receptor (TCR) du complexe majeur d'histocompatibilité classe II (pour les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>) ou de classe I (pour les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>) associé au peptide ou antigène (CMH II/I-peptide) présent à la surface des CPA. Il s'agit d'un signal de spécificité puisque seuls les lymphocytes présentant le TCR seront activés. L'interaction entre le TCR et le complexe CMH-peptide se doit d'être forte et prolongée pour être efficace. Des molécules d'adhésion (CD2, LFA-1) vont intervenir, augmentant l'intensité et la durée du 1<sup>er</sup> signal. La synapse immunologique est définie par la formation de SMAC (Supra-Molecule Activation Complexes) permettant d'élargir la zone de contact entre LT et des CPA en réorganisant le cytosquelette à la surface cellulaire. Dans la partie centrale de la synapse immunologique ou c-SMAC, se localisent le TCR, le co-récepteur CD4 ou CD8, les molécules CD3 et CD2 et la molécule de co-stimulation CD28

(Figure 6). Le SMAC périphérique ou p-SMAC comprend les molécules d'adhésion LFA-1 et ICAM-1. Enfin, les molécules CD45, CD44 et CD43 se trouvent au niveau du SMAC distal ou d-SMAC. La synapse immunologique est une structure dynamique qui permet d'optimiser les signaux d'activation lymphocytaire (Figure 6).



### Figure 6: la synapse immunologique

La synapse est organisée en SMAC (Supra-Molécule Activation Complexes). Le TCR, le co-récepteur CD4 ou CD8, les molécules CD3 et CD2 et la molécule de co-stimulation CD28 se localisent dans le c-SMAC. Les molécules d'adhésion LFA-1 et ICAM-1 se localisent dans p-SMAC. Les molécules CD45, CD44 et CD43 se situent dans le SMAC distal non représenté dans ce schéma.

Un 2<sup>nd</sup> signal est indispensable appelé signal de co-stimulation. En l'absence de ce signal, peut avoir lieu l'anergie T ou une apoptose précoce. Les récepteurs de co-stimulations sont nombreux (Figure 5) et divisés en 2 catégories :

- les récepteurs co-activateurs délivrant un signal positif (exemples: CD28, ICOS, GITR, 4-1BB) et,

- les récepteurs co-inhibiteurs délivrant des signaux négatifs en empêchant la transduction du signal induit par le TCR et le CD28 (exemples : CTLA-4, PD-1, B7-1, Tim-3...). Ces récepteurs répriment la réaction immunitaire excessive, et protègent des désordres auto-immuns.

Le CD28 exprimé par les lymphocytes T naïfs est le principal récepteur de co-stimulation. Il interagit avec ses ligands B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) exprimées à la surface des CPA et permet d'activer la voie de signalisation PI3-kinase, AKT et MAP-kinase.

Ces deux signaux combinés entraînent la production de la cytokine IL-2 et de la chaîne  $\alpha$  de l'IL-2R (CD25). La combinaison de ces trois signaux est requise pour une pleine activation du LT entraînant la survie et la prolifération clonale grâce à l'IL-2, la différenciation lymphocytaire (Th1, Th2, Th9, Treg, Th17...) et l'induction d'une réponse mémoire. Les CPA sont la source de cytokines polarisantes déterminant la nature des réponses T induites. Le type de cytokines polarisantes sécrétées par les CPA dépend du pathogène impliqué ou des molécules de stress cellulaire associées à une pathologie.

## **2. L'axe CD28 et CTLA-4 : régulation de l'activation T**

Le CD28 et le CTLA-4 (CD152) sont des protéines transmembranaires qui font partie de la même superfamille des immunoglobulines. Elles ont de nombreuses similitudes : i) elles s'expriment à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ii) leurs gènes sont localisés côte à côte sur le chromosome 2q33 (51), iii) elles se lient à leurs ligands communs le CD80 (B7-1) et le CD86 (B7-2) par leur motif MYPPPY (52).

Elles présentent cependant des fonctions opposées. En effet, le CD28 a un rôle dans l'activation lymphocytaire alors que le CTLA-4 permet de réguler la réponse immunitaire en limitant les phénomènes d'auto-immunité. Le CTLA-4 est connu pour avoir une affinité et une avidité plus forte pour ses ligands que le CD28 (53), et peut entrer en compétition avec ce dernier permettant de jouer pleinement son rôle d'inhibiteur. Dans les modèles murins, les

souris déficientes en CTLA-4 développaient des syndromes lymphoprolifératifs et présentaient une infiltration lymphocytaire dans de multiples organes (54,55). Ainsi, le blocage des ligands CD80 et CD86 par des agonistes du CTLA-4 (CTLA-4-Ig), permet de prévenir les affections auto-immunes chez les souris déficientes en CTLA-4 (56). Les manifestations auto-immunes développées par les souris CTLA-4<sup>-/-</sup> sont dépendantes du CD28, indiquant que la principale fonction du CTLA-4 est sa capacité à s'opposer au signal de co-stimulation médié par le CD28.

Le CD28 est constitutivement exprimé à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (57,58), alors que le CTLA-4 ne s'exprime que sur les LT activés (59) et constitutivement sur les Treg sous le contrôle du FoxP3 (60–62).

## **B. Régulation de l'expression du CTLA-4 à la surface des LT**

Le CTLA-4 est retrouvé au sein de plusieurs compartiments intracellulaires (63) tels que l'appareil de Golgi (ou trans-golgi network, TGN), les endosomes ou les lysosomes (64–66). De nombreuses molécules ont été identifiées dans le contrôle de son transport à la membrane cellulaire. Les différents mécanismes impliqués dans l'expression du CTLA-4 sont représentés dans la Figure 7.

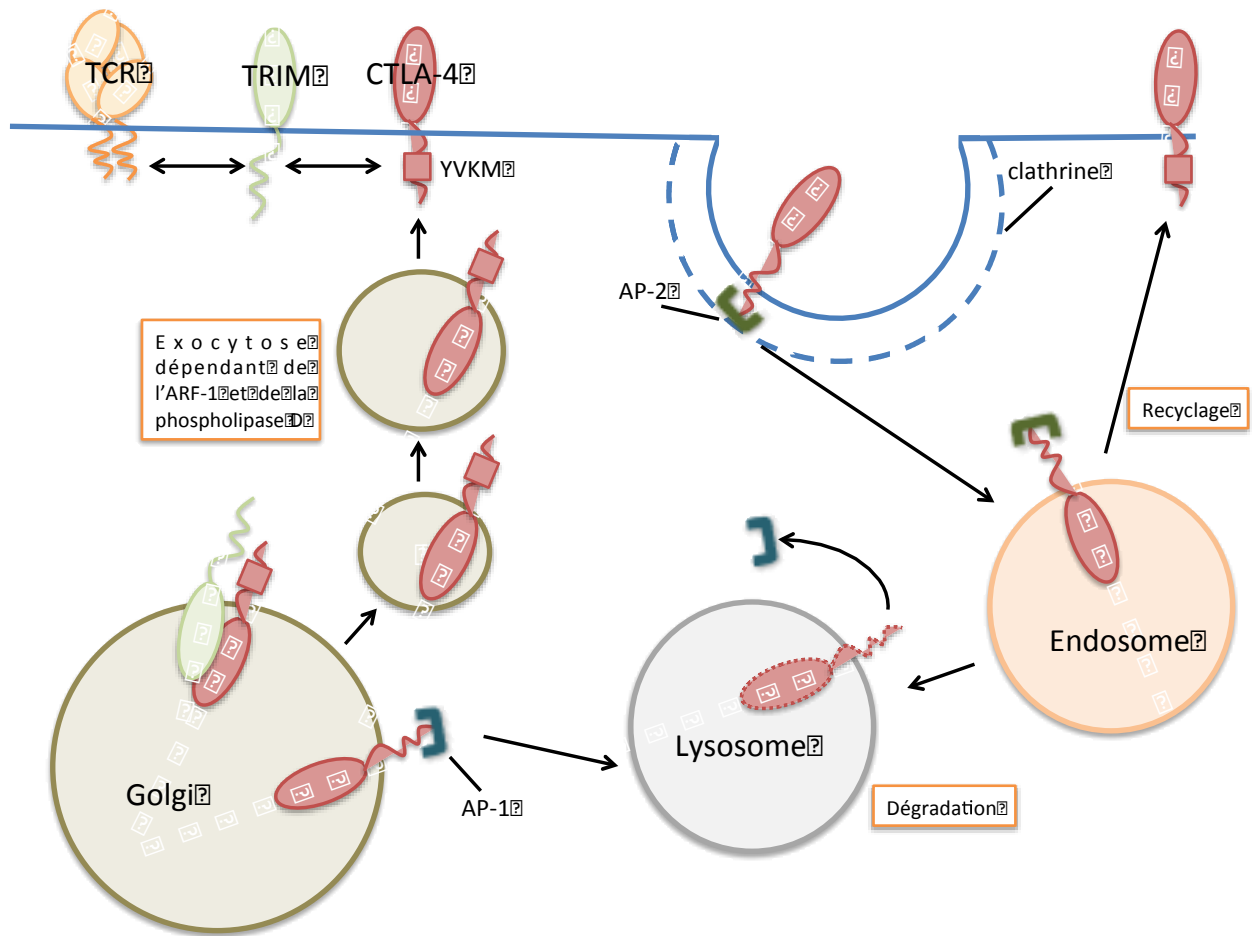
Une protéine transmembranaire appelé TCR-interacting molecule (TRIM) est présente sur les LT et les cellules NK. TRIM peut se lier au CTLA-4 dans le TGN, mais pas à la surface des endosomes (67). La surexpression de TRIM entraîne une augmentation de l'expression membranaire du CTLA-4 sans affecter ni l'expression du TCR ni celle du CD28. La diminution de l'expression de TRIM réduit le transport du CTLA-4 par les vésicules proximales du TGN, qui reste confiné dans le Golgi (67).

L'expression membranaire du CTLA-4 dépend également des guanosine triphosphonatasés (GTPases), d'adénosine diphosphonate ribosylation factor-1 (ARF-1) et des phospholipases D (PLD) (68). Ils sont nécessaires au bourgeonnement des vésicules du Golgi. Les inhibiteurs de PLD ou les mutations d'ARF-1 ou de PLD inhibent le transport du CTLA-4 à la membrane

cellulaire (69).

D'autres mécanismes interviennent dans l'expression du CTLA-4 à la surface cellulaire et son internalisation. Des voies d'endocytose font intervenir des complexes de clathrines et des adapter protein-1 (AP-1) et 2 (AP-2). AP-2 est exprimé à la surface plasmique et permet l'endocytose de nombreux récepteurs (70). AP-2 se lie au CTLA-4 via son motif intracytoplasmique YVKM, ce qui permet son recrutement par les clathrines (66,71,72). Suite à cette endocytose, le CTLA-4 peut être soit dégradé dans les lysosomes soit recyclé à la surface cellulaire (65). En parallèle, le CTLA-4 se trouvant dans le Golgi, se lie à l'AP-1 via le même motif YVKM utilisé par AP-2 (66). L'AP-1 présente une structure similaire à l'AP-2, mais se localise dans le TGN et les lysosomes alors que l'AP-2 se situe au niveau de la membrane plasmique. L'interaction du CTLA-4 avec l'AP-1 permet le transfert du TGN vers les endosomes ou les lysosomes pour être dégradés (66).

Le trafic intra-cellulaire est très certainement modulé afin de réguler le niveau d'expression du CTLA-4 à la surface membranaire.



**Figure 7 : Mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression du CTLA-4 à la surface cellulaire.**

TRIM peut se lier au CTLA-4 dans l'appareil de Golgi (Golgi). L'adénosine diphosphonate ribosylation factor-1 (ARF-1) et la phospholipase D permet de bourgeonnement des vésicules d'endocytose transportant le CTLA-4 à la surface membranaire. Les adapter protein-1 (AP-1) et 2 (AP-2) permettent le transport du CTLA-4 vers le lysosome pour être dégradé. L'AP-1 se localise dans le Golgi et les lysosomes alors que l'AP-2 se situe au niveau de la membrane plasmatique. *Modifié d'après Walker, Nat Rev Immunol 2011.*

## C. Fonctions intrinsèques et extrinsèques du CTLA-4.

Comme nous l'avons décrit précédemment, le CTLA-4 est une molécule régulatrice inhibant l'activation T. Les fonctions régulatrices du CTLA-4 s'exercent de manière intrinsèque ou extrinsèque. L'interaction du CTLA-4 avec ses ligands CD80/CD86 entraînent des fonctions inhibitrices sur le LT qui l'exprime : il s'agit des fonctions intrinsèques du CTLA-4. Le CTLA-4 peut également exercer ses fonctions sur d'autres cellules immunitaires qui ne l'exprime pas à leur surface : il s'agit de ses fonctions extrinsèques.

### 1. Fonctions intrinsèques aux cellules T.

#### a) CTLA-4 en compétition avec le CD28 pour leurs ligands communs

Le CTLA-4 a une action antagoniste de la voie de signalisation B7-CD28. CTLA-4 et CD28 se lient aux mêmes ligands (CD80 et CD86) via leurs motifs MYPPPY situés sur leur domaine extracellulaire (52). Ayant une affinité et une avidité bien plus forte pour les molécules B7, le CTLA-4 entre en compétition avec le CD28 (73). La supériorité de la liaison du CTLA-4 pour ses ligands est liée à l'existence de résidus localisés sur la portion N-terminale des motif MYPPPY dans la région CDR1 (complementarity determining region-1) du CTLA-4, lesquels sont absents sur le CD28 (74,75). Le CTLA-4 n'est pas exprimé de manière constitutive sur les LT (hormis les Treg), mais surexprimé via l'interaction du TCR avec le CMH-peptide (76). De la même manière, le CD80 (B7.1) s'exprime à la surface des CPA activées alors que le CD86 (B7.2) est exprimé de manière constitutive sur les CPA même lorsque ces dernières sont immatures. Le CD80 se lie préférentiellement au CTLA-4 et permet son recrutement dans la synapse immunologique alors que le B7-2 stabilise le CD28 (77). De plus, les interactions entre les molécules B7 et le CTLA-4 ou le CD28 sont structurellement différentes. Le CTLA-4 se dimérise à la membrane cellulaire, et peut se lier à un homodimère CD80 ou CD86 de manière indépendante, alors qu'un homodimère CD28 se

lie à un monomère B7-1 ou B7-2 (73). Le CTLA-4 et le CD28 entrent en compétition dans le cSMAC de la synapse immunologique, préférentiellement dans les conditions de faible densité en molécules B7. L'accumulation de CTLA-4 dans le cSMAC inhibe le recrutement de la PKC- $\theta$  (protéine kinase C-theta) et la formation du complexe CARD11 (Caspase recruitment domain-containing protein 11) de la voie du CD28, entraînant un défaut de signalisation de la voie NF- $\kappa$ B (78) (Figure 8). Ainsi, le CTLA-4 inhibe via son domaine extracellulaire la production d'ARNm de l'IL-2 et la progression dans le cycle cellulaire.

#### b) Induction de signaux négatifs

La voie de signalisation du TCR met en jeu la phosphorylation de motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) du complexe TCR-CD3 via les protéines kinases de la famille Src: Lck (reliée au CD4 ou au CD8) et Fyn. Une fois les motifs ITAM phosphorylés, ils se lient au domaine SH2 de la Zeta-chain-Associated Protein kinase 70 (ZAP-70) et de la Spleen tyrosine kinase (SYK) permettant une activation de LAT (Linker Activated T cells) générant ainsi la formation d'un premier complexe multi-protéique à la membrane responsable du déclenchement de la cascade de signalisation initiée par l'engagement du TCR. Le CTLA-4 interagit avec ITAM présent sur le TCR-CD3 bloquant la phosphorylation de la protéine ZAP-70, inhibant ainsi l'activation lymphocytaire (79) (Figure 8).

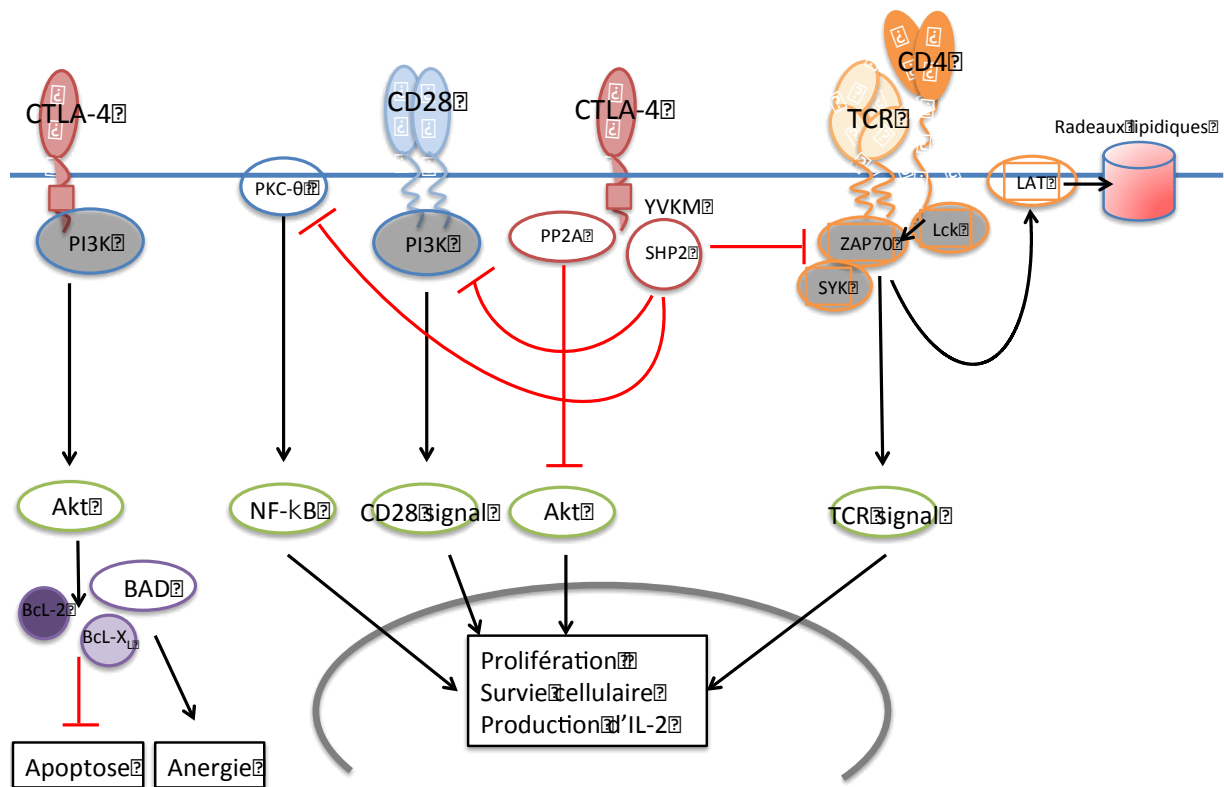
Le CTLA-4 peut également avoir une action inhibitrice sur la membrane lipidique constituant une réelle plateforme de signalisation cellulaire. La signalisation via le TCR et le CD28 induit l'apparition de radeaux lipidiques ou de micro-domaines enrichis en glycolipides dans la membrane cellulaire. Le CTLA-4 réduit la présence de phospho-LAT dans ces domaines membranaires. Cette protéine est impliquée dans l'induction de radeaux lipidiques, ce qui conduisant à une inhibition du signal du TCR par le CTLA-4 (80,81) (Figure 8).

Le CTLA-4 se lie par son motif intra-cytoplasmique YVKM à la phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), aux tyrosine phosphatases 1 et 2 (SHP1 et SHP2), et à la serine/threonine



phosphatase 2A (PP2A). L'interaction entre le CTLA-4 et ses ligands (CD80/CD86), permet aux SHP1 et SHP2 de déphosphoryler les protéines impliquées dans l'activation du TCR (ZAP-70 et LAT), alors que PP2A interfère avec la voie Akt (Figure 8). Il est important de noter que l'engagement du CTLA-4 entraîne le recrutement de la PI3K, permettant l'anergie lymphocytaire T tout en évitant la mort cellulaire par apoptose (82). La liaison du CTLA-4 avec la PI3K permet une activation de la voie protéine kinase B/Akt (PKB/Akt) entraînant des signaux de survie cellulaire anti-apoptotique et d'induction d'anergie T (82). Bcl-2 antagoniste of cell death (BAD) peut entraîner l'apoptose par dimérisation avec des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> (83). L'activation de la voie PKB/Akt par le CTLA-4 induit la phosphorylation du BAD augmentant l'expression du Bcl-2 et du Bcl-X<sub>L</sub> maintenant la survie cellulaire (Figure 8). D'autres voies de signalisation dépendantes de la PI3K ont été étudiées : le CTLA-4 active la voie JNK (c-JUN N-terminal kinase) dans les LT CD4<sup>+</sup> mais inhibe la voie des ERK (extracellular signal-regulated kinase) (84).

Malgré l'étude d'une multitude de voies de signalisations, la signalisation du CTLA-4 semble



**Figure 8 : Voies de signalisation du CTLA-4 médiées par son domaine intracytoplasmique.** Modifié d'après Rudd, *Immunol Rev*, 2009.

c) Signalisation intrinsèque indépendante du ligand

La perte de la région codant pour l'exon 2 est à l'origine d'un variant du CTLA-4 (ligand-indépendant CTLA-4 ou liCTLA-4) caractérisé par l'absence de domaine extracellulaire permettant son interaction avec ses ligands. Plusieurs études ont montré que la surexpression du liCTLA-4 entraînait une inhibition des réponses T et retardait l'apparition d'une dégénérescence lymphoproliférative dans les souris déficientes en CTLA-4 (85,86).

Alors que le domaine intra-cytoplasmique du CTLA-4 interagit fortement avec la protéine AP-2, la surexpression du liCTLA-4 inhibe l'endocytose dépendante des clathrines. Cependant, le liCTLA-4 n'a pas été identifié chez l'Homme et semble peu probable que ce mécanisme contribue majoritairement à la fonction du CTLA-4.

d) Fonctions sur l'adhésion et la motilité cellulaire

Une étude a suggéré que l'interaction entre CTLA-4 et ses ligands permettait un renforcement de l'adhésion par le LFA-1 avec ICAM-1 de la cellule présentatrice d'antigène (87). D'autres études suggèrent que le CTLA-4 empêche le signal « STOP » médié par le TCR pour prévenir une activation T inappropriée (88). Cependant il n'existe pas de modification de la motilité lymphocytaire T entre les souris CTLA-4<sup>-/-</sup> et les souris wild-type (89). Le temps de contact entre LT et CPA reste une étape clé des réponses immunitaires. Le rôle de CTLA-4 dans le contrôle de cette interaction reste flou.

**2. Les fonctions extrinsèques.**

Les études permettant de différencier les fonctions intrinsèques et extrinsèques du CTLA-4 se sont basées sur le croisement de souris sauvage (wild-type) avec des souris déficientes en gène codant pour le CTLA-4 dans la moelle osseuse ou dans la rate. La première étude suggérant une fonction extrinsèque du CTLA-4 montrait dans un modèle de souris immunodéficiente pour RAG2, reconstituée par des cellules wild-type et CTLA-4 déficientes issues de la moelle osseuse, un développement normal du système immunitaire et une absence

d'activation spontanée des LT CTLA-4<sup>-/-</sup> (90). D'autres travaux indépendants ont validés ces données (91,92). Il semble alors que les fonctions extrinsèques du CTLA-4 sont évidentes dans la prévention de l'auto-immunité. En réalité, les mécanismes impliqués sont à l'étude et restent à préciser.

a) Stimulation des Treg par le CTLA-4

Le CTLA-4 joue un rôle majeur dans la fonction suppressive des Treg. Comme nous l'avons décrit précédemment, le CTLA-4 s'exprime constitutivement sur les Treg (62,93).

Le contrôle des LT effecteurs CTLA-4<sup>-/-</sup> par des LT wild-type (WT) nécessite la présence de Treg exprimant FoxP3<sup>+</sup> dans la population lymphocytaire WT (92). Cet effet est réversible, étant donné que l'élimination des Treg entraînait le développement d'un syndrome lymphoprolifératif dépendant des LT CTLA-4<sup>-/-</sup> (92). Historiquement, dans les différentes études *in vitro* (62,94–96) et *in vivo* (95,97–99), le rôle fonctionnel du CTLA-4 sur les Treg a largement été débattu et controversé. Pour distinguer l'effet du CTLA-4 sur les LT effecteurs versus sur les Treg, les études se devaient de différencier ces deux populations soit par l'utilisation de blocage sélectif du CTLA-4 soit par la modification génétique de l'un des sous-types de LT. Pour contrecarrer le syndrome lymphoprolifératif rapidement léthal dans les modèles CTLA-4<sup>-/-</sup>, le blocage du CD28 par un CTLA-4-Ig ou des souris B7<sup>-/-</sup> étaient utilisés. *In vitro*, le blocage de CTLA-4 altère la fonction suppressive des Treg WT sur les LT effecteurs CTLA-4<sup>-/-</sup> (94). Dans un modèle murin de colite induite par les LT, le blocage du CTLA-4 inhibait également l'effet supprimeur des Treg sur les LT effecteurs CTLA-4<sup>-/-</sup> (97). Dans ces 2 modèles, les Treg CTLA-4<sup>-/-</sup> maintenaient un effet supprimeur sur les LT effecteurs via d'autres mécanismes tels que la sécrétion de TGFβ et d'IL-10. Cependant, ces mécanismes compensatoires indépendants du CTLA-4 ne sont pas universels. En générant des modèles murins déficients en CTLA-4 uniquement sur les Treg exprimant le FoxP3, Sakaguchi et al. ont montré que ces souris présentaient un syndrome lymphoprolifératif et des

maladies auto-immunes (100). Les Treg CTLA-4<sup>-/-</sup> diminuent *in vivo* et *in vitro* la fonction suppressive des Treg en diminuant l'expression du CD80 et du CD86 par les DC (100).

Ces données montrent que le CTLA-4 a un rôle majeur dans la fonction suppressive des Treg même s'il n'est pas le seul acteur impliqué dans l'immunosuppression. Ses mécanismes d'actions semblent multiples :

- Plusieurs travaux montrent une altération dans la voie de signalisation du TCR (ERK et Akt) dans les Treg par une expression constitutive du CTLA-4 (101).
- L'expression du CTLA-4 par les Treg pourrait également être impliquée dans l'accumulation du CD28 et PKC- $\theta$  dans le cSMAC. Cette configuration participe à la maintenance d'un état anergique associé à leur fonction immunosuppressive (78).
- Le CTLA-4 a une action sur la maturation des CPA. Les Treg peuvent diminuer l'expression des molécules B7-1 et B7-2 des DC (102). Cet effet était dépendant de la présence du CTLA-4 sur les Treg (99,100,102,103).
- L'induction d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) par les CPA (décrit dans le chapitre suivant).

L'effet immunosuppresseur du CTLA-4 est en grande partie liée à son effet activateur sur les Treg. Ces mécanismes restent à préciser et plus particulièrement leur régulation.

#### b) Activation d'IDO par le CTLA-4

Un des mécanismes étudié concerne l'induction de l'IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase) sur les CPA exprimant CD80 et CD86. L'IDO catabolise le tryptophane, diminuant sa disponibilité dans le LT et engendrant une inhibition de la prolifération et de la survie cellulaire (104). La capacité de l'agoniste du CTLA-4 (CTLA-4-Ig) à activer l'IDO a été démontré *in vivo* (105,106). L'activation de l'IDO par le CTLA-4 n'est pas son seul mécanisme puisque le CTLA-4-Ig ne permet pas d'induire l'IDO par certaines CPA telles que les DC plasmacytoïdes ou celles dérivées à partir des monocytes (107)

### c) Modulation du phénotype des CPA par le CTLA-4

Comme nous l'avons décrit précédemment, les Treg ont la capacité d'inhiber l'expression des ligands des molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) des CPA. L'inhibition de l'expression des molécules B7 via le CTLA-4 a été décrite dans plusieurs études (103,108).

Plus récemment, le mécanisme d'inhibition de ces molécules par le CTLA-4 a été décrit. L'expression du CTLA-4 sur les LT activés ou sur les Treg peut diminuer l'expression du CD80 et du CD86, par trans-endocytose (109). L'interaction du CTLA-4 avec ses ligands (CD80/CD86) entraîne leur transfert dans une vésicule intra-cytoplasmique dans le LT. La dégradation lysosomale du complexe CTLA-4/ CD80-CD86 fait suite à la trans-endocytose, s'inscrivant dans le trafic intra-cellulaire du CTLA-4. Ceci est un des mécanismes majeur d'inhibition des ligands sur les CPA.

### d) Production du CTLA-4 soluble

L'identification d'un ARNm épissé codant pour le CTLA-4 soluble (sCTLA-4) a été une découverte importante. Le sCTLA-4 ne présente pas de domaine transmembranaire codé par l'exon 3 (110). Chez les patients présentant des maladies auto-immunes, les niveaux de concentration du sCTLA-4 étaient plus importants comparativement à ceux des volontaires sains (111,112). D'autres ont montré que la présence du polymorphisme CT60 (ou rs3087243) sur l'allèle du CTLA-4 (diabète de type 1) était associée à un plus faible niveau de transcrite codant pour le sCTLA-4 (113). Le sCTLA-4 semble également jouer un rôle dans les mécanismes de tolérance périphérique, des études sont nécessaires pour définir ses fonctions précises.

Nous avons donc pu décrire les fonctions immunosuppressives du CTLA-4 qui permettent d'inhiber les fonctions effectrices des LT à une stimulation antigénique, facilitant l'échappement tumoral et maintenant une tolérance périphérique contre les désordres auto-

immuns. C'est ainsi que des thérapies bloquant ce point de contrôle immunologique ont été développés en oncologie.

#### **D. Blocage du CTLA-4 en oncologie médicale.**

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire (SI) est l'un des mécanismes d'évasion tumorale. Le CTLA-4, par ses fonctions inhibitrices est devenue une cible thérapeutique. Le blocage du CTLA-4 s'est avéré efficace dans de nombreux modèles précliniques à travers l'utilisation d'Ac monoclonaux anti-CTLA-4. L'équipe d'Allison a démontré *in vitro*, que l'engagement du TCR et du CTLA-4 entraînait une inhibition de la prolifération T et de la production d'IL-2. Inversement, le blocage du CTLA-4 augmentait la réponse T effectrice (114). Dans leur modèle murin, l'Ac anti-CTLA-4 entraînait une réponse T mémoire anti-tumorale (115). D'autres études chez la souris ont confirmé l'efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA-4 dans des modèles de mélanome et de cancer de la prostate (98,116,117). C'est donc à partir de ces données précliniques, que l'Ac monoclonal anti-CTLA-4 humanisé (IgG1 $\kappa$ ) ou ipilimumab a été développé en 1999 par Medarex sous l'égide d'Alan Korman. Il s'agit du premier agent bloquant un co-récepteur inhibiteur à recevoir l'accord de la FDA dans le traitement des mélanomes.

##### **1. Efficacité de l'anti-CTLA-4 : résultats des essais cliniques**

Avant 2011, le traitement des mélanomes avancés et/ou non résecables était limité à la chimiothérapie par dacarbazine ou de l'IL-2 à fortes doses, avec pour résultat une médiane de survie de 8 à 9 mois et un taux de survie à 3 ans inférieur à 15% (118). L'ipilimumab a montré son efficacité dans le mélanome métastatique dans 2 essais de phase III, randomisés en double aveugle.

- Hodi et al (essai MDX010-20), ont comparé dans une cohorte de 676 patients ayant déjà reçu un traitement pour leur mélanome métastatique, l'ipilimumab (3mg/kg) associé ou non

au gp100 (glycoprotéine 100, un peptide vaccinal) versus gp100 en monothérapie. Les médianes de survie des groupes traités par ipilimumab seul ou associé au gp100 étaient similaires, respectivement de 10.1 et 10 mois, contre 6.4 mois pour le groupe sous gp100 seul (hasard ratio (HR) 0.68,  $p < 0.001$ ) (49).

- Robert et al (essai CA184-024), ont montré que l'ipilimumab augmentait la survie globale des patients atteints d'un mélanome métastatique naïf de tout traitement. Dans leur cohorte de 502 patients, ils ont comparé un groupe traité par ipilimumab (10mg/kg) associé à la dacarbazine (850 mg/m<sup>2</sup>) versus dacarbazine et placebo. Le taux de survie à 3 ans était significativement plus élevé dans le groupe ipilimumab estimé à 20.8% versus 12.2% pour le bras contrôle (50).

Plus récemment, l'ipilimumab a également montré en adjuvant, une amélioration significative de la survie sans récurrence des patients atteints d'un mélanome stade III réséqué (119). Dans l'essai de phase III (EORTC 18071), 951 patients ont été randomisés dans le bras ipilimumab (10mg/kg) (n=475) versus placebo (n=476). Le taux de survie sans récurrence à 5 ans était significativement plus élevé dans le groupe ipilimumab estimé à 40,8% versus 30,3% pour le bras contrôle (HR= 0.76, 0.64 to 0.89,  $p < 0.001$ ) (120).

L'ipilimumab est devenu un traitement de choix et a obtenu l'AMM en juillet 2011 dans les mélanomes avancés (non résécables ou métastatiques) chez les patients adultes ayant déjà reçu un traitement. Il est également approuvé par la FDA en 2015 dans le traitement adjuvant des mélanomes stade III après résection complète.

Un autre Ac monoclonal anti-CTLA-4 humanisé (IgG2), le tremelimumab a été développé dans la même période par Pfizer. Malheureusement, ce traitement n'a pas montré son efficacité en terme de survie globale dans le traitement du mélanome métastatique (121) et n'a pas d'indication en monothérapie à ce jour. Actuellement, plusieurs essais cliniques testent tout de même cet anticorps en association avec d'autres traitements dans de nombreux essais cliniques.

En parallèle les Ac monoclonaux bloquant le PD-1 tels que le nivolumab et le pembrolizumab ont été approuvés par la FDA dans de nombreuses indications thérapeutiques : mélanome (122,123) , cancer urothélial (124,125), cancers ORL (126,127), lymphome de Hodgkin (128), cancer du rein (129), cancer bronchique non à petites cellules (130,131), et dans les cancers solides avec instabilité du microsatellite (MSI) (132).

Actuellement, les essais combinant ces traitements entres-eux ou avec des chimiothérapies ou des thérapies ciblées est en plein essor. C'est ainsi que la combinaison nivolumab associé à l'ipilimumab a obtenu l'approbation de la FDA dans le traitement de 1<sup>ère</sup> ligne du mélanome métastatique sans mutation du gène BRAF (133–135). Les essais cliniques de phase III actuellement en cours (répertoriés dans la table 1) évaluent pour la majorité la combinaison de l'anti-CTLA-4 (ipilimumab et tremelimumab) avec de l'anti-PD-1 (nivolumab) ou l'anti-PDL-1 (durvalumab).



Titre	n° NCT	Type de cancer	Date de début de l'étude
Fotemustine(FTM) vs FTM + Ipilimumab (IPI) ou Ipilimumab (IPI) ou IPI + Nivolumab	02460068	Métastases cérébrales	déc-12
Nivolumab ou Nivolumab + Ipilimumab ou placebo après une chimiothérapie à base de Sels de Platines	02538666	Cancer bronchique à petites cellules	sept-15
Nivolumab + ipilimumab ou Nivolumab + chimiothérapie vs chimiothérapie	02872116	Cancer de l'estomac/ jonction oeso-gastrique	oct-16
Etude d'innocuité du Nivolumab associé à l'ipilimumab	02869789	Cancer bronchique	sept-16
Nivolumab e+ Ipilimumab vs Ipilimumab ou Nivolumab	03068455	Mélanome IIIc/IV réséqués	avr-17
Nivolumab +/- Ipilimumab	02785952	Carcinome épidermoïde du poumon en récurrence stade IV	déc-15
Nivolumab + Ipilimumab suivi de Nivolumab en monothérapie	02599402	Mélanome	déc-15
Ipilimumab vs TIL	02278887	Mélanome métastatique	sept-14
Nivolumab + Ipilimumab ou Nivolumab et Fluorouracil + Cisplatine vs Fluorouracil + Cisplatine	03143153	Cancer de l'œsophage	janv-17
Nivolumab et Ipilimumab vs Pemetrexed + Cisplatine ou Carboplatine	02899299	Mésothéliome	oct-16
Nivolumab ou Nivolumab + Ipilimumab ou Nivolumab + Sels de platines vs Sels de platines	02477826	Cancer bronchique non à petites cellules stade IV	août-15
Nivolumab + Ipilimumab vs Sels de platines	02998528	Cancer bronchique non à petites cellules	janv-17
Nivolumab + Ipilimumab vs chimiothérapie	03036098	Cancer urothélial métastatique	mars-17
Nivolumab + Ipilimumab vs chimiothérapie	02741570	Cancer ORL en récurrence métastatique	août-16
Nivolumab + Ipilimumab vs Nivolumab + chimiothérapie	02864251	Cancer bronchique non à petites cellules avec mutation EGFR	oct-16
IFN $\alpha$ 2b vs Ipilimumab vs Pembrolizumab	02506153	Mélanome stade III-IV	oct-15
Séquence Dabrafenib et Trametinib suivi par Nivolumab + Ipilimumab ou séquence inverse	02224781	Mélanome stade III-IV BRAFV600	juil-15
Durvalumab ou Durvalumab + Tremelimumab vs traitement standard	02369874	Carcinome épidermoïde du poumon en récurrence stade IV	sept-15
Etude d'innocuité Durvalumab + Tremelimumab vs Durvalumab monothérapie	03084471	Cancers solides métastatique	avr-17
Durvalumab + Tremelimumab vs chimiothérapie	02542293	Cancer bronchique non à petites cellules	nov-15
Durvalumab +/- Tremelimumab vs chimiothérapie	02516241	Cancer urothélial métastatique	nov-15
Durvalumab + Tremelimumab vs Durvalumab + chimiothérapie vs chimiothérapie	03164616	Cancer bronchique non à petites cellules	juil-17
Durvalumab +/- Tremelimumab en association avec la chimiothérapie	03043872	Cancer bronchique non à petites cellules	mars-17

**Table 1. Essais cliniques de phase III actuellement en cours évaluant l'ipilimumab et/ou le tremelimumab, d'après *clinicaltrials.gov*.**

## 2. Biomarqueurs de réponses à l'anti-CTLA-4

L'ipilimumab a montré son efficacité sur la survie globale des patients atteints d'un mélanome métastatique. Cependant, dans les essais de Hodi et de Robert, le taux de réponses objectives et/ou de stabilité n'est que de 15 à 20 % (50,136,137). De plus, le coût élevé, les effets secondaires fréquents (environ 70 % de toxicités tous grades confondus) et parfois graves doivent être pris en compte lorsque l'on prescrit un anti-CTLA-4. Il paraît nécessaire de trouver des biomarqueurs prédictifs de la réponse et des effets secondaires afin de mieux sélectionner les patients qui tireront bénéfice de ce médicament.

L'étude des cellules immunitaires des patients traités par ipilimumab a permis d'identifier plusieurs bio-marqueurs potentiels associés à l'évolution de la maladie :

- Le nombre absolu de lymphocytes circulants initial supérieur à 1000/ $\mu$ l et augmentant après la 2<sup>ème</sup> injection d'ipilimumab est corrélé à un bénéfice clinique et à la survie globale (138,139).
- L'augmentation des polynucléaires éosinophiles de plus de 100/ $\text{mm}^3$  entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> injection d'ipilimumab est prédictive d'une amélioration de la survie des patients (139).
- Le rapport neutrophile/lymphocyte en pré-thérapeutique pourrait prédire la réponse au traitement par ipilimumab chez les patients avec un mélanome métastatique (140).
- Simeone et al, ont observé une amélioration de la survie globale des patients présentant une décroissance ou une stabilité du taux de Lactate Déshydrogénase (LDH) et de Protéine C Réactive (CRP) entre le bilan pré-thérapeutique et l'évaluation à 12 semaines par rapport à ceux avec une augmentation de ces marqueurs. Les patients avec un taux stable ou décroissant de LDH et de CRP avaient respectivement des médianes de survie de 18.9 mois versus 5.2 mois ( $p < 0.0001$ ) et de 16.9 versus 4.6 mois ( $p < 0.0001$ ) comparativement à ceux qui avaient une augmentation de ces marqueurs (141).

- Le faible taux de mMDSC (monocytic Myeloid Derived Suppressor Cells, CD14+HLA-DR neg/low) en pré-thérapeutique est associé à une meilleure réponse anti-tumorale (142). L'étude de ces MDSC a été réalisée en raison de leur rôle immunosuppresseur. Ces cellules myéloïdes immatures ont la capacité d'induire des Treg et de produire des facteurs solubles inhibant l'immunité anti-tumorale de l'hôte (143,144).
- Fu et al, ont décrit une augmentation de l'expression de la molécule de co-stimulation ICOS (Inducible COStimulator) sur les LT dans la tumeur et dans le sang après traitement par ipilimumab (145). ICOS est une molécule de co-stimulation de la superfamille des immunoglobulines régulant les réponses T, elle pourrait ainsi avoir une importance dans l'efficacité de l'ipilimumab (146,147).
- La présence de l'anticorps NY-ESO-1 dans le sérum des patients atteints de mélanome est corrélée à une meilleure survie globale (148). Sa présence est impliquée dans l'immunogénicité anti-tumorale via l'induction d'une réponse immunitaire humorale avec production d'Ac spécifiques ciblant NY-ESO 1.
- L'expression du Ki67, marqueur de prolifération cellulaire et de l'EOMES (Eomesodermine), facteur de transcription impliqué dans la différenciation lymphocytaire T, a été étudiée (149). Le taux basal faible de LT CD8<sup>+</sup> Ki67<sup>+</sup>EOMES<sup>+</sup> est corrélé à la récurrence tumorale. La survenue d'effets secondaires immunologiques est liée au taux initialement bas de l'expression du Ki67<sup>+</sup>EOMES<sup>+</sup> sur les LT CD4<sup>+</sup> (150).
- Le CTLA-4 semble avoir un rôle dans l'homéostasie des lymphocytes T régulateurs (Treg) qui expriment cette molécule ainsi que le facteur de transcription Forkhead Box protein 3 (Foxp3). Chez l'Homme, l'ipilimumab entraînerait une modification des taux de Treg dans le sang et dans le microenvironnement tumoral. Certaines études associent leur augmentation à une évolution clinique péjorative (151), d'autres montrent une diminution de ces taux post-ipilimumab (152).

Le séquençage du génome de la tumeur peut permettre de définir un profil de néo-antigènes, véritable signature génétique de la tumeur prédisant la réponse T anti-tumorale (153,154). Le profil mutationnel des tumeurs par *Next-Generation Sequencing* (NGS) a permis de montrer que des tumeurs avec un fort taux de mutations correspondaient aux tumeurs avec un fort taux de réponse aux anti-CTLA-4 (155).

D'autres axes d'études sont en cours d'évaluation comme le microbiote intestinal qui fera l'objet d'un prochain chapitre.

### **3. Toxicités reliées à l'anti-CTLA-4**

Bien que ces nouvelles thérapies soient prometteuses, le blocage du CTLA-4 peut entraîner des désordres inflammatoires graves par rupture de la tolérance périphérique. Ces toxicités ont des profils cliniques bien loin de celles des toxicités reliées aux chimiothérapies et/ou aux thérapies ciblées. La prise en charge de ces dernières est bien connue et standardisée, alors que la gestion des nouvelles toxicités aux immunothérapies nommées « immune-related Adverse Events (irAE) » restent actuellement vague (156).

Dans les modèles précliniques, les souris CTLA-4<sup>-/-</sup> développent à la fois des syndromes lymphoprolifératifs et certains désordres auto-immuns (54,55). Aucun modèle murin n'a développé les mêmes irAE que ceux observés chez l'Homme traité par des anticorps anti-CTLA-4.

Les études cliniques ont montré une corrélation entre les irAE dermatologiques et coliques et la présence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> effecteurs au niveau de ces tissus (157).

Les taux de mortalité imputables aux irAE est faible de 0 à 2.1% (49,50). De plus, le taux d'irAE tout grade confondu est d'environ 70 % et entre 15 et 30% (49,50) pour les grades III et IV d'après les critères du Common Terminology Criteria for Adverse Events version 3.0 (NCI-CTCAE). Enfin, plusieurs études indiquent une probable association entre la présence et la sévérité des irAE et les bénéfices cliniques (158,159). Attia et al, ont observé que 36% des patients présentant des irAE de grade III ou IV avait une réponse clinique contre 5% chez les

patients n'ayant pas développé d'IrAE (160). Ces effets secondaires touchent préférentiellement le côlon, la peau, le foie, l'hypophyse, et plus rarement l'uvéïte, le pancréas, le système nerveux périphérique, les ganglions médiastinaux.

Le blocage de l'axe PD-1/PDL-1 induit également des IrAE, mais leur incidence est moins importante que pour l'anti-CTLA-4. Pour les IrAE grades III-IV, elles sont estimées autour de 15% sous anti-PD-1 et entre 22-25% sous Ac anti-CTLA-4 (161). Les IrAE induits par anti-PD-1/PDL-1 diffèrent de ceux induits par les Ac anti-CTLA-4. En particulier, les colites induites sont bien moins fréquentes et décrites sous Ac anti-PD-1 (< 5% des patients traités par l'anti-PD-1) (161). La combinaison d'Ac anti-CTLA-4 et d'Ac anti-PD-1 augmente le taux de réponse objective à 50% des patients atteints de mélanome métastatique (133), toutefois elle augmente également drastiquement l'incidence de survenue des IrAE de grades III-IV (environ 65% des patients) (133,161). La colite est particulièrement fréquente lors de cette combothérapie nécessitant l'interruption du traitement chez 25% des patients.

En résumé, les IrAE induits par l'Ac anti-CTLA-4 sont fréquents et peuvent être graves. Il convient de savoir les reconnaître précocement et d'adapter la prise en charge de ces malades, de façon pluridisciplinaire

#### **4. Cas particulier de la colite induite à l'anti-CTLA-4**

La colite est la plus fréquente des toxicités observées chez les malades traités par ipilimumab, et survient chez 21% d'entre eux (162). Elle peut être sévère, se compliquant dans de rares cas de perforation colique (de 0 à 6% selon les études) (50,162,163). La mortalité globale reliée aux colites induites à ipilimumab est inférieure à 1% (162).

Des données précliniques récentes suggèrent que le CTLA-4 pourrait jouer un rôle dans la prévention d'une inflammation colique. Le groupe de Fiona Powrie a montré que les cellules CTLA-4<sup>-/-</sup> sont équivalentes aux cellules de type sauvage dans l'induction thymique de Treg Foxp3<sup>+</sup> et leur maintien dans la rate et les ganglions lymphatiques mésentériques (164). En revanche, la différenciation des Treg dans la lamina propria colique est altérée. Les Treg du

système digestif sont différents des Treg issus du thymus (tTreg). En effet ils sont induits à la périphérie (pTreg) à partir des LT CD4<sup>+</sup> naïfs. Le CTLA-4 et le CD86 jouent un rôle crucial dans l'induction des Treg du système digestif (164). Coquerelle et al, montrent dans des modèles de colites que le blocage du CTLA-4 induit le développement de Treg exprimant ICOS sécréteurs d'IL-10 dans l'intestin. Il existe également une inhibition des réponses Th1 mémoires *in vivo* ayant ainsi un rôle immunosuppresseur et anti-inflammatoire (165). Ainsi le blocage de CTLA-4 avec un traitement par ipilimumab pourrait perturber l'homéostasie des Treg au niveau intestinal.

Peu d'études portant sur les mécanismes physiopathologiques des colites induites par l'ipilimumab ont été menées jusqu'à présent. Lord et al, ont observé l'expression du Foxp3<sup>+</sup> dans la lamina propria de 9 patients traités par ipilimumab pour mélanome métastatique ou cancer de la prostate et ayant une diarrhée. Ils ont pu montrer qu'il n'existait pas de diminution des Treg au niveau colique. La proportion de Foxp3<sup>+</sup> était corrélée à la densité en LT CD3<sup>+</sup> qui elle-même était augmentée par rapport aux patients n'ayant pas de diarrhée sous traitement par anti-CTLA-4 (166).

Plus récemment, plusieurs équipes ont décrits des tableaux cliniques des patients présentant des mutations germinales du gène du CTLA-4 (167–169). Ces patients présentaient des désordres auto-immuns notamment une inflammation intestinale et un déficit immunitaire (lymphopénie et hypogammaglobulinémie). Une augmentation de LT mémoires périphériques, une rupture de la balance LT effecteur/Treg et un infiltrat lymphocytaire majeur étaient observés dans les tissus inflammatoires.

Enfin, les colites induites par l'Ac anti-CTLA-4 présentent des similitudes avec les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) telles que des caractéristiques cliniques, endoscopiques, histologiques et/ou thérapeutiques. Parfois sévère, une corticothérapie systémique peut être nécessaire et parfois même, la mise en route d'Ac anti-TNF $\alpha$  théoriquement contre-indiquer en cas de cancer. Dans de tels cas, l'administration d'Ac anti-

CTLA-4 doit être impérativement interrompu, entraînant l'arrêt d'un traitement efficace chez ces malades atteints de mélanome avancé. Peu d'études ont caractérisé les réactions immunitaires intestinales au cours de ces colites induites.

De la même manière, peu de bio marqueurs ont été étudiés pour prédire la survenue de ces toxicités digestives qui sont un réel frein à l'utilisation de ces molécules. Une étude de transcriptomique du sang total décrit une augmentation du marqueur CD177 (marqueur d'activation des polynucléaires neutrophiles) après injection d'ipilimumab. Cette augmentation est corrélée aux événements indésirables gastrointestinaux (170). Berman et collaborateurs ont mesuré les taux de pANCA (perinuclear-staining Antineutrophil cytoplasmic antibody) OmpC (*E. coli*) et ASCA (Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody) chez les patients développant des irAE gastro-intestinaux sous ipilimumab. Ils montrent que 50% des patients avec des pANCA et OmpC positifs ont une toxicité digestive de grade I ou plus (171). Ces anticorps sont prédictifs de la survenue de MICI et d'une évolutivité plus sévère chez les malades (172). Il semble exister une corrélation entre la survenue de colite et la réponse anti-tumorale. Dans le mélanome métastatique et le cancer du rein, respectivement 36% et 35 % des patients ayant développés une colite avaient une réponse thérapeutique versus 11% et 2% chez ceux indemnes d'irAE ( $p=0.0065$  pour le mélanome ; et  $p=0.0016$  pour le cancer du rein) (162). La flore intestinale constitue un autre axe d'étude qui fera l'objet de nos résultats.

## **IV. Le microbiote intestinal et ses métabolites.**

Le microbiote intestinal humain est défini par l'ensemble des micro-organismes (archées, bactéries, levures et virus) colonisant le tractus digestif humain. Il s'intègre dans un large écosystème où demeurent environ  $10^{14}$  micro-organismes, soit 10 fois plus que le nombre total de cellules du corps humain. Les bactéries intestinales vivent en symbiose avec leur hôte et jouent un rôle majeur de manière directe ou indirecte via ses métabolites dans l'intégrité intestinale, la maturation du système immunitaire, le métabolisme des nutriments. Un déséquilibre du microbiote, appelé dysbiose peut être associé à des pathologies d'origines diverses telles que les maladies cardiovasculaires, l'obésité, le diabète, les cancers, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Nous discuterons dans ce chapitre la composition du microbiote intestinal chez le sujet sain, puis nous évoquerons les facteurs influençant l'équilibre du microbiote, les fonctions principales du microbiote et de ses métabolites en particulier sur le système immunitaire.

### **A. La composition du microbiote intestinal**

#### **1. La distribution des micro-organismes dans le tube digestif**

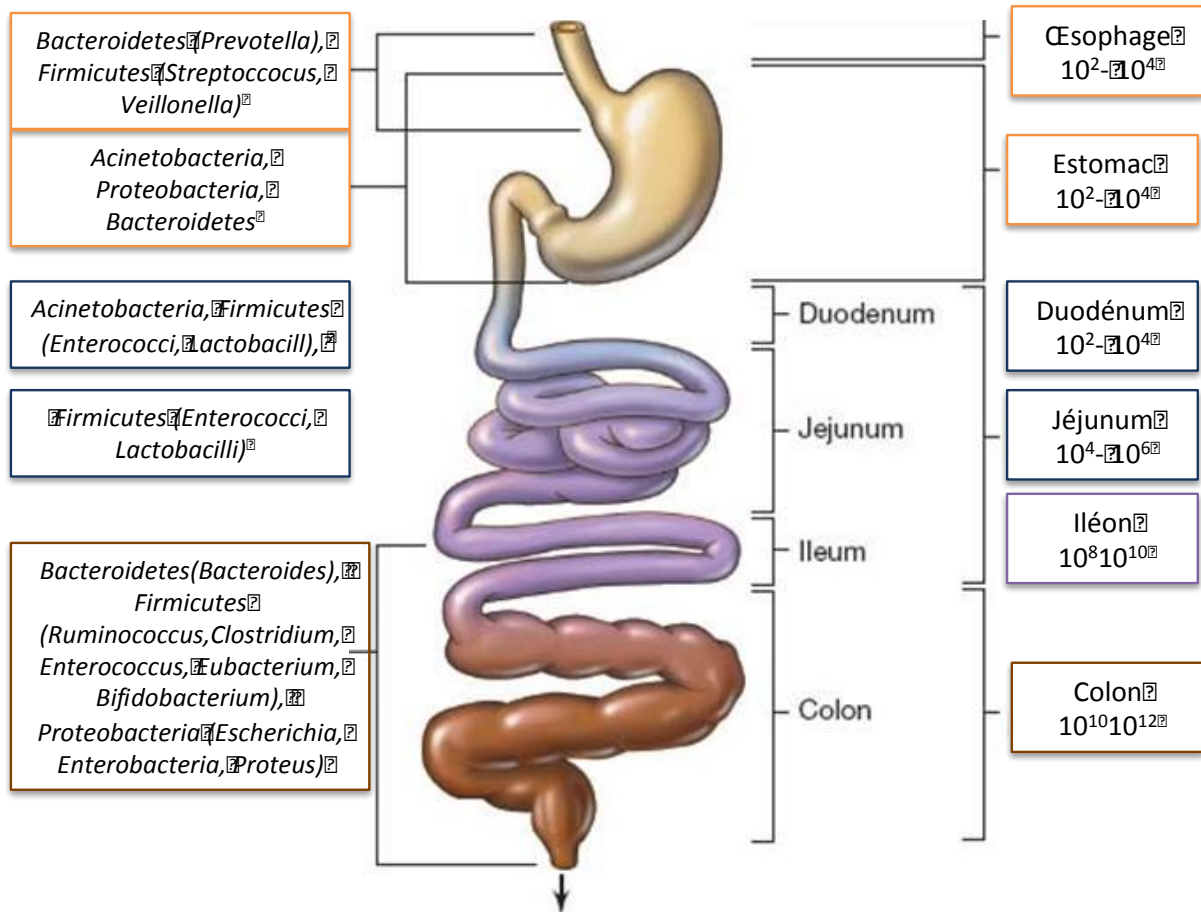
La distribution spatiale du microbiote s'étend selon 2 axes, longitudinal le long du tractus digestif (de la bouche au rectum), et radial de la lumière digestive à la surface des cellules épithéliales.

La densité bactérienne augmente tout au long du tractus digestif passant de  $10^2$ - $10^4$  bactéries par gramme de contenu digestif au niveau oeso-gastro-duodéal, à  $10^4$ - $10^8$  par gramme dans le jéjunum et l'iléon, atteignant  $10^{10}$ - $10^{12}$  par gramme dans le colon (Figure 9). Chez l'Homme, 95% du microbiote est représenté par 5 phyla bactériens : *Firmicutes* (on y trouve notamment les genres : *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*) ; *Bacteroidetes* (genres : *Bacteroides*, *Prevotella* et *Xylanibacter*) ; *Actinobacteria* (genres : *Collinsella* et *Bifidobacterium*) ; *Proteobacteria*



(genres : *Escherichia*, *Desulfovibrio*) ; *Verrucomicrobia* (genre : *Akkermansia*). L'œsophage contient essentiellement des micro-organismes dans sa portion distale avec une majorité de bactéries appartenant aux phyla *Firmicutes* (*Streptococcus* et *Veillonella*) et *Bacteroidetes* (*Prevotella*) (173). Les bactéries présentes dans l'estomac sont résistantes à pH acide, et appartiennent aux groupes *Proteobacteria*, *Acinetobacteria* et *Bacteroidetes* (genre : *Bacteroides*) (174). L'important péristaltisme de l'intestin grêle entraîne une faible densité bactérienne. Le microbiote résidant dans le duodénum et le jéjunum est proche de celui de l'estomac. On retrouve également des lactobacilles et des entérocoques appartenant au phylum *Firmicutes*. L'oxydoréduction dans l'iléon conduit à la présence de bactéries anaérobies strictes dans les portions terminales du grêle (175). Le microbiote associé à l'iléon est donc beaucoup plus diversifié et proche de celui du colon. Le colon est le site où la population bactérienne est la plus dense et diverse en raison de son pH neutre et du ralentissement du transit dans cette portion du tube digestif. Elle est largement représentée par les phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes*.

L'étude de la composition du microbiote intestinal dépend de la technique utilisée mais également de l'échantillon prélevé. En effet, l'analyse de la composition du microbiote intestinal se base essentiellement sur l'analyse du microbiote fécal. Certaines équipes ont pu montrer des différences entre la composition du microbiote fécal et celui associé à la muqueuse colique estimée à partir des biopsies (176,177). Il existe une proportion plus importante de bactéries aérobies-anaérobies associées aux muqueuses, absentes dans les selles. La quantité de bactéries anaérobies strictes dans les selles est similaire avec celle associée à la muqueuse colique.



**Figure 9: Distribution des microorganismes non-pathogènes fréquemment rencontrés chez l'adulte.** Modifié d'après *Biology of microorganisms, Brock, Pearson Eds (12ème édition, 2009)*

## 2. Les phyla majoritaires du microbiote intestinal

L'analyse en biologie moléculaire de l'ARN 16S bactérien dans les selles, a identifié 3 phyla majoritaires qui rassemblent le plus grand nombre de bactéries dominantes du tractus intestinal : *Firmicutes*, *Bacteroidetes* (représentent à eux deux > 90%) et *Actinobacteria* (<10%). Chaque phylum est divisé en classe, ordre, famille, genre et espèce.

### a) Le phylum des *Firmicutes*

Les *Firmicutes* sont des bactéries Gram positives subdivisées en 3 classes principales : les *Clostridia* (anaérobies), les *Bacilli* (aérobies) et les *Erysipelotrichi* (ou *Mollicutes*). Au niveau des selles, les *Clostridia* du groupe IV et XIVa sont les plus abondants. Parmi les *Clostridia* du groupe IV, on retrouve *Faecalibacterium prausnitzii* qui est l'espèce prédominante. Elle

possède la capacité de métaboliser les carbohydrates pour former du butyrate et du lactate. *Eubacterium* et *Roseburia* sont les genres les plus fréquents retrouvés dans le groupe XIVa des *Clostridia* (178,179).

b) Le phylum *Bacteroidetes*

Ce phylum est composé majoritairement de 3 classes de bactéries Gram négatifs: *Bacteroidia*, *Flavobacteria* et *Cytophaga*. Les plus représentées sont les *Bacteroidiales* (anaérobies) dont l'espèce *Bacteroides thetaiotaomicron* est connue pour ses fonctions d'absorption de nutriments et de maturation des cellules épithéliales (180).

c) Le phylum *Acinetobacteria*

Les *Acinetobacteria* sont des bactéries Gram positifs dont le genre le plus abondant retrouvé dans les selles est *Bifidobacterium*.

## **B. Développement et facteurs influençant le microbiote intestinal chez l'Homme**

### **1. Le microbiote intestinal au cours de la vie**

L'environnement du fœtus *in utero* a longtemps été considéré comme stérile. Récemment, la détection de bactéries dans le placenta de volontaires sains (181), dans le liquide amniotique de prématurés (182) et dans le méconium (183), semblent ouvrir un champs d'étude majeur sur le microbiote intestinal en période prénatale.

Le mode d'accouchement par voie basse ou par césarienne est reconnu comme modulant la colonisation du tractus digestif du nouveau-né. Les enfants nés par voie basse présentent un microbiote intestinal semblable à celui du microbiote vaginal (*Lactobacillus*) et intestinal (*Enterobacteria* et *Bifidobacterium*) de leur mère (184). Cette étude montre également que la composition du microbiote intestinal de l'enfant ressemble à celui d'un adulte dès lors que

l'allaitement maternel est arrêté (même si la diversification par une alimentation solide est déjà instaurée) (184). Chez l'enfant vers l'âge de deux ans, un équilibre des populations bactériennes intestinales est atteint, avec une biodiversité phylogénétique et fonctionnelle voisine de celle de l'adulte. L'augmentation rapide de la diversité bactérienne ralentit dès l'âge de 5-6 ans et reste plus faible chez les enfants par rapport aux adultes (185). En période de pré-adolescence (7 à 12 ans), le microbiote intestinal est enrichi en *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* et *Lachnospiraceae* en comparaison avec le microbiote adulte (186). Chez l'adulte, il existe une variabilité inter-individuelle forte concernant les espèces bactériennes présentes et leur proportions (187). Toutefois, les phylums majeurs et les capacités fonctionnelles du microbiote intestinal restent similaires entre les volontaires sains (188). Chez les personnes âgées, la composition du microbiote intestinal devient plus instable et moins diversifiée notamment en raison d'un affaiblissement des fonctions immunitaires (189).

## **2. Les facteurs influençant la composition du microbiote intestinal**

La composition du microbiote intestinal reste stable dans le temps. C'est équilibre appelé normobiose ou eubiose fait intervenir des phénomènes de résilience permettant de rétablir la diversité et la composition de la flore bactérienne après avoir été perturbée. L'altération de la diversité des espèces bactériennes appelée dysbiose avec une incapacité du système à se résilier est en lien avec certaines pathologies telles que les MICI, l'obésité, le diabète de type 2. Plusieurs facteurs sont connus pour influencer positivement ou négativement l'établissement et le maintien de cet écosystème agissant donc sur la santé de l'hôte.

### **a) Les facteurs génétiques**

Des études montrent que la composition du microbiote intestinal de jumeaux monozygotes sont similaires (190,191). A l'âge adulte, les jumeaux mono- et dizygotes présentent également un microbiote intestinal comparable, suggérant que les facteurs environnementaux influenceraient davantage le microbiote d'une même famille que les facteurs génétiques

(191). L'analyse plus récente d'espèces sous-dominantes, indique qu'il n'existe pas plus de similarité entre les microbiotes fécaux provenant de jumeaux monozygotes, génétiquement plus proches, que des dizygotes (187).

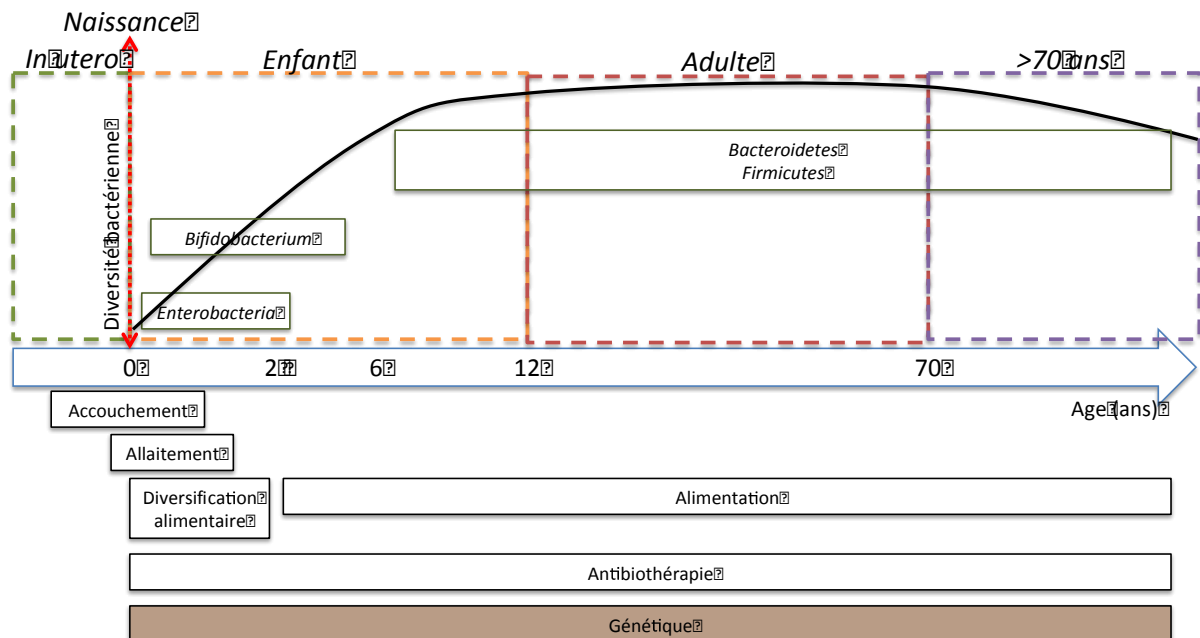
#### b) Les facteurs environnementaux

De nombreux facteurs exogènes interviennent dans la colonisation du tractus digestif et le maintien de la composition et de la diversité du microbiote intestinale, parmi lesquels on retrouve :

- Le mode d'accouchement : (décrit dans le chapitre précédent).
- Le terme de la naissance : les nouveau-nés prématurés présentent un retard dans la colonisation de leur tractus digestif et une diversité d'espèces bactériennes moindre par rapport aux enfants nés à terme (192). Ces différences seraient en rapport avec le mode d'accouchement des prématurés (préférentiellement par césarienne) et des soins médicaux lourds qu'ils nécessitent diminuant leur exposition aux microorganismes environnementaux.
- L'allaitement : la flore intestinale qui s'implante chez le nouveau-né allaité est plus stable que ceux nourris par du lait artificiel (193). L'allaitement maternel entraîne la prédominance du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacilli* alors que ce sont les *Bacteroides* et les *Enterococcus* qui prédominent lors de l'allaitement artificiel (194). Lors de la diversification alimentaire, le profil du microbiote intestinal du nouveau-né devient similaire à ceux nourris au lait artificiel.
- L'exposition à des microorganismes : la théorie "hygiéniste" suggère qu'une faible exposition à des microorganismes durant l'enfance favoriserait l'émergence d'allergies par défaut de mise en place des mécanismes de régulation du système immunitaire (195). Cela peut expliquer les différences observées entre des enfants nés dans les pays émergents par rapport aux pays industrialisés (196).

- Les traitements médicamenteux : l'antibiothérapie est le principal facteur extrinsèque entraînant une dysbiose. Les traitements à base d'antibiotiques réduisent la diversité du microbiote fécal des nouveau-nés et retardent la colonisation par des espèces, considérées comme ayant des effets bénéfiques, telles que les *Lactobacilli* et les *Bifidobacterium* (197–199).
- L'alimentation : chez l'Homme, des groupes homogènes de population ont été identifiés selon les espèces bactériennes prédominantes appelés entérotypes (*Bacteroides*, *Prevotella* et *Clostridiales*). Chaque entérotype semble être associé au régime alimentaire suivi à long terme. Un régime riche en graisses et protéines animales est retrouvé dans l'entérotype *Bacteroides* tandis qu'un régime riche en carbohydrates et fibres végétales favoriserait l'entérotype *Prevotella* (187,200,201).

Les différents facteurs influençant la stabilité de la composition du microbiote intestinal sont résumés dans la Figure 10.



**Figure 10: Principaux facteurs influençant le développement et la stabilité du microbiote intestinal humain au cours de la vie.**

## C. Les fonctions du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal a de multiples rôles physiologiques nécessaires à la santé de son hôte. Ces fonctions métaboliques, protectrices et immunologiques ont des actions à la fois au niveau local (au niveau digestif) mais également systémique (Figure 11). Le développement de modèles animaux sans flore intestinale ou axéniques et/ou avec un microbiote déterminé ou gnotoxéniques a permis d'identifier ces fonctions.

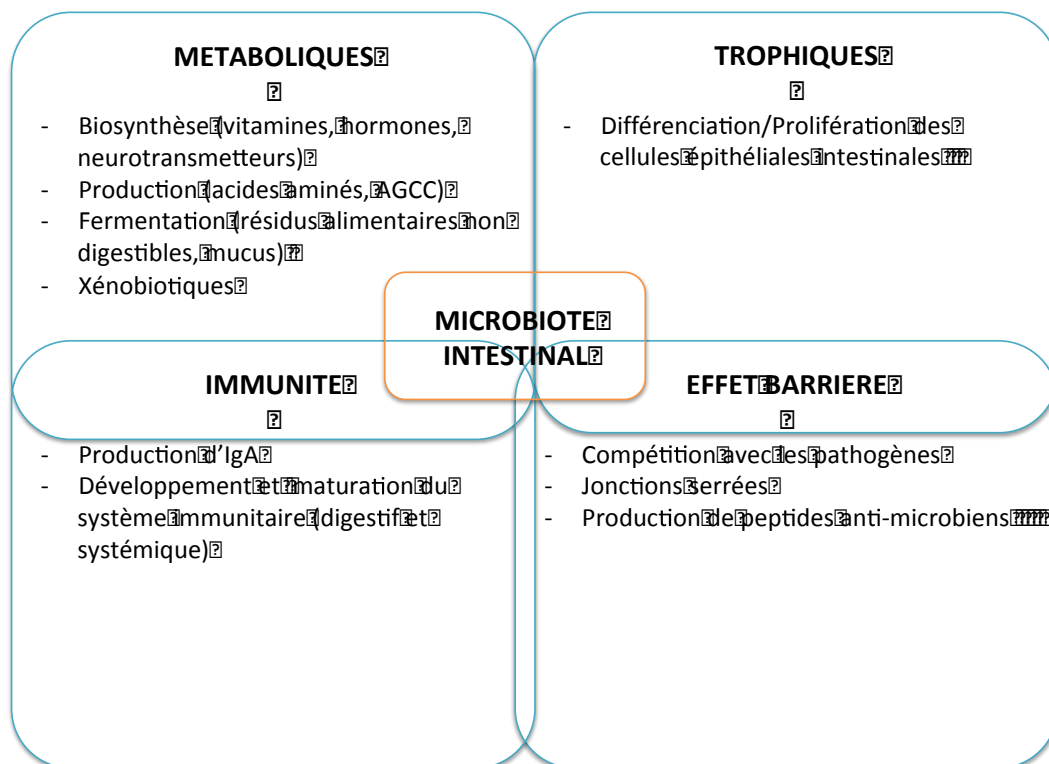


Figure 11: Principales fonctions du microbiote intestinal.

### 1. Fonctions trophiques sur l'épithélium digestif.

Le microbiote intestinal joue un rôle trophique prépondérant sur la muqueuse intestinale et particulièrement sur les cellules épithéliales qui la constituent. Chez les rats axéniques, on peut observer des cryptes atrophiées et leur nombre diminué en comparaison avec des rats sauvages (202). Il existe par ailleurs, une hypertrophie villositaire au niveau grêlique, très probablement en rapport avec des phénomènes compensatoires (202).

Le microbiote présente une action sur la motilité intestinale. Il existe chez les rats axéniques, un ralentissement et une réduction de la propagation des complexes moteurs migrants réversible après re-colonisation bactérienne (203). Cet effet serait en partie lié à un mécanisme impliquant le microbiote et les cellules entéro-endocrines sécrétrices du neuropeptide Y (204). L'angiogenèse intestinale est également en partie régulée par les bactéries commensales intestinales, ayant une action sur les cellules de Paneth (205). Plus récemment, une étude a montré que le microbiote pouvait activer les cellules endothéliales microvasculaires de l'intestin induisant la production de facteurs pro-angiogéniques (206).

## **2. Fonctions protectrices : effet barrière**

Les bactéries commensales s'opposent à la colonisation des bactéries pathogènes dans le tractus digestif. Trois mécanismes intriqués expliquant ce phénomène, ont été décrits. Tout d'abord, les bactéries commensales du microbiote entrent en compétition avec les pathogènes bloquant l'accès aux nutriments et aux sites d'adhérence aux cellules épithéliales (207). De plus, nombreuses bactéries du microbiote intestinales produisent des molécules bactériostatiques et bactéricides afin de stabiliser la composition de la flore. Ces molécules appelées bactériocines sont efficaces contre les pathogènes (208). Enfin, le microbiote stimule le système immunitaire inné et adaptatif pouvant ainsi protéger la barrière intestinale indirectement contre les bactéries pathogènes. Le rôle de la flore intestinale sur l'immunité sera décrit ultérieurement.

Le microbiote intestinal via la production d'acides gras à chaînes courtes (AGCC) tel que le butyrate peut avoir une action de renforcement des jonctions serrées (209,210).

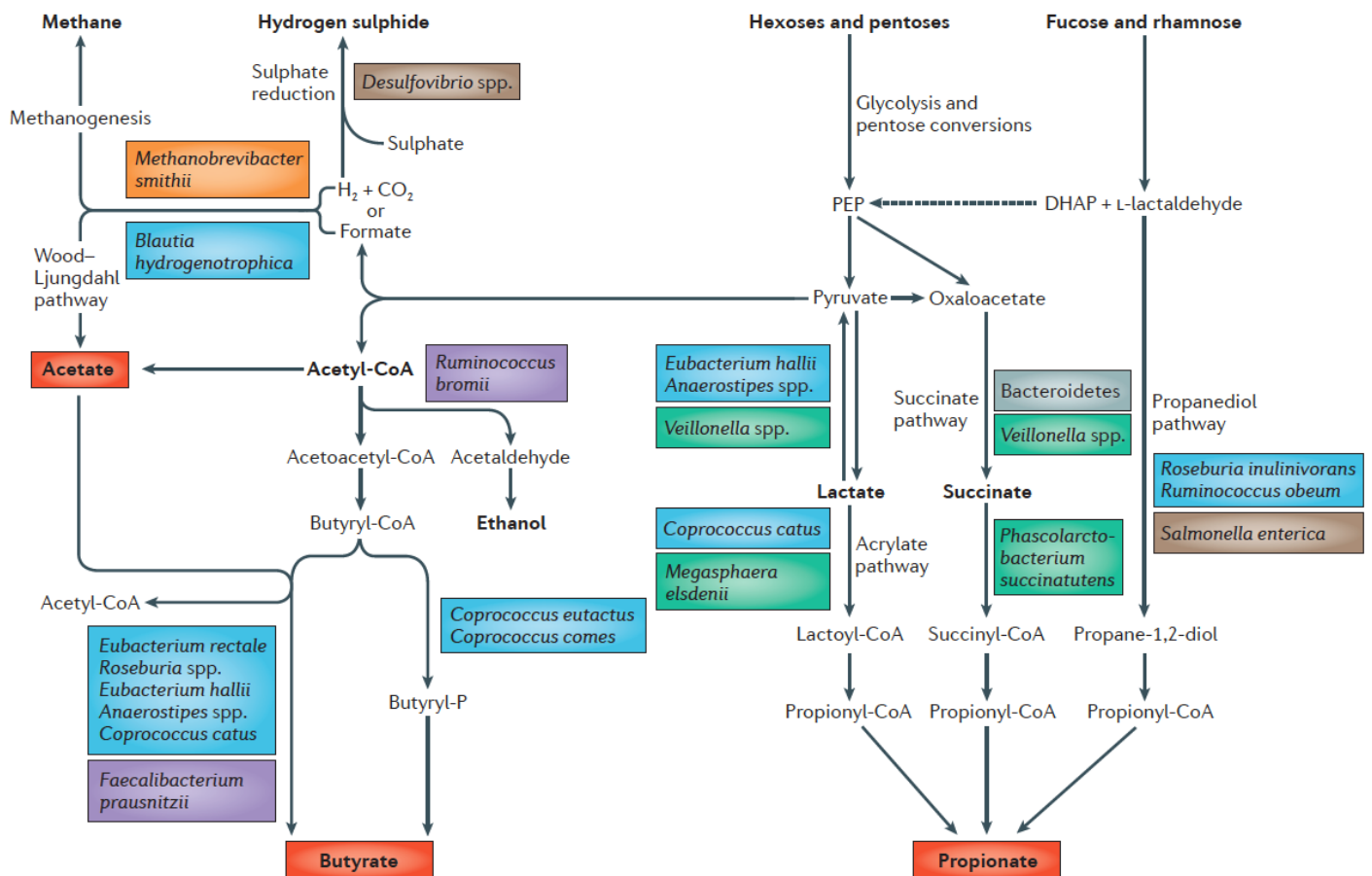
Enfin, l'effet barrière du microbiote intestinal implique la production de mucus recouvrant la muqueuse digestive. Ce mucus contient à la fois des mucines entre l'épithélium intestinal et les bactéries mais aussi des agents antibactériens (lysosymes, IgA soluble et défensines) produits par les cellules épithéliales (211). Le microbiote intestinal peut moduler la teneur en mucines du mucus de manière directe et indirecte via les cellules calciformes (212).



### 3. Les fonctions métaboliques

L'une des fonctions majeures du microbiote intestinale est de métaboliser ce que consomme l'hôte. Les nutriments sont essentiellement métabolisés au niveau grêle, les acides biliaires et la vitamine B12 au niveau iléal, l'eau et les électrolytes au niveau colique. La survie des bactéries dépend essentiellement des substrats alimentaires non digérés dans l'intestin grêle. Les produits ainsi générés par les bactéries sont pour l'hôte nécessaire à sa bonne santé. Bien que le microbiote intestinal ait un rôle avéré dans le métabolisme des lipides, des protéides et la synthèse vitaminique, nous nous sommes essentiellement intéressés aux produits issus du métabolisme glucidique qui sont connus pour moduler le système immunitaire. Nous développerons donc dans ce chapitre le métabolisme glucidique des bactéries commensales du tube digestif.

Les glucides complexes non digestibles sont essentiellement l'amidon et les polysaccharides végétaux (cellulose, pectines). L'hydrolyse et la fermentation de ces glucides sont les fonctions métaboliques prédominantes du microbiote intestinal aboutissant à la production de gaz intestinaux et de métabolites tels que les AGCC. La première étape est régit par l'hydrolyse des glucides complexes conduisant à des oligosaccharides, eux-mêmes fermentés en AGCC. Les trois AGCC les plus abondants dans les selles sont l'acétate, le propionate et le butyrate avec un ratio de 3:1:1 (213). L'acétate est produit par la plupart des bactéries commensales alors que le propionate et le butyrate par des bactéries plus spécifiques. *In vivo*, la production de butyrate dépend des bactéries productrices de butyrate telles que les *Clostridia* du cluster IV (représentés par *Faecalibacterium prausnitzii*) et les *Clostridia* du cluster XIVa (représentés par *Eubacterium rectale* /*Roseburia spp.*) du phylum des *Firmicutes* (179). Les voies métaboliques des carbohydrates ainsi que les bactéries qui en sont la source sont résumés dans la Figure 12.



**Figure 12: Fermentation des carbohydrates par les bactéries du microbiote intestinal.**

Des trois principaux AGCC (en rouge), l'acétate peut être produit à partir de nombreuses bactéries productrices de pyruvate via l'acétyl-Coenzyme A (Acetyl-CoA) et la voie de Wood-Ljungdahl. Le butyrate est formé à partir de 2 molécules d'acétyl-CoA par de nombreux *Firmicutes*. Dans la majorité des cas, le butyryl-CoA acetate CoA transférase catalyse la dernière étape enzymatique. La voie de production principale du propionate est la voie du succinate par les *Bacteroidetes*. Les voies lactate et succinate sont activées par certains *Firmicutes*. Deux autres voies métaboliques sont utilisées dans la production de propionate : la voie acrylate (utilisant le lactate) et la voie propanediol utilisant les deoxyhexoses (fucose et rhamnose).

Les espèces bactériennes correspondent à celles décrites dans des études sur cultures bactériennes et d'analyses métagénomiques et ne sont pas exhaustives.

Les *Archaea* (orange), *Bacteroidetes* (gris), *Lachnospiraceae* (*Firmicutes*, bleu), *Ruminococcaceae* (*Firmicutes*, violet), *Negativitus* (*Firmicutes*, vert) et *Proteobacteria* (marron). DHAP (dihydroxyacétonphosphate) ; PEP (phosphoenolpyruvate).

Extrait de Louis P, *Nat Rev Microbiol* 2014

Les AGCC ont des rôles différents et fondamentaux dans la santé de l'hôte. L'acétate qui est le plus abondant des AGCC retrouvé en systémique. C'est un métabolite essentiel dans la croissance bactérienne et joue un rôle dans le métabolisme du cholestérol et dans la lipogénèse au niveau hépatique (214). Le propionate est une source d'énergie pour les cellules épithéliales intestinales, mais peut également être présent au niveau systémique. Il intervient dans la gluconéogénèse au niveau intestinal et hépatique (215). Le butyrate est le métabolite le plus important pour la santé de l'hôte. Il représente la source énergétique principale des colonocytes. Il est largement consommé dans la lumière digestive et est retrouvé à de faibles concentrations dans la circulation systémique. Il peut diffuser de manière passive ou active par des transporteurs à travers les membranes plasmiques des colonocytes et des cellules immunitaires principalement (216). Son action sur les cellules de l'hôte peut également faire intervenir des récepteurs transmembranaires : les récepteurs couplés à une protéine G (GPR) sur lesquels se fixent les AGCC sont les GRP41, GRP43 et GRP109A spécifique au butyrate (216). Il présente également de nombreuses fonctions chez l'Homme tels que le renforcement de la barrière intestinale, une activité anti-inflammatoire ou anti-cancéreuse. Au niveau de l'épithélium intestinal, le butyrate stimule la sécrétion de mucines connu pour protéger la barrière intestinale de micro-organismes pathogènes (217). Comme décrit précédemment, le butyrate a également une action de renforcement des jonctions serrées. L'action anti-inflammatoire de ce métabolite au niveau de la muqueuse intestinale et systémique sera développée dans le prochain chapitre. L'étude du microbiote intestinal a permis de montrer que chez les patients atteints de cancer colorectal, des selles pauvres en bactéries du phylum des *Firmicutes* et riches en *Bacteroidetes* (218). De plus, un faible niveau de butyrate dans les selles est observé chez les patients atteints de cancer colorectal au stade avancé (219,220). Des travaux ont tenté d'expliquer s'il existait un lien entre le butyrate et le risque de développer un cancer colorectal. Le butyrate est un inhibiteur d'Histone Déacétylase (HDAC) ayant une action apoptotique sur les cellules tumorales (221–223). Les corps apoptotiques

entraînent une maturation des cellules présentatrices d'antigènes, capables de stimuler les réponses T spécifiques contre les cellules tumorales. L'action anti-tumorale du butyrate semble en partie liée à l'augmentation de l'immunogénicité tumorale (224,225). L'enrichissement du tube digestif par des bactéries productrices de butyrate pourrait limiter le développement de ce type de cancer.

#### **4. Fonctions sur l'immunité et l'inflammation**

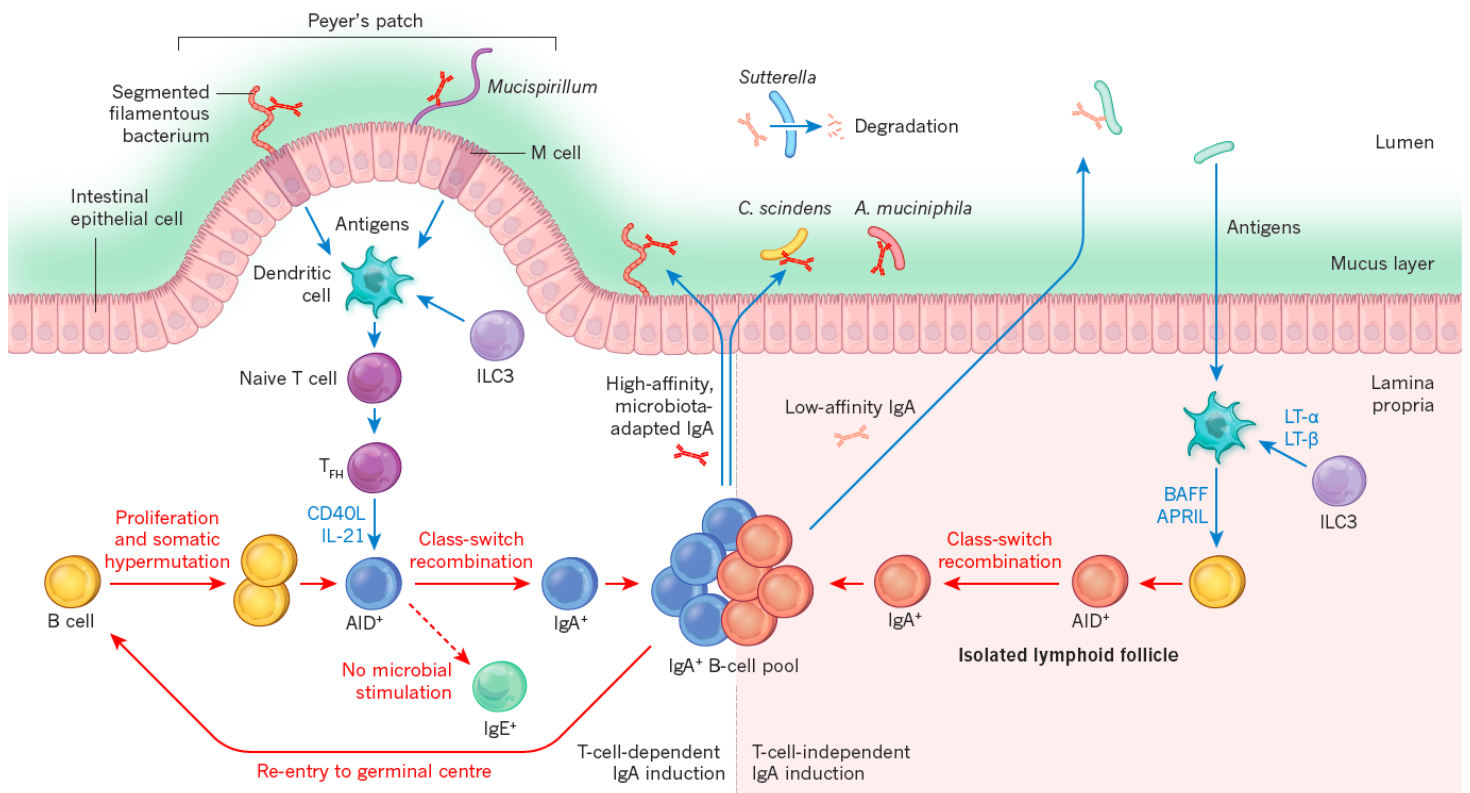
Durant les dernières années, le champ d'étude en immunologie a été révolutionné par la compréhension du rôle fondamental du microbiote intestinal sur l'induction, la maturation et la fonction du système immunitaire chez les mammifères. Le SI est modulé par le microbiote de manière complexe, lui permettant d'être à la fois tolérant vis-à-vis de ce dernier tout en reconnaissant les pathogènes à éliminer.

##### **a) Réponses immunitaires à la colonisation du tractus digestif**

A la naissance, le tractus digestif du nouveau-né est rapidement colonisé par des bactéries commensales. Les mécanismes par lesquels la muqueuse intestinale s'adapte à ces changements sont toujours en cours d'exploration mais certains arguments scientifiques sont connus.

Le colostrum et le lait maternel contiennent des micro-organismes, des métabolites, des IgA et des cellules immunitaires. La synergie de ces éléments permet une colonisation bactérienne harmonieuse et tolérée. L'interaction des IgA avec les métabolites nécessaires à la survie des bactéries et/ou les antigènes microbiens permet d'inhiber l'activation immunitaire et la liaison des bactéries aux cellules épithéliales intestinales (226). Une fois la colonisation bactérienne débutée, le nouveau-né met progressivement en place des réponses immunitaires et notamment la production et la sécrétion d'IgA dans la lumière digestive (227). La production d'IgA se fait de manière T-dépendante et indépendante (228,229) (Figure 13) et permet de

renforcer la barrière intestinale en empêchant le passage bactérien à travers l'épithélium (230).



**Figure 13: Production d'IgA dans la muqueuse intestinale.**

Production d'IgA T-dépendante (à gauche) se produit dans les plaques de Peyer dans lesquelles les cellules dendritiques (DC) se trouvent pour capturer les Ag bactériens transférer par les cellules M. Les DC induisent la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> en LT follicular helper (T<sub>FH</sub>). Le CD40 ligand (CD40L) et l'IL-21 produit par les T<sub>FH</sub> induisent l'expression de l'activation-induced déaminase (AID) dans le lymphocyte B (B cell) et la commutation de classe (class-switch recombinaison). La production d'IgA T-indépendante (à droite) a lieu dans la lamina propria et les follicule lymphoïdes isolés (ILFs), où des facteurs d'activation des lymphocytes B (BRAFF et APRIL) produits par les DC induisent l'expression de l'AID par le lymphocyte B. Innate Lymphoid cell 3 (ILC3s) exprimant RORγt est également impliqué par l'expression de lymphotoxin (LT)-α et LT-β qui activent les DC.

La voie T-indépendante produit des IgA de faible affinité mais directement dirigés contre le microbiote. La voie T-dépendante est activée par la colonisation de la surface épithéliale par des bactéries filamenteuses segmentées (SFB), *Mucispirillum*, *Clostridium scindens* et *Akkermansia muciniphila*. Le clone B produit par cette voie peut persister et ré-entrer dans le centre germinatif pour de nouvelles hypermutations somatiques et ainsi produire des IgA de haute affinité adapté à la variabilité de la composition du microbiote intestinal.

Extrait de Honda, Nature 2016

La capacité de tolérer la colonisation bactérienne est également en partie liée à l'immaturité du SI du nouveau-né. On peut en effet observer une production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que le développement des lymphocytes B et T donc l'activation paraît sous-optimal (231). La conséquence étant une susceptibilité accrue aux infections.

Les réponses immunitaires sont médiées par la reconnaissance du microbiote intestinal par l'hôte via les microbial-associated molecular patterns (MAMPs). Alors qu'en période néonatale, les cellules immunitaires expriment des récepteurs Toll-like récepteurs (TLR), la réponse du système immunitaire reste distincte de chez l'adulte. Il existe un déficit de production de médiateurs pro-inflammatoires au profit de médiateurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10 (232). Ce phénomène est en partie lié au microbiote lui-même. Il semble également que l'interaction du LPS (lipopolysaccharide) avec son ligand, le TLR4 n'entraîne pas d'activation immunitaire au niveau intestinal. En post-natal immédiat, il existe une activation spontanée des cellules épithéliales intestinales en réponse aux endotoxines entraînant une diminution de IL-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK-1) conduisant à l'inhibition du signal TLR4 (233,234). Ce mécanisme de tolérance du système immunitaire au niveau digestif a été étudié uniquement dans des modèles précliniques.

Enfin, la colonisation bactérienne du tractus digestif contribue au développement de structures lymphoïdes secondaires. Dans les modèles axéniques, il existe une hypoplasie des plaques de Peyer, une réduction du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et de plasmocytes produisant des IgA (230,235,236). De la même manière, il existe une atteinte à distance de la muqueuse intestinale avec une réduction de la taille et du nombre de cellules présentes dans les ganglions mésentériques (MLN) (237).

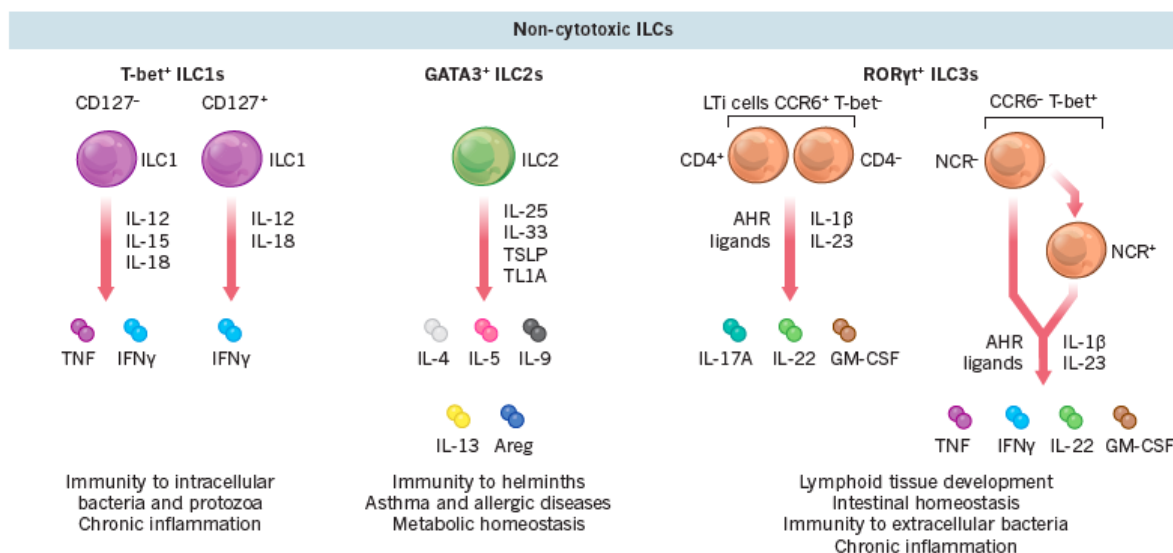
De nombreuses études ont été réalisées sur des modèles axéniques permettant de mettre en évidence les effets de la flore sur le système immunitaire inné et adaptatif que nous évoquerons dans les 2 prochaines sections.

## b) Rôle du microbiote intestinal sur l'immunité innée

L'étude des cellules présentatrices d'antigènes a pu montrer que chez les souris axéniques ou *germ-free*, il existe à leur naissance un nombre réduit de macrophages et de cellules dendritiques dans la muqueuse comparativement aux souris conventionnelles (238). Concernant les cellules dendritiques, ce déficit est exclusivement retrouvé au niveau intestinal. Les cellules dendritiques situées dans les ganglions mésentériques et la rate restent à des niveaux similaires entre les souris *germ-free* et les souris conventionnelles. De la même façon, aucune différence n'a été observée sur certains marqueurs d'activation comme les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH-II) et la molécule de co-stimulation CD86 ou la prolifération des lymphocytes T (239).

Les cellules présentatrices d'antigènes peuvent présenter des phénotypes tolérogènes pour les bactéries commensales. Cependant, elles doivent reconnaître les pathogènes. Afin de pouvoir reconnaître les pathogènes sans pour autant activer le système immunitaire contre les bactéries commensales, les cellules présentatrices d'antigènes de la lamina propria peuvent exprimer de manière sélective le TLR5 (reconnaissance la flagelline des bactéries flagellées) et pas le TLR4 (reconnaissance le LPS des bactéries gram négative), permettant de produire des cytokines pro-inflammatoires (IL-6) en réponse à une bactérie flagellée (240).

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) se développent habituellement en l'absence de microbiote intestinal, mais leur maturation semble dépendre de signaux bactériens (242–244). La famille des ILC sont réparties en ILC cytotoxiques (cellules Natural killer, NK) et ILC non cytotoxiques. Ces ILC présentent un phénotype lymphocytaire mais n'ont pas de récepteurs spécifiques aux antigènes comparativement aux lymphocytes B et T. Les ILC non cytotoxiques sont réparties en 3 groupes en fonction de l'expression de molécules de surface, de facteurs de transcription et de leur profil sécrétoire; ILC1, ILC2 et ILC3 (Figure 14) (244).

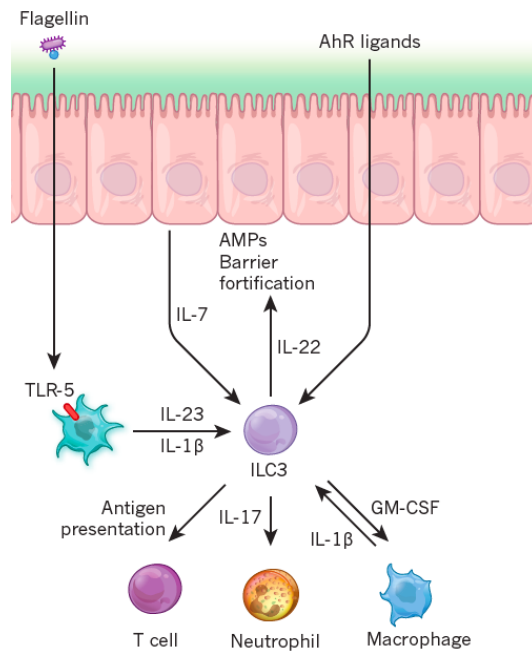


**Figure 14: Familles des cellules lymphoïdes innées (ILC) non cytotoxiques chez la souris.**

Les ILC peuvent être activées par différents stimuli tels que les neuropeptides, les hormones, les cytokines, et sont impliqués dans l'homéostasie des réponses immunitaires au niveau tissulaire. AHR, aryl hydrocarbon receptor; Areg, amphiregulin; GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor; IFN $\gamma$ , interféron- $\gamma$ ; IL, interleukin; LTi, lymphoid tissue inducer; NCR, natural cytotoxicity receptor; NK, natural killer; TNF, tumour necrosis factor; TSLP, thymic stromal lymphopoietin. *Extrait de Artis, Nature 2015*

De nombreuses études montrent un lien entre les ILC3 et le microbiote (Figure 15). En fonction du stimulus, l'ILC3 peut produire de l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-22, le granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ou le TNF. Il a plusieurs fonctions telles que l'immunité anti-bactérienne, l'inflammation chronique ou la réparation tissulaire (244). L'absence d'ILC3 entraîne un passage systémique des bactéries commensales associée à une inflammation systémique prévenue par l'apport d'IL-22 (245). La présentation d'Ag bactériens par les ILC3 limite la réponse T spécifiques à une bactérie commensale (246). Comme nous l'avons évoqué précédemment, les ILC jouent également un rôle dans la production d'IgA. Les bactéries flagellées reconnues par les cellules présentatrices d'antigènes exprimant le CD103<sup>+</sup> sécrètent de l'IL-23 nécessaires à la production d'IL-22 par l'ILC3 (247). L'IL-22 permet à la fois un renforcement de la barrière intestinale et une production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales intestinales.





**Figure 15: ILC3 et microbiote intestinal.**

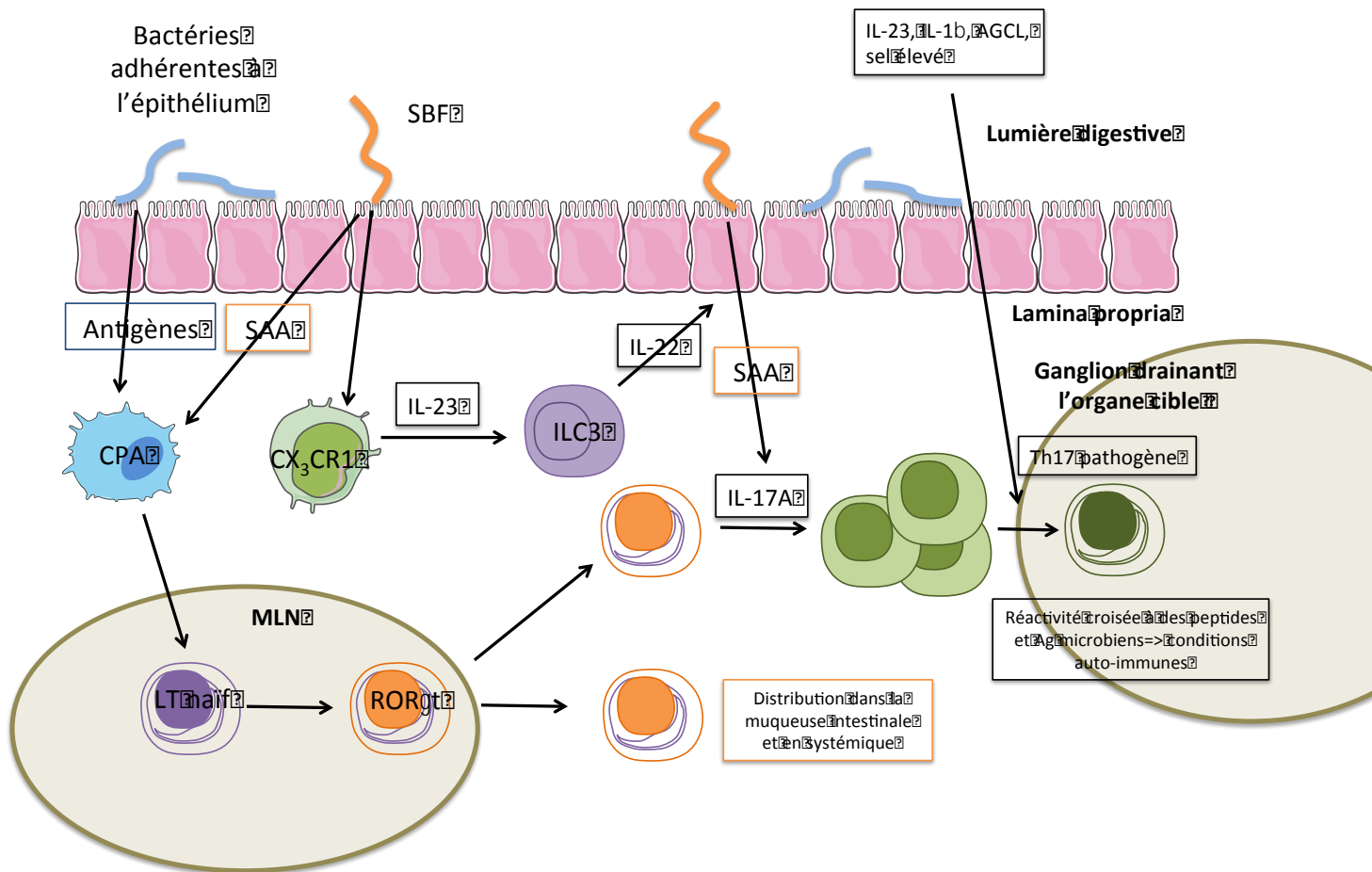
Les ILC communiquent avec le microbiote intestinal via les cytokines, les microbial-associated molecular patterns (MAMPs) et les peptides anti-microbiens. Les ILC3 interagissent avec les cellules de l'immunité innée et adaptative. Elles sécrètent de l'IL-22 qui induit des peptides antimicrobiens (AMPs) et renforce la barrière intestinale. Elles recrutent les neutrophiles et les macrophages via la sécrétion d'IL-17 et de GM-CSF respectivement. AhR : aryl hydrocarbon receptor. *Extrait de Thaïss, Nature 2016*

c) Le rôle du microbiote intestinal sur l'immunité adaptative

L'influence de la flore intestinale sur les lymphocytes B a été évoquée précédemment (Figure 13), nous nous intéresserons dans ce chapitre aux lymphocytes T, en particulier les Th17 et les Treg.

La différenciation des cellules Th17 est caractérisée par l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ t et nécessite du TGF- $\beta$  et de l'IL-6 ou de l'IL-21 pour se différencier en Th17 à partir de LT naïfs, et d'IL-23 pour leur maturation et leur survie (248). Leur signature cytokinique comprend l'IL-17A, IL-17F et l'IL-22 qui stimulent la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales intestinales et la formation de jonctions serrées (249). Les Th17 se situent au niveau de la lamina propria et constituent 30 à 40% des LT CD4<sup>+</sup> mémoires. Ils ont un rôle indiscutable dans la prévention d'infections bactériennes et

fungiques. Chez l'Homme, un déficit génétique dans l'axe IL-17–IL-17 récepteur ou dans l'expression du ROR $\gamma$ t est associé à une susceptibilité accrue aux candidoses digestives (250,251). Les Th17 ont également un rôle majeur dans l'inflammation en particulier lors d'une stimulation par l'IL-23 (252), où les Th17 sécrètent également de l'interféron(IFN)- $\gamma$  et le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) majorant l'inflammation (253–255). Ces cellules Th1/Th17 sont nommées Th17 pathogènes et sont impliqués dans l'auto-immunité (256). Dans les souris *germ-free*, les Th17 sont rares dans la lamina propria (257), cependant le nombre de Th17 varie largement entre les animaleries. La colonisation du tube digestif par les bactéries filamenteuses segmentées (SFB) adhérentes induisent des Th17 (258) et induisent la protéine Sérum Amyloïde A (SAA) dans les cellules épithéliales. De plus, les SFB activent l'ILC3 via l'IL-23 pour produire de l'IL-22. L'expression de la SAA dans les cellules épithéliales dépend ainsi de l'adhérence des SFB à l'épithélium intestinal et de la l'activation du récepteur de l'IL-22 (258,259). La polarisation des Th17 dépend des monocytes exprimant le récepteur aux chémokines CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> (260). Ces cellules peuvent répondre à une stimulation par la SAA en produisant des cytokines activatrices des ILC3 impliquer dans la différenciation Th17 (258). Les mécanismes évoqués sont résumés dans la (Figure 16).

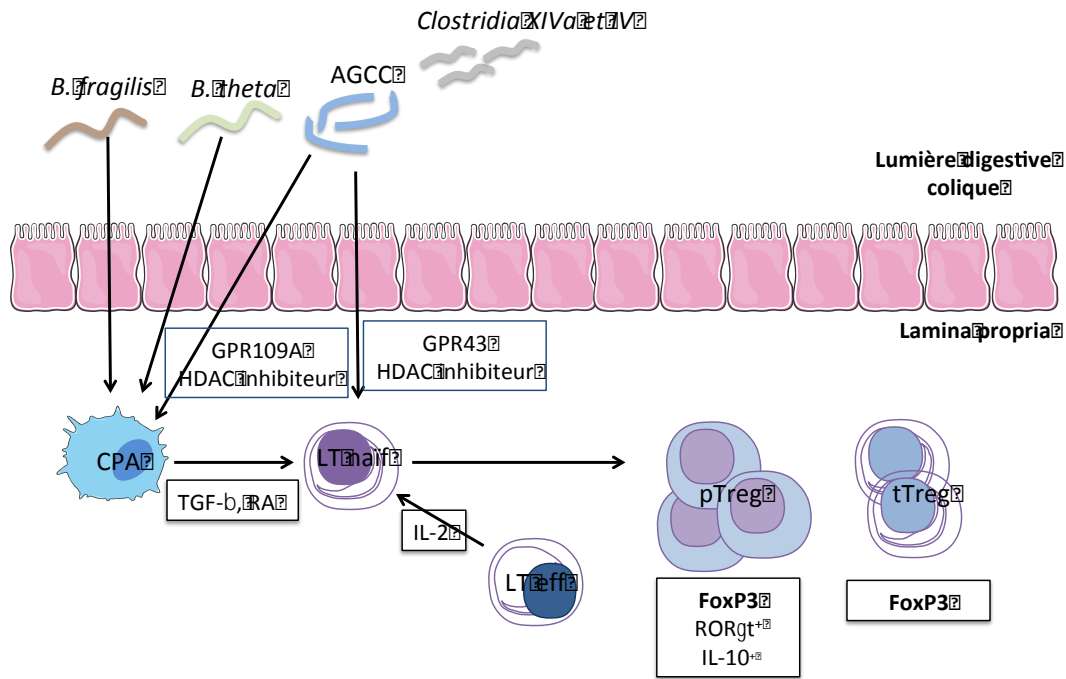


**Figure 16: Induction de Th17 par le microbiote intestinal.**

Les bactéries adhérentes à l'épithélium initient la différenciation des LT naïfs en LT exprimant ROR $\gamma$ t (Th17) dans les ganglions mésentériques (MLN) via des CPA. Les Th17 peuvent s'accumuler et se différencier en Th17 sécrétant de l'IL-17 (en vert) dans la lamina propria de l'intestin grêle. L'adhésion de bactéries filamenteuses segmentées (SBF) induit une production de Sérums Amyloïde A (SAA) par les cellules épithéliales. La SAA module les cellules exprimant le CX<sub>3</sub>CR1 afin qu'elles produisent de l'IL-23, qui stimule la sécrétion d'IL-22 par les ILC3. La SAA peut également favoriser/augmenter la sécrétion d'IL-17A produit par les Th17. L'IL-23, l'IL-1 $\beta$ , les concentrations élevées en sel et les acides gras à chaînes longues (AGCL) peuvent induire des Th17 pathogènes. Les Th17 pathogènes migrent vers les ganglions drainant les organes cibles où ils contribuent à l'auto-immunité du fait d'une la réactivité croisée entre certains peptides microbiens et des auto-antigènes. *Modifié d'après Honda, Nature 2016*

Les Treg exprimant le facteur de transcription FoxP3 sont retrouvés en large proportion dans la lamina propria de l'intestin et joue un rôle de maintien de la tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal. Ils ont également une fonction suppressive empêchant des réponses inflammatoires excessives médiées par les LT effecteurs. L'intestin contient à la fois des Treg thymiques ou naturels se développant l'influence de pression de sélection, et périphériques à partir notamment de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs. Chez la souris, il a été montré que les Treg périphériques sont largement présents dans le colon et expriment à la fois le FoxP3 et le ROR $\gamma$ t (261,262). Dans les souris *germ-free*, il n'y a pas de Treg périphériques, suggérant que

c'est le microbiote intestinal a un rôle dans leur différenciation. Les Treg périphériques sécrètent de l'IL-10 qui est une cytokine majeure de l'immuno-régulation permettant de maintenir une tolérance immunitaire au niveau digestif. L'IL-10 sécrétée par les Treg est essentielle pour la suppression des réponses pro-inflammatoires induites par les cellules myéloïdes, les  $LT\gamma\delta$  et les Th17 pathogènes (263–265). Les Treg périphériques expriment également plus fortement le CTLA-4 que les Treg thymiques (261). L'inactivation du ROR $\gamma$ t spécifiquement dans les Treg exprimant FoxP3 conduit à une inflammation de type Th2 ou l'expansion de LT Th17 (261,262). La colonisation du tube digestif de souris *germ-free* par des *Clostridia* des clusters IV, XIVa et XVIII entraînent une forte accumulation de Treg dans le colon, préférentiellement des Treg exprimant ROR $\gamma$ t (266,267). Les souches de *Clostridia* augmentent également l'expression d'IL-10 et du CTLA-4 sur les Treg coliques, et entraîne une résistance au développement de colites induites. D'autres bactéries commensales ont montré une induction de Treg dans des modèles animaux tels que le *Lactobacillus reuteri* et le *Lactobacillus murinus* (268,269). Des souches de *Bacteroides* ont également montré leur rôle dans l'immunorégulation. *Bacteroides fragilis* augmente la production d'IL-10 par les Treg dans le colon grâce au polysaccharide A issu de la capsule bactérienne. Lorsque le polysaccharide A est relargué par *Bacteroides fragilis*, il peut activer les cellules dendritiques via le TLR-2 stimulant leur production d'IL-10, induisant des Treg sécrétrices d'IL-10 (270). L'induction de Treg semble être un mécanisme crucial dans le maintien de l'homéostasie digestive et de la relation hôte-bactérie. Les mécanismes évoqués sont résumés dans la (Figure 16).



**Figure 17: Influence du microbiote intestinal sur les Treg.**

Les LT exprimant le FoxP3 sont représentés par les Treg exprimant le ROR $\gamma$ t mais pas la Neuropilin-1 (Nrp1) induit en périphérie (pTreg) et les Treg générés dans le thymus (tTreg). Les DC produisent des médiateurs permettant la différenciation en pTreg, tels que le TGF- $\beta$  et l'acide rétinolique (RA). Les AGCC contribuent à l'induction de pTreg via le GPR109A des DC, induisant la production d'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) qui métabolise la vitamine A. Les AGCC entrent dans les DC et exercent un effet HDAC inhibiteur entraînant la suppression des cytokines pro-inflammatoires. Les AGCC ont également une action directe sur les LT naïfs via le GPR43 ou l'induction de FoxP3 via l'inhibition d'HDAC. L'IL-2 provenant des LT effecteurs aide à stabiliser la différenciation en Treg. *Modifié d'après Honda, Nature 2016*

#### d) Rôle des AGCC sur l'immunité

Nous avons discuté du rôle direct des bactéries sur la modulation du système immunitaire intestinal mais de nombreux travaux ont étudié l'action indirecte de la flore intestinale via leur métabolite sur le SI localement et au niveau systémique. Dans ce chapitre, nous décrirons les principales fonctions des AGCC sur l'immunité, en particulier le butyrate et son action sur l'inflammation colique qui a fait l'objet d'un grand nombre d'études.

L'effet des AGCC sur les cellules immunitaires peut être médié par les récepteurs GPR. La majorité des récepteurs aux AGCC comprennent les GPR41 et GPR43 qui sont tous les deux exprimés à la surface des cellules immunitaires (271,272). GPR43 est exprimé de manière

importante sur les neutrophiles et à moindre niveau sur les monocytes. Le GPR41 est exprimés à la surface des monocytes et des cellules dendritiques mais pas sur les neutrophiles. Le GPR41 et le GPR43 sont préférentiellement activés par le propionate puis le butyrate et l'acétate. Le déficit en GPR43 entraîne une exacerbation de l'inflammation dans des modèles de colites. De plus, les souris *germ-free* avec peu ou pas d'AGCC ont également le même statut inflammatoire que les souris déficientes en GRP43 (273). Par ailleurs, le GPR109A interagit uniquement avec le butyrate et à un rôle immunosuppresseur puisqu'il induit la différenciation Treg et la production d'IL-10 (222). L'interaction du butyrate avec son récepteur spécifique a également montré un rôle dans l'apoptose indépendante de son action HDAC inhibiteur (274). Ces observations montrent l'effet anti-inflammatoire des SCFA via leurs récepteurs GPR.

L'impact du butyrate a été étudié sur les monocytes humains. *In vitro*, la présence de butyrate inhibe l'expression d'ICAM-1 ainsi que le CD86 sur les monocytes. Il en résulte une baisse de l'activation lymphocytaire T sécrétant de l'IFN $\gamma$  (275). La même équipe a montré qu'en stimulant *in vitro* des monocytes humains avec du *Staphylocoque aureus* en présence de butyrate, l'IL-12 est inhibée au profit de l'IL-10. La stimulation des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) par un anticorps anti-CD3 en présence de butyrate diminue la sécrétion d'IL-2 et d'IFN $\gamma$  et induit la production d'IL-10 et d'IL-4 (276). Cet effet a également été montré sur les cellules dendritiques (277–279). *In vitro*, la culture des DC avec de l'acide rétinoïque associé ou à du butyrate induit un phénotype muqueux aux DC qui expriment plus de CD103 et de marqueurs de domiciliation intestinale ( $\alpha 4\beta 7$ ) (280). Dans ce même travail, il existe une diminution des capacités d'activation des LT CD4<sup>+</sup> par le butyrate (280). Plus récemment, une étude réalisée sur des macrophages activés par du LPS montre une diminution de la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'oxyde nitrique, l'IL-6 et l'IL-12 par inhibition d'HDAC en présence de butyrate (281).

Les AGCC ont montré leur importance dans la régulation des Treg coliques chez la souris. Le butyrate et le propionate induisent une différenciation T en faveur des régulateurs. De plus, les AGCC (butyrate > propionate) augmentent la taille et la fonction de sécrétion d'IL-10 des Treg induits (282,283). La différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs se fait préférentiellement vers les Treg périphérique via l'effet inhibiteur HDAC (284).

Enfin, le butyrate a un rôle dans l'anergie T par mécanisme d'inhibition HDAC (285,286).

Tous ces travaux montrent l'importance de ces métabolites dans la tolérance immunologique au niveau de la muqueuse intestinale mais également en périphérie. Ils ont essentiellement une action anti-inflammatoire et immunorégulatrice.

#### **D. Microbiote intestinal et maladie de Crohn : cause ou conséquence ?**

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comprennent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique caractérisées par une inflammation chronique de l'intestin. Ces pathologies sont multifactorielles impliquant des prédispositions génétiques, des facteurs environnementaux tels que l'alimentation, la prise d'antibiotiques et le niveau socio-économique. Le rôle du microbiote intestinal dans leur physiopathologie est débattu. En effet, l'existence d'une dysbiose chez ces patients a bien été démontrée mais savoir si cette dysbiose est la cause du développement de l'inflammation ou sa conséquence reste controversée.

De nombreuses études montrent des différences dans la composition du microbiote entre les patients atteints de MICI et les volontaires sains en particulier la réduction de sa diversité et de son abondance. Le phylum des *Firmicutes* en particulier *Faecalibacterium prausnitzii* a une proportion diminuée dans les selles des patients ayant une maladie de Crohn (287–289). Les études du microbiote associé aux muqueuses (sur biopsies coliques) font discuter le rôle protecteur et anti-inflammatoire de *Faecalibacterium prausnitzii* (290,291).

Les études de cohortes pédiatriques ont tenté d'établir une notion temporelle entre la dysbiose et l'inflammation. Deux études ont montré l'existence d'une dysbiose chez les enfants atteints de maladie de Crohn nouvellement diagnostiqués et naïfs de tout traitement (292,293). Ces études suggèrent que le déséquilibre du microbiote est présent précocement dans la maladie et pourrait signer son début.

En dehors des études concernant la dysbiose, des travaux ont mis en évidence des bactéries commensales qui sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux s'avèrent être des germes pathogènes appelés pathobions entraînant une inflammation chronique intestinale. *Escherichia coli* adhérent-invasifs (AIEC) sont associés à la muqueuse iléale des patients atteints de maladie de Crohn (294) et assimilés à des pathobions en raison de leur capacité de réplication au sein des cellules épithéliales intestinales (295).

Ces travaux montrent un lien évident entre la flore intestinale et la maladie de Crohn. Cependant, l'inflammation intestinale peut engendrer une dysbiose tout comme l'inverse et nécessite de poursuivre les recherches afin de pouvoir développer de nouvelles stratégies thérapeutiques à visée préventive ou curative.

### **E. Microbiote et réponse clinique aux traitements anti-cancéreux.**

Comme nous l'avons décrit précédemment, le microbiote intestinal joue un rôle important sur la maturation et la modulation du système immunitaire au niveau digestif mais également au niveau systémique. En partant de ce constat, l'impact du microbiote intestinal sur l'efficacité thérapeutique des traitements anti-cancéreux a fait l'objet de plusieurs publications durant les dernières années.

L'interaction directe des bactéries commensales sur l'efficacité des chimiothérapies dans des lignées cellulaires (Lewis Lung Carcinoma, 4T1, CT26) a été récemment étudiée. Les auteurs montrent *in vitro*, que certaines bactéries peuvent moduler l'efficacité de certains anti-métabolites (gemcitabine, fludarabine, cladribine et CB1954) en modifiant la structure de la molécule (296). La capacité d'*E. coli* à inhiber l'effet anti-tumoral de la gemcitabine ou à



améliorer celle du CB1954 a été confirmée *in vivo* par ces auteurs. Ces résultats suggèrent l'existence d'interactions complexes entre la flore intestinale et les traitements de chimiothérapie. Les mécanismes expliquant ses interactions ont été étudiés de manière plus approfondie dans des modèles précliniques traités par des sels de platines ou du cyclophosphamide. L'effet anti-tumoral des sels de platines (oxaliplatine et cisplatine) sur des tumeurs implantées en sous-cutanée dans des souris *germ-free* ou traitées par antibiothérapie large spectre, est dramatiquement diminué (297). L'oxaliplatine perd sa capacité à inhiber la réplication des cellules tumorales en l'absence de microbiote chez les souris (297). Les auteurs montrent que l'absence de flore commensale prévient la production de reactive oxygen species (ROS) par les cellules myéloïdes infiltrant la tumeur, nécessaire à l'effet anti-tumorale des sels de platines. L'adjonction de *Lactobacillus acidophilus* permet une restauration de l'efficacité anti-tumorale des sels de platines via la stimulation des cellules myéloïdes infiltrant la tumeur à produire du ROS (297). Viaud et al s'est intéressée à une autre molécule de chimiothérapie, le cyclophosphamide, connu pour induire la mort immunogène. En effet, certaines molécules de chimiothérapie peuvent induire une apoptose de la cellule tumorale créant des corps apoptotiques immunogènes, activant ainsi les cellules présentatrices d'antigènes en vue d'une réponse adaptative spécifique dirigées contre la tumeur (298). Viaud et al ont observé que le cyclophosphamide entraîne une altération de la composition du microbiote intestinal ainsi que de la barrière épithéliale, induisant une translocation bactérienne dans les ganglions mésentériques (299). Le cyclophosphamide induit une dysbiose avec un enrichissement en bactéries Gram positif tel que *Enterococcus hirae*. Ces bactéries augmentent le ratio CD8<sup>+</sup>/Treg et activent les lymphocytes Th17 pathogènes et les réponses mémoires Th1 dans la rate des souris traitées par le cyclophosphamide (299–301). Dans ce travail, les réponses Th17 pathogènes sont diminuées chez les souris *germ-free* comparativement aux souris conventionnelles. De plus, une autre espèce bactérienne identifiée, *Barnesiella intestinihominis* s'accumule dans le colon et induit

l'accumulation de cellules T $\gamma\delta$  productrices d'IFN $\gamma$  dans les tumeurs de souris traitées par le cyclophosphamide (300). La présence de lymphocytes Th1 spécifiques de *E. hirae* et de *B. intestinihominis* est associée à un meilleur pronostic chez les patients atteints de cancer bronchique et l'ovaire et traités par chimiothérapie. Toutes ces données suggèrent l'existence d'un lien entre microbiote intestinal, le système immunitaire et efficacité anti-tumorale de certaines chimiothérapies en particulier celles ayant la capacité d'induire la mort immunogène.

Plus récemment, Des études précliniques ont permis d'établir un lien entre la réponse tumorale à l'anti-CTLA-4/PD-1 et le microbiote intestinal (302,303). Les tumeurs implantées en sous-cutanée chez les souris *germ-free* ou traitées par antibiothérapie large spectre ne répondent pas à l'anti-CTLA-4. Le blocage du CTLA-4 entraîne une réponse T au niveau iléo-colique conduisant à des lésions muqueuses et une dysbiose (302). L'administration orale de *Bacteroides fragilis* et de *Bacteroides thetaiotaomicron* restaure la réponse anti-tumorale de l'anti-CTLA-4 en induisant la maturation des cellules dendritiques et une réponse Th1 dans les ganglions drainant la tumeur. Chez l'Homme comme chez la souris, l'anti-CTLA-4 induit des réponses Th1 spécifiques de *B. fragilis* et de *B. thetaiotaomicron*. La réponse anti-tumorale de l'anti-CTLA-4 peut être restaurée par le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques de *B. fragilis* et de *B. thetaiotaomicron* (302). Ces résultats suggèrent que l'anti-CTLA-4 peut chez certains patients entraîner une dysbiose en faveur de l'efficacité anti-tumorale de ce traitement. En parallèle, une autre étude montre que l'anti-PDL-1 n'induit pas de dysbiose ni d'inflammation digestive. En revanche, des tumeurs B16-SIY implantées en sous-cutanée, progressent plus rapidement chez les souris issues des laboratoires Taconic que celles issues de Jackson (JAX) (303). Les souris JAX présentent une infiltration intra-tumorale enrichie en lymphocytes T CD8<sup>+</sup> par rapport aux souris Taconic. La réponse anti-tumorale des souris traitées par anti-PDL-1 était associée à un enrichissement de leur flore en *Bifidobacterium*. Le *Bifidobacterium* induit une activité T CD8<sup>+</sup> cytotoxique spécifique à la

tumeur lors du blocage du PDL-1. Ces données montrent que l'efficacité de l'anti-PDL-1 contrairement à l'anti-CTLA-4 ne dépend pas de bactéries pro-inflammatoires (303). Le microbiote intestinal intervient dans de nombreux mécanismes impliqués dans l'inflammation, l'immunité, la carcinogénèse et la réponse aux traitements anti-tumoraux au niveau local. Peu de travaux décrivent les mécanismes par lesquels le microbiote peut avoir un effet à distance du tube digestif, en particulier sur les tumeurs extra-digestives et leurs réponses aux traitements.

## **OBJECTIFS DE THESE**

Au cours des dernières années, les inhibiteurs de checkpoint immunitaire ont révolutionné le paysage en oncologie. L'anticorps monoclonal anti-CTLA-4 ayant été le premier à obtenir l'AMM pour les patients atteints de mélanome métastatique, a permis de monter des cohortes prospectives pour des études académiques et translationnelles. Son utilisation présente des limites, i) une efficacité clinique au long cours d'environ 18% seulement, ii) un développement fréquent de colites induites pouvant être sévères, iii) un coût élevé. Les combinaisons thérapeutiques montrent maintenant une augmentation de leur efficacité en termes de survie mais également de l'incidence de leurs toxicités. Le nombre de patients qui vont recevoir des inhibiteurs de checkpoints immunologiques (anti-CTLA-4, anti-PD-1 et anti-PDL-1) va donc fortement augmenter dans les prochaines années. L'amélioration de leur efficacité et de leur tolérance passe par une meilleure compréhension de leurs mécanismes. La recherche de biomarqueurs prédictifs de réponse clinique et/ou de développement de toxicité devient maintenant un enjeu majeur pour sélectionner les patients pouvant avoir un bénéfice à l'utilisation de ces traitements. En partant de l'observation que les colites induites par l'anti-CTLA-4 présentent plusieurs points communs avec les MICI, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'une dysbiose associée à une dysrégulation du système immunitaire pouvant prédire la réponse clinique et/ou la survenue d'une colite induite par l'anti-CTLA-4.

Au laboratoire, mon travail de thèse s'intègre dans un projet collaboratif impliquant cliniciens (dermatologues et gastro-entérologues) et chercheurs (spécialistes du microbiote et en immunologie) et permet de répondre à plusieurs objectifs à partir d'une cohorte prospective de patients atteints de mélanome métastatique et traités par l'anti-CTLA-4 (l'ipilimumab). Les données recueillies comprenaient l'analyse de la composition du microbiote intestinal et l'immunophénotypage lymphocytaire T sur le sang périphérique avant le début et au cours du traitement par ipilimumab afin d'identifier de potentiels liens entre le microbiote et le système immunitaire périphérique. L'analyse du phénotypage lymphocytaire

sur des biopsies coliques chez les patients développant une colite induite à l'anti-CTLA-4 a été réalisée en parallèle. Les données obtenues sur la composition du microbiote, nous ont amené à doser des acides gras à chaînes courtes dans le sérum et les selles des patients, et d'étudier le rôle immunologique du butyrate sur l'efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA-4 dans des modèles murins.

Mon travail est divisé en 2 axes : l'un sur les colites induites par l'anti-CTLA-4 et l'autre sur la réponse anti-tumorale. Les principaux objectifs sont :

- Décrire l'infiltrat lymphocytaire colique chez les patients développant une colite induite par l'anti-CTLA-4 comparativement aux colites induites par l'anti-PD-1.
- Rechercher l'existence d'une composition du microbiote intestinal prédictif de la colite induite par l'anti-CTLA-4 et/ou de la réponse clinique.
- Evaluer le lien entre la flore intestinale et le statut immunitaire périphérique des patients traités par l'anti-CTLA-4 au regard de la réponse clinique et du développement de la colite.
- Evaluer l'impact des métabolites (AGCC) du microbiote intestinal sur l'efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA-4 chez l'Homme et dans des modèles de souris.
- Comprendre les mécanismes immunologiques impliqués dans la modulation de la réponse anti-tumorale à l'anti-CTLA-4 via le butyrate dans un modèle murin.

## **RESULTATS**

### **Article 1**

« Colon Immune-Related Adverse Events: anti-CTLA-4 and anti-PD-1 blockade induce distinct immunopathological entities » Journal of Crohn's and Colitis, accepté en 2017.

### **Article 2**

« Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab » Annals of Oncology 2017.

### **Article 3**

« Systemic microbial butyrate is associated with resistance to CTLA-4 blockade » manuscrit soumis à publication en September 2017.

## **Article 1.**

**« Colon Immune-Related Adverse Events: anti-CTLA-4 and anti-PD-1 blockade induce distinct immunopathological entities » (Journal of Crohn's and colitis, accepté en 2017)**

**Clélia Coutzac**, Julien Adam, Emilie Soularue, Michael Collins, Antoine Racine, Charlotte Mussini, Lisa Boselli, Nyam Kamsukom, Christine Mateus, Mélinda Charrier, Lydie Cassard, David Planchard, Vincent Ribrag, Karim Fizazi, Yohann Loriot, Patricia Lepage, Jean-Yves Scoazec, Caroline Robert, Franck Carbonnel, Nathalie Chaput

**Contexte** Les anticorps bloquant le CTLA-4 ou le PD-1 ont montré leur efficacité sur la survie des patients atteints de mélanome métastatique (49,50). L'une des principales limites à leur utilisation est l'incidence élevée d'effets indésirables d'origine immunologique, en particulier la colite nécessitant le plus souvent l'arrêt du traitement anti-tumoral. Les caractéristiques immunologiques des colites induites par l'anti-CTLA-4 et l'anti-PD-1 sont peu décrites. Leur prise en charge thérapeutique est similaire à celle des poussées de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) alors qu'aucune donnée biologique ou immunologique ne permet d'authentifier une physiopathologie commune. L'objectif de ce travail a été de décrire et de comparer les caractéristiques immunologiques et histologiques des colites induites par l'anti-CTLA-4 et l'anti-PD-1.

**Patients et Méthodes** Trente-trois biopsies coliques des patients développant une colite induite par l'anti-CTLA-4 (n=27), par l'anti-PD-1 (n=6) et en poussée d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI; n=5) naïfs de tout traitement ont été analysées en immunohistochimie et en cytométrie en flux. La concentration en TNF $\alpha$  a été évaluée dans les surnageants de biopsies par technique ELISA.

**Résultats principaux** Les colites induites par l'anti-CTLA-4 et par l'anti-PD-1 sont toutes deux largement infiltrées par des LT. Cependant, ce sont les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> qui sont majoritairement retrouvés à la fois dans la lamina propria et en intra-épithélial dans les colites

induites à l'anti-PD-1, alors que les LT CD4<sup>+</sup> prédominent dans la lamina propria des colites induites à l'anti-CTLA-4. Il n'existe pas de différence concernant le nombre de Treg dans la muqueuse colique entre les 2 types de colites ni avec les biopsies de MICI. On observe également un nombre augmenté de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels activés (non Treg) définis par l'expression d'ICOS dans les biopsies de patients développant une colite sous anti-CTLA-4 comparativement aux MICI. Parmi les LT CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup>, les LT CD4<sup>+</sup> conventionnels étaient majoritaires dans les biopsies de colite à anti-CTLA-4, alors que la population Treg prédomine dans les colites à anti-PD-1 et dans les MICI. Enfin, une concentration élevée en TNF $\alpha$  d'origine muqueuse est observée dans les surnageants de biopsies coliques de patients avec une colite à anti-CTLA-4. Une faible concentration en TNF $\alpha$  est associée à une réponse clinique aux corticoïdes.

**Conclusion** Ce travail montre des différences au niveau de l'infiltrat lymphocytaire T entre les colites induites par l'anti-CTLA-4- par rapport à celles induites par l'anti-PD-1. Ces résultats suggèrent que l'inflammation colique induite par ces 2 types d'inhibiteurs de point de contrôle immunologique a des mécanismes d'induction ou d'entretien distinctes. Bien que cette étude se base sur un nombre limité de patients, la faible concentration de TNF $\alpha$  d'origine muqueuse dans les biopsies de colites induite par l'anti-PD-1 pourrait remettre en cause l'utilisation de l'infliximab chez ces patients contrairement aux patients développant une colite induite par l'anti-CTLA-4. Enfin, la concentration de TNF $\alpha$  d'origine muqueuse semble associée au risque de développer une corticorésistance précoce chez les patients développant une colite à anti-CTLA-4. Ces données permettent de différencier d'un point de vue immunologique les toxicités coliques induites par l'anti-CTLA-4 versus par l'anti-PD-1 et remettre en cause leur prise en charge thérapeutique qui à l'heure d'aujourd'hui reste la même.





Original Article

# Colon Immune-Related Adverse Events: Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Blockade Induce Distinct Immunopathological Entities

Clélia Coutzac,<sup>a,b</sup> Julien Adam,<sup>c,d</sup> Emilie Soularue,<sup>a,b,e</sup> Michael Collins,<sup>b,e</sup> Antoine Racine,<sup>b,e</sup> Charlotte Mussini,<sup>f</sup> Lisa Boselli,<sup>a</sup> Nyam Kamsukom,<sup>g</sup> Christine Mateus,<sup>g</sup> Mélinda Charrier,<sup>a,b</sup> Lydie Cassard,<sup>a</sup> David Planchard,<sup>h</sup> Vincent Ribrag,<sup>i</sup> Karim Fizazi,<sup>b,j</sup> Yohann Loriot,<sup>j</sup> Patricia Lepage,<sup>k</sup> Jean-Yves Scoazec,<sup>b,c,d</sup> Caroline Robert,<sup>b,g</sup> Franck Carbonnel,<sup>b,e</sup> Nathalie Chaput<sup>a,l</sup>

<sup>a</sup>Gustave Roussy, Laboratory d'Immunomonitoring en Oncologie, CNRS-UMS 3655 and INSERM-US23, Villejuif F-94805, France <sup>b</sup>University Paris-Sud, Faculté de Médecine, Le Kremlin Bicêtre, F-94276, France <sup>c</sup>Gustave Roussy, Department of Pathology and Laboratory Medicine [BIOPATH], Villejuif F-94805, France <sup>d</sup>Gustave Roussy, AMMICA, CNRS-UMS 3655 and INSERM-US23, Villejuif F-94805, France <sup>e</sup>Department of Gastroenterology, Kremlin Bicêtre Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris [AP-HP], Le Kremlin Bicêtre, France <sup>f</sup>Department of Pathology, Kremlin Bicêtre Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris [AP-HP], Le Kremlin Bicêtre, France <sup>g</sup>Gustave Roussy, Département de Médecine, Service de Dermatologie, Villejuif, F-94805, France <sup>h</sup>Gustave Roussy, Département de Médecine Oncologique, Service de pathologie thoracique, Villejuif, F-94805, France <sup>i</sup>Gustave Roussy, Drug Development Department [DITEP] Villejuif F-94805, France <sup>j</sup>Gustave Roussy Cancer Campus [GRCC], Department of Cancer Medicine, Villejuif F-94805, France <sup>k</sup>Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, University Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France <sup>l</sup>University Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry, Châtenay-Malabry, F-92 296, France

Corresponding author: Professor Nathalie Chaput, PharmD, PhD, Gustave Roussy Cancer Campus, Laboratoire d'Immunomonitoring en Oncologie, Villejuif F-94805, France. Tel.: 33 [0]1 42 11 56 55; fax: 33 [0]1 42 11 60 94; email: [nathalie.chaput@gustaveroussy.fr](mailto:nathalie.chaput@gustaveroussy.fr)

## Abstract

**Background and Aim:** Immune checkpoint inhibitors targeting CTLA-4 and PD-1 improve survival in cancer patients but may induce immune-related adverse events, including colitis. The immunological characteristics of anti-CTLA-4 [ $\alpha$ CTLA-4]- and anti-PD-1 [ $\alpha$ PD-1]-related colitis have been poorly described. The aim of the present study was to compare the immunological and histological characteristics of  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis and  $\alpha$ PD-1-induced colitis.

**Methods:** Colonic biopsies from patients with  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis,  $\alpha$ PD-1-induced colitis, and inflammatory bowel disease [IBD] were analysed by immunohistochemistry and flow cytometry. Tumour necrosis factor alpha [TNF $\alpha$ ] concentration was assessed in biopsy supernatants.

**Results:** CD8<sup>+</sup> T cells were found in the lamina propria and epithelium in  $\alpha$ PD-1-induced colitis, whereas CD4<sup>+</sup> T cells were found in the lamina propria in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis. No or low intraepithelial lymphocytes were observed in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis. No difference in numbers of mucosal regulatory T cells was observed between  $\alpha$ CTLA-4- or  $\alpha$ PD-1-induced colitis and IBD patients. Higher numbers of activated ICOS<sup>+</sup> conventional CD4<sup>+</sup> T cells were observed in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis compared with patients with IBD. Among ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, conventional CD4<sup>+</sup> T cells were the main T cell population in patients with  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis, whereas Treg

cells were predominant in IBD or  $\alpha$ PD-1-induced colitis. High mucosal TNF $\alpha$  concentrations were observed in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis. Low mucosal TNF $\alpha$  concentrations were associated with steroid sensitivity.

**Conclusions:** These observations show that  $\alpha$ CTLA-4- and  $\alpha$ PD-1-induced colitis have distinct immunological characteristics. Mucosal TNF $\alpha$  concentration might detect patients at risk of developing corticosteroid resistance after CTLA-4 blockade.

**Key Words:** Anti-CTLA-4; anti-PD-1; colitis; immune checkpoint blockade; immune-related adverse events

## 1. Introduction

Immunotherapy has become a major therapeutic strategy in oncology. Immune checkpoint inhibitors, such as cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 [CTLA-4] and programmed cell death 1 [PD-1], are targets for blocking antibodies. Anti-CTLA-4 [ $\alpha$ CTLA-4] antibodies [ipilimumab and tremelimumab] and anti-PD-1 [ $\alpha$ PD-1] antibodies [pembrolizumab and nivolumab] have proven efficacy in melanoma,<sup>1-3</sup> non-small cell lung cancer,<sup>4</sup> renal cell carcinoma,<sup>5</sup> and recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck.<sup>6</sup> However, one of their major limitations is the high incidence of immune-related adverse events [irAEs], especially enterocolitis.<sup>5,7</sup> Data concerning the immunopathology of anti-CTLA-4-related colitis are scarce and, to our knowledge, are nonexistent for anti-PD-1-related colitis. It has been suggested that depletion of mucosal FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells [Treg] induced by  $\alpha$ CTLA-4 treatment may elicit irAEs.<sup>8</sup> However, no mucosal or peripheral depletion of Treg was observed after  $\alpha$ CTLA-4 treatment.<sup>9</sup> Management guidelines of irAEs<sup>10-12</sup> based on clinical trials, small case series, and case reports have been published.<sup>13-17</sup> Their management is similar to that of inflammatory bowel disease [IBD], despite there being no immunological or biological data showing that  $\alpha$ CTLA-4- and  $\alpha$ PD-1-induced colitis have a similar physiopathology.

Further recent approvals of immune checkpoint inhibitors in various cancers will lead to increasing numbers of patients exposed to these treatments and their toxicities. Thus, a better characterisation and understanding of the underlying mechanisms of immunotherapy-induced colitis is mandatory. T cells such as regulatory T cells, conventional CD4<sup>+</sup> T cells, and CD8<sup>+</sup> T cells, and T cell expression of inducible T-cell costimulator [ICOS], were studied in patients developing colitis after CTLA-4 or PD-1 blockade. Indeed, previous studies suggested that blocking CTLA-4 induced activation, proliferation, and effector functions of regulatory T cells and conventional CD4<sup>+</sup> T cells as well as up-regulation of ICOS.<sup>18-20</sup> Moreover, regulation of ICOS on regulatory T cells after CTLA-4 blockade can protect mice from developing colitis.<sup>21</sup> Considering the regulation of the PD-1/PD-L1 axis, previous studies in the tumour microenvironment have demonstrated that pre-existing CD8<sup>+</sup> T cells are increased after anti-PD-1 blockade, inducing proliferative and cytotoxic activity associated with tumour regression.<sup>22,23</sup> In this study, we provide histological description of  $\alpha$ CTLA-4- and  $\alpha$ PD-1-induced colitis, and analysed in colon biopsies conventional and regulatory CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells and ICOS expression within T cell populations.

## 2. Patients and Methods

### 2.1. Patients

In this prospective study, we enrolled consecutive patients with  $\alpha$ CTLA-4- and  $\alpha$ PD-1-induced colitis between May 2013 and July 2015. The majority of patients were recruited at Gustave Roussy

Cancer Campus [Villejuif] in which they were treated for metastatic melanoma, Hodgkin's lymphoma, prostate cancer, or non-small cell lung cancer. When immune-mediated enterocolitis [ $\geq$  grade III NCI-CTCAE] was suspected, patients were referred to the Gastroenterology Department of Bicêtre Hospital. The diagnosis of  $\alpha$ CTLA-4- or  $\alpha$ PD-1-induced colitis was made in patients who had endoscopic signs of inflammation with no other cause of colitis, such as ischaemia and infection [stool tests for bacterial pathogens and *Clostridium difficile* toxin had to be negative]. Given that immune checkpoint-related colitis has similarities with IBD, such as clinical and endoscopic characteristics and their management,<sup>13,15,24</sup> we compared our cohort with five newly diagnosed IBD patients: two with ulcerative colitis and three with Crohn's disease [without previous corticosteroids or immunosuppressive therapy or biotherapy such as anti-tumour necrosis factor alpha [anti-TNF $\alpha$ ] that could have modified immune features in the colon biopsies].

Ipilimumab [ $\alpha$ CTLA-4 IgG1] was administered by intravenous infusion every 3 weeks at a dose of 3 mg or 10 mg per kilogram of body weight. Patients could continue ipilimumab infusions with a maintenance treatment every 12 weeks in cases of tumour response or stable disease. Tremelimumab [ $\alpha$ CTLA-4 IgG2] was administered intravenously every 4 weeks, at a dose of 3 mg or 10 mg per kilogram of body weight. Nivolumab and pembrolizumab [both  $\alpha$ PD-1 IgG4] were administered intravenously every 2 and 3 weeks, at a dose of 3 mg and 2 mg per kilogram, respectively. Sociodemographic, clinical, biological, and endoscopic data were recorded using pre-specified case report forms. Colonic biopsy samples were collected to assess T cell infiltration and cytokine secretion.

All patients enrolled in this study signed an informed consent form before any study procedures [GOLD study: SC12-018; ID-RCB-2012-6 A01496-37; CA184-169 2011-004029-28 study: NCT01515189; MellipiRx study: EUDRACT 2010-020317-93; GEFTREM study: NCT02040064; and KEYNOTE-013 study: NCT01953692]. All procedures were performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

### 2.2. Flow cytometry

Fresh colon biopsies were collected during endoscopy examination for 17 patients with  $\alpha$ CTLA-4-, 5  $\alpha$ PD-1-induced colitis, and four patients with IBD. An enzymatic digestion was performed using Pulmozyme® [Roche] and collagenase [Sigma Aldrich]. Mechanical digestion was performed using GentleMACS Dissociator technology [Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany]. Colonic cell suspension was incubated with fluorochrome-conjugated antibodies for 15 min at room temperature for surface staining, followed by 45 min of permeabilisation at 4°C with Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set [eBioscience, Santa Clara, USA] and intranuclear staining with fluorochrome-conjugated antibodies for 45 min at 4°C. The following fluorochrome-conjugated antibodies were used:

fluorescein isothiocyanate [FITC]-conjugated anti-ICOS [clone: ISA-3; ThermoFisher, Carlsbas, USA], phycoerythrin [PE]-conjugated anti-CD25 [clone: M-A251], peridinin chlorophyll protein [PerCP]-conjugated anti-CD8 [clone: 2ST8.5H7], phycoerythrin-cyanine 7 [PE-Cy7]-conjugated anti-CD4 [Clone: SK3], allophycocyanin-cyanin 7 [APC-Cy7]-conjugated CD45RA [clone: HI100] [all from Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA], APC-conjugated anti-FoxP3 [clone: PCH101; eBioscience], and Vioblue [VB]-conjugated anti-CD3 [clone: BW264/56; Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany]. Death cell discrimination was performed with yellow fluorescent reactive dye [LIVE/DEAD® Fixable Yellow stain] [from Invitrogen]. Fluorescence was analysed by flow cytometry using a Canto II flow cytometer [Becton Dickinson]. Post-acquisition analysis was done using Kaluza software 1.3 [Beckman Coulter].

### 2.3. TNF $\alpha$ concentration in colonic biopsies

To measure TNF $\alpha$  spontaneously released from colonic biopsies, we incubated colonic biopsies in 200  $\mu$ l of complete medium [RPMI Glutamax containing 10% fetal bovin serum, 5% penicillin-streptomycin, 5% non-essential amino-acid, and 5% sodium pyruvate [all from ThermoFisher, Carlsbad, USA]] for 24 h at 37°C. Supernatants were then stored at -80°C until the day of assay. TNF $\alpha$  was measured [in duplicate] in supernatants by ELISA [Human TNF $\alpha$  ELISA Set, BD OptEIA™ from Becton Dickinson], according to the manufacturer's instructions.

### 2.4. Immunohistochemistry

The colonic biopsies of patients were provided by the Kremlin Bicêtre hospital. An expert gastrointestinal pathologist at Gustave Roussy performed pathological examination of biopsy specimens in 25  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis cases, five  $\alpha$ PD-1-induced colitis cases, and four IBD cases. Serial sections from paraffin-embedded biopsies were stained with haematoxylin-eosin-saffron [HES] and automated immunohistochemistry [IHC] was performed using a Ventana Benchmark Ultra or Discovery Ultra platform for CD3 [Dako rabbit polyclonal antibody, reference A0452, 1:100 dilution], CD8 [clone SP16, Spring Bioscience, 1:100 dilution], CD20 [clone L26, Dako, 1:100 dilution], and FoxP3 [clone SP97, Spring Bioscience, 1:100 dilution]. FoxP3 analysis was performed on 23  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis biopsies [two were not interpretable], five  $\alpha$ PD-1-induced colitis cases, and four IBD cases. For FoxP3, staining detection was performed using an HQ amplification kit in the Ventana Discovery Ultra platform and Discovery purple was used as a chromogen. For CD3, CD8, and CD20 staining, an UltraView detection kit in the Ventana Benchmark Ultra platform and the 3,3'-diaminobenzidine chromogen were used. The number of stained cells was manually counted under the supervision of a pathologist, blinded from the clinical data. For each slide, two to three high power fields were extracted from virtual slides and cell counting was performed with ImageJ software using the Cell Counter plugin.

### 2.5. Statistical analysis

Continuous variables are presented as medians and ranges. Categorical variables are presented as percentages. Continuous data were analysed using the unpaired non-parametric Mann-Whitney test for two groups or Kruskal-Wallis test for more than two groups. Mann-Whitney testing was performed to compare: absolute counts of CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and Treg cells; percentages of CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and Treg cells; and TNF $\alpha$  concentrations between  $\alpha$ CTLA-4- and  $\alpha$ PD-1-induced colitis. Kruskal-Wallis testing was performed to compare

the number of conventional CD4<sup>+</sup> T cells [Tconv] and Treg expressing ICOS<sup>+</sup> between  $\alpha$ CTLA-4- or  $\alpha$ PD-1-induced colitis and active IBD. A *p*-value < 0.05 was considered significant. Statistical analyses were performed using Prism 7.0 software [GraphPad].

## 3. Results

### 3.1. Clinical characteristics of the patients

During the study period, 37 patients developed  $\alpha$ PD-1- or  $\alpha$ CTLA-4- induced colitis and were included at the time of colitis diagnosis. Among them, four patients were excluded from the analysis: one had received  $\alpha$ CTLA-4 and  $\alpha$ PD-1 simultaneously, one had a diverticulitis, and two patients had no available colonic biopsies. Among the 33 remaining patients, 27 [81.8%] were treated with  $\alpha$ CTLA-4 antibody [ipilimumab or tremelimumab], and six [18.2%] were treated with  $\alpha$ PD-1 antibody [nivolumab or pembrolizumab] [Supplementary Table 1, available at ECCO-JCC online]. Given that immune checkpoint-related colitis has similarities with IBD, we compared our cohort with five newly diagnosed IBD patients: two with ulcerative colitis and three with Crohn's disease. The main characteristics of the 38 patients included in this study are summarised in Table 1.

### 3.2. Histological picture of anti-CTLA-4- and anti-PD-1-induced colitis

Among the 33 patients who developed colitis following immune checkpoint blockade, immunohistology could be realised only in 25  $\alpha$ CTLA-4- and five  $\alpha$ PD-1-induced colitis due to lack of material. All patients had histological features ranging from minimal to severe colitis; indeed, infiltrates of immune cells and epithelial lesions of variable intensity could be observed [Figure 1A]. Immune infiltrates comprised lymphocytes and plasma cells, usually diffusely distributed within the lamina propria, or sometimes grouped in loose aggregates. Intraepithelial lymphocyte exocytosis was common, usually being minimal and focal. In two cases, the density of intraepithelial lymphocytes [IELs] was comparable to that observed in lymphocytic colitis [> 20 IELs per 100 epithelial cells]. Activated lymphocytes with large nuclei were found in the two types of colitis. Among immune cells, variable numbers of eosinophils and macrophages were observed. Few neutrophils were present around crypts or within crypt lumina. Epithelial lesions included: minimal and patchy alterations of the surface epithelium; disorganisation and reduction in number of crypts; and scattered crypt abscesses [Figure 1A]. The lamina propria was usually oedematous; in some cases, patchy lesions of incipient fibrosis were present. Occasionally, dilated capillaries lined by plumped endothelial cells were present; the lumen of these capillaries was filled with mononuclear cells [Figure 1A].

Lymphocytes were the main immune cell population in  $\alpha$ CTLA-4- and  $\alpha$ PD-1-induced colitis. Analysis of CD20<sup>+</sup> B and CD3<sup>+</sup> T lymphocytes by IHC revealed that B cells were not predominant [data not shown], whereas T lymphocytes were the main infiltrating cells in both types of colitis [Supplementary Figure 1, available at ECCO-JCC online]. No difference in CD3<sup>+</sup> T cell numbers was observed between  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis and  $\alpha$ PD-1-induced colitis, by either flow cytometry or IHC analysis [Supplementary Figure 1].

### 3.3. Predominance of mucosal CD4<sup>+</sup>T cells in $\alpha$ CTLA-4-induced colitis and of mucosal CD8<sup>+</sup>T cells in $\alpha$ PD-1-induced colitis

We next characterised more precisely the CD3<sup>+</sup> infiltrate. By immunohistochemistry, the subepithelial layer was shown to be enriched

**Table 1.** Clinical and endoscopic characteristics of patients.

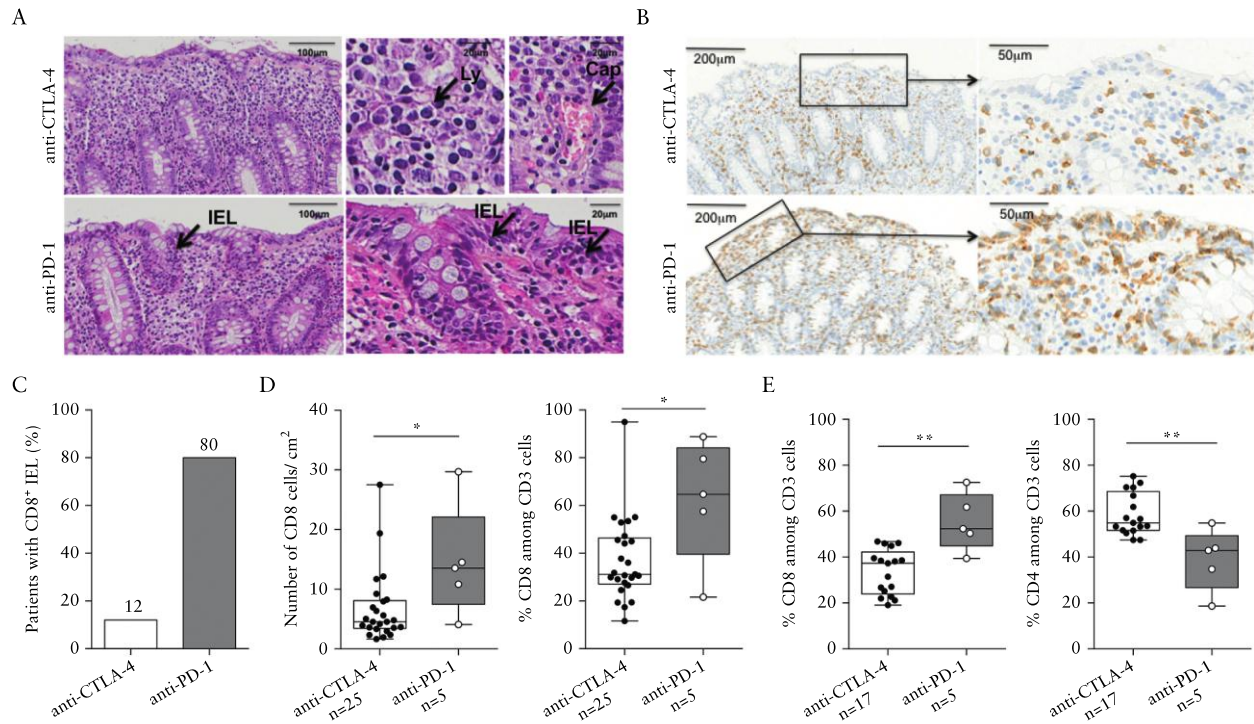
Variable	Anti-CTLA-4-induced colitis [ <i>n</i> = 27]	Anti-PD-1-induced colitis [ <i>n</i> = 6]	IBD [ <i>n</i> = 5]
Female, <i>n</i> [%]	13 [48]	1 [2]	5 [100]
Median age, years [range]	62 [27–86]	61 [37–79]	26 [17–56]
Diarrhoea, <i>n</i> [%]	26 <sup>1</sup> [100]	6 [100]	4 [80]
Median number of stools over 24 h	7 <sup>1</sup> [1–15]	6 [3–15]	3 [1–15]
Abdominal pain, <i>n</i> [%]	19 <sup>1</sup> [73]	4 [67]	3 [60]
Haematochezia, <i>n</i> [%]	12 <sup>1</sup> [46]	2 [33]	0 [0]
Fever, <i>n</i> [%]	10 <sup>1</sup> [38]	3 [50]	2 [40]
Endoscopic sites of inflammation, <i>n</i> [%]			
Rectum	1 <sup>2</sup> [4]	0 <sup>3</sup> [0]	0 <sup>4</sup> [0]
Left colon	1 <sup>2</sup> [4]	0 <sup>3</sup> [0]	1 <sup>4</sup> [25]
Extensive colitis	20 <sup>2</sup> [83]	4 <sup>3</sup> [100]	3 <sup>4</sup> [75]
Ileum	2 <sup>2</sup> [8]	0 <sup>3</sup> [0]	0 <sup>4</sup> [0]

<sup>1</sup>One missing datum [*n* = 26].

<sup>2</sup>Three incomplete colonoscopies [*n* = 24].

<sup>3</sup>Two incomplete colonoscopies [*n* = 4].

<sup>4</sup>One incomplete colonoscopy [*n* = 4].



**Figure 1.** Immunological infiltrate in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis and  $\alpha$ PD-1-induced colitis. A. Histological representation of  $\alpha$ CTLA-4- [upper panels] and  $\alpha$ PD-1- [lower panels] induced colitis. B. Representative immunohistochemical detection of CD8<sup>+</sup> in  $\alpha$ CTLA-4 [upper panel] and  $\alpha$ PD-1-induced colitis [lower panel]. C. Immunohistological analysis of absolute count and proportion of CD8<sup>+</sup> T cells in  $\alpha$ CTLA-4 and  $\alpha$ PD-1-induced colitis. D. Flow cytometry analysis of percentage of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> among CD3<sup>+</sup> cells in  $\alpha$ CTLA-4 and  $\alpha$ PD-1-induced colitis. Each dot represents one patient. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001, *ns* = not significant by Mann-Whitney test [C and D]. Ly, activated lymphocyte; Cap, dilated capillary; IEL, intraepithelial lymphocyte.

with CD4<sup>+</sup> T cells in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis biopsies, whereas CD8<sup>+</sup> T cells were predominant in  $\alpha$ PD-1-induced colitis biopsies. Owing to epithelium destruction, we could only analyse the epithelium of 20/25  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis biopsies. Interestingly, CD8<sup>+</sup> IELs were observed in four patients [80%] with  $\alpha$ PD-1-induced colitis, whereas intraepithelial CD8<sup>+</sup> lymphocytes were observed in only three patients [12%] with  $\alpha$ CTLA-4 induced colitis [Figure 1C].

The absolute count and the proportion of CD8<sup>+</sup> T cells in colon biopsies were significantly higher in patients with  $\alpha$ PD-1-induced

colitis (13.5 CD8<sup>+</sup> cells/cm<sup>2</sup> [range: 4.1–29.7] and 64.7% [21.6–88.8]) than in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis (4.6 CD8<sup>+</sup> cells/cm<sup>2</sup> [1.7–27.5] and 31.1% [11.6–95.0]) [*p* = 0.0266 and *p* = 0.0365, respectively] [Figure 1D].

Among the 33 patients who developed colitis following immune checkpoint blockade, flow cytometry analysis was performed in 17 cases of  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis and five cases of  $\alpha$ PD-1-induced colitis. Comparable results were obtained; the median percentage of CD8<sup>+</sup> cells among CD3<sup>+</sup> cells was 37.3% [19.1–46.8] in patients

receiving  $\alpha$ CTLA-4 as compared with 52.4% [39.4–72.5] in patients receiving  $\alpha$ PD-1 [ $p = 0.0014$ ] [Figure 1D]. Conversely, the percentage of CD4<sup>+</sup> cells among mucosal CD3<sup>+</sup> T cells was significantly higher in patients with  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis than in patients with  $\alpha$ PD-1 induced colitis (54.9% [47.4–75.2] vs 42.9% [18.6–54.8];  $p = 0.0046$ ) [Figure 1E].

### 3.4. No depletion of colonic regulatory T lymphocytes following $\alpha$ CTLA-4 or $\alpha$ PD-1 treatments

Regulatory T lymphocytes [Treg] harbour high levels of CTLA-4 and PD-1 and may therefore be targeted by anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies in these treatments. Previous studies showed that Treg may be depleted in tumour or colon tissue following  $\alpha$ CTLA-4 immunotherapy.<sup>24</sup> Since Treg are enriched in the colonic mucosa of patients with active IBD,<sup>25</sup> we also analysed FoxP3<sup>+</sup> cells in four patients with an active IBD before any treatment, as controls. FoxP3<sup>+</sup> cells were studied by two methods, IHC and flow cytometry. No statistical difference was observed between these three types of colitis. These results suggest that colonic Treg depletion might not be associated with  $\alpha$ CTLA-4-induced or  $\alpha$ PD-1-induced colitis [Supplementary Figure 2, available at *ECCO-JCC* online].

### 3.5. Inducible T-cell CoStimulator [ICOS]<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were mainly FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in $\alpha$ CTLA-4-induced colitis.

We monitored ICOS on T cells because previous studies had demonstrated that it could be related to clinical response.<sup>26–28</sup> In mouse models, previous studies suggested that ICOS could also play a major role in the induction of  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis.<sup>21</sup> We looked at ICOS expression in mucosal colonic T cells in 14 CTLA-4-induced colitis biopsies [ICOS staining was not interpretable in three patients' samples], five  $\alpha$ PD-1-induced colitis biopsies and four IBD biopsies. ICOS was mainly expressed by CD4<sup>+</sup> T cells and was poorly expressed on CD8<sup>+</sup> T cells [data not shown]. Within CD4<sup>+</sup> T cells, ICOS expression was assessed among Treg [CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>] and conventional CD4<sup>+</sup> T cells [CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>; Tconv]. The number of Tconv expressing ICOS was significantly higher in biopsies from patients with  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis compared with biopsies from patient with IBD (705 [321–5613] vs 175 [84–301];  $p = 0.0007$ ) [Figure 2A]. The same trend was found between  $\alpha$ PD-1-induced colitis (705 [81–1257]) and IBD patients but was not statistically different [ $p = 0.10$ ]. No difference in ICOS<sup>+</sup> Treg number was observed between the three groups [Figure 2A]. The proportion of ICOS<sup>+</sup> Tconv cells among CD4<sup>+</sup> T cells was significantly higher in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis [ $p < 0.01$ ] and  $\alpha$ PD-1-induced colitis [ $p < 0.05$ ], but the proportion of ICOS<sup>+</sup> Treg cells among CD4<sup>+</sup> T cells was only significantly increased in  $\alpha$ PD-1-induced colitis [ $p < 0.05$ ] compared with IBD [Figure 2B]. The ratio of ICOS expression between Treg and Tconv cells has been shown to play an important role to keep in check local activation of immune cells.<sup>21</sup> Among ICOS<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells, a higher proportion of Tconv and a lower proportion of Treg cells was observed in colonic biopsies of patients with  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis compared with IBD [Figure 2C left and middle panels]. No such phenomenon was observed in patients treated with  $\alpha$ PD-1 compared with IBD [Figure 2C left and middle panels]. Finally, the Foxp3/Foxp3<sup>+</sup> ratio within ICOS<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells reached higher values in patients with  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis compared with IBD. In  $\alpha$ PD-1-induced colitis, this ratio was similar to IBD [Figure 2C right

panel and Supplementary Figure 3]. In conclusion, the number of activated ICOS<sup>+</sup> Tconv cells was higher in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis.

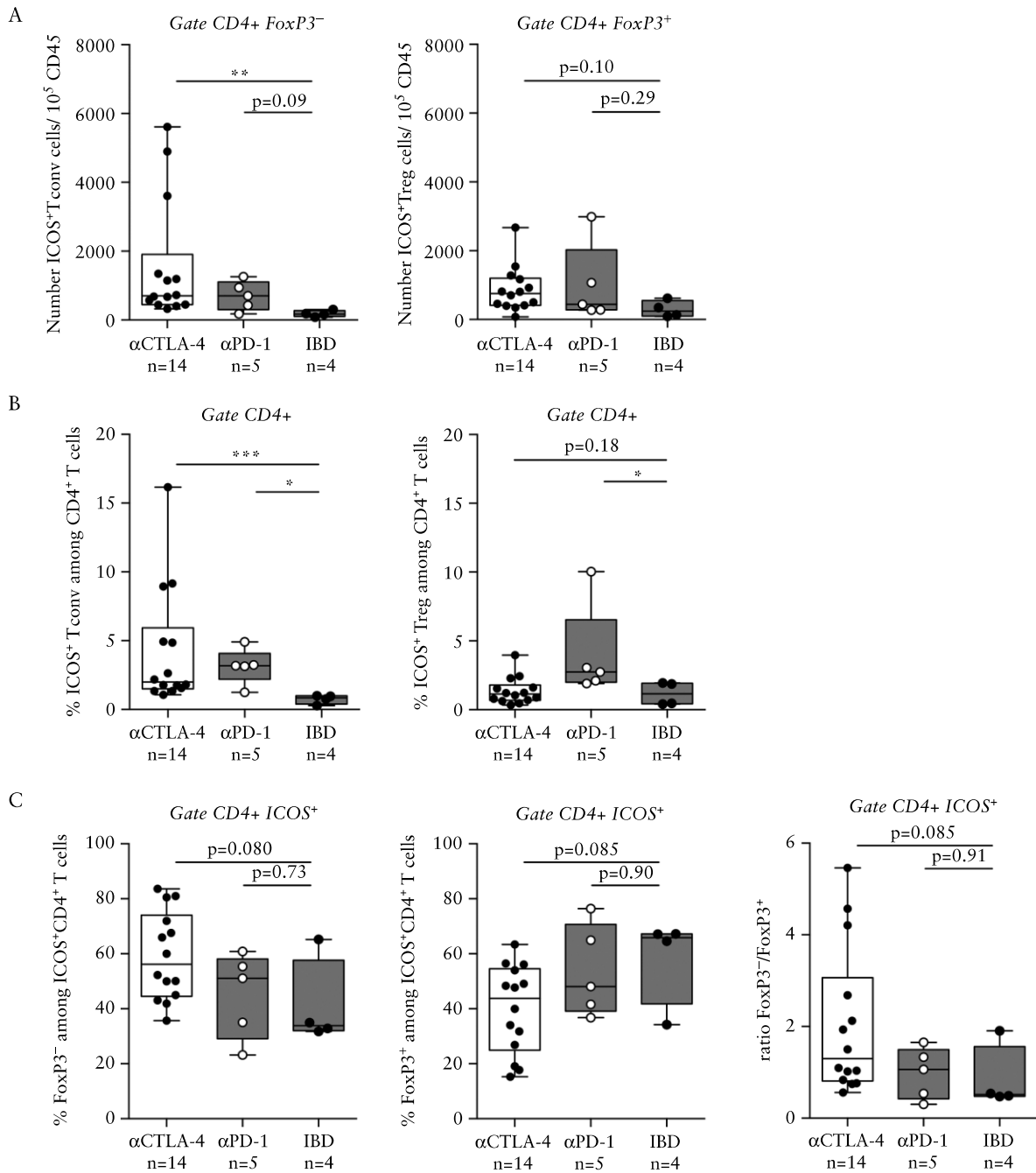
### 3.6. TNF $\alpha$ secretion is significantly higher in $\alpha$ CTLA-4-induced colitis than in $\alpha$ PD-1-induced colitis.

Anti-TNF $\alpha$  [infliximab] is used in the treatment of steroid-refractory  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis.<sup>12</sup> We analysed TNF $\alpha$  concentrations within colonic biopsies collected before steroid treatment in 30 patients [20 patients treated with  $\alpha$ CTLA-4, six patients treated with  $\alpha$ PD-1, and four IBD patients]. Mucosal TNF $\alpha$  was significantly higher in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis biopsies (median value 222 pg/ml [0–4721]) than in  $\alpha$ PD-1-induced colitis biopsies (median value 0 pg/ml [0–60];  $p = 0.0075$ ) or IBD patient biopsies (median value at 0 pg/ml [0–271];  $p = 0,0634$ ) [Figure 3A]. Five patients were treated with symptomatic treatments for their colitis, and no mucosal TNF $\alpha$  was detected in these patients. Of the 25 patients who received corticosteroids, 13 had low concentrations of mucosal TNF $\alpha$  [median value  $\leq 61.5$  pg/ml] and all had a clinical remission under steroid treatment. Among the 12 patients with high concentrations of mucosal TNF $\alpha$  [ $> 61.5$  pg/ml], 50% were refractory to steroids and received second-line treatment with infliximab [Figure 3B]. Low mucosal concentrations of TNF $\alpha$  were systematically associated with clinical remission under corticosteroids [Figure 3B]. It is of note that no patient treated with  $\alpha$ PD-1 required infliximab treatment, in accordance with their low TNF $\alpha$  concentrations [Figure 3]. Altogether these results indicate that mucosal concentration of TNF $\alpha$  may predict steroid sensitivity.

## 4. Discussion

This study showed that  $\alpha$ CTLA-4- and  $\alpha$ PD-1-induced colitis have distinct immunological and pathological characteristics. Subjects with  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis had enriched colon mucosal CD4<sup>+</sup> T cells, whereas subjects with  $\alpha$ PD-1-induced colitis had substantial mucosal and intraepithelial CD8<sup>+</sup> T cell populations. In addition, in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis, the proportion of activated CD4<sup>+</sup> T cells expressing ICOS was preferentially among conventional CD4<sup>+</sup> T cells, whereas ICOS was predominantly expressed on regulatory CD4<sup>+</sup> T cells in  $\alpha$ PD-1-induced colitis and in IBD. High concentrations of mucosal TNF $\alpha$  were only observed in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis. Finally, low mucosal TNF $\alpha$  concentrations were associated with steroid sensitivity in our patient cohort.

Microscopic colitis encompasses collagenous colitis and lymphocytic colitis. The diagnosis is based upon an endoscopically normal mucosa and pathological abnormalities in biopsy specimens. Increased thickening of the subepithelial collagenous band [ $> 10 \mu\text{m}$ ] is the key diagnostic factor of collagenous colitis, whereas an increased intraepithelial lymphocyte count [ $> 10\text{--}20$  IELs per 100 epithelial cells] is the key diagnostic factor of microscopic or lymphocytic colitis.<sup>29,30</sup> Colonic samples collected in  $\alpha$ PD-1-induced colitis displayed patchy IEL foci whereas, in microscopic colitis, IEL foci are increased and more diffuse.<sup>29,30</sup> Although all the patients with  $\alpha$ PD-1-induced colitis had IEL infiltrates, in most cases a histological diagnosis of microscopic or lymphocytic colitis could not be made due to unfulfilled diagnostic criteria. In a recent case report, Baroudjian and colleagues described a collagenous colitis in a patient who had received pembrolizumab [ $\alpha$ PD-1] after  $\alpha$ CTLA-4 failure.<sup>31</sup> In our cohort,  $\alpha$ PD-1-induced colitis was systematically associated with mucosal inflammation and infiltrates composed of

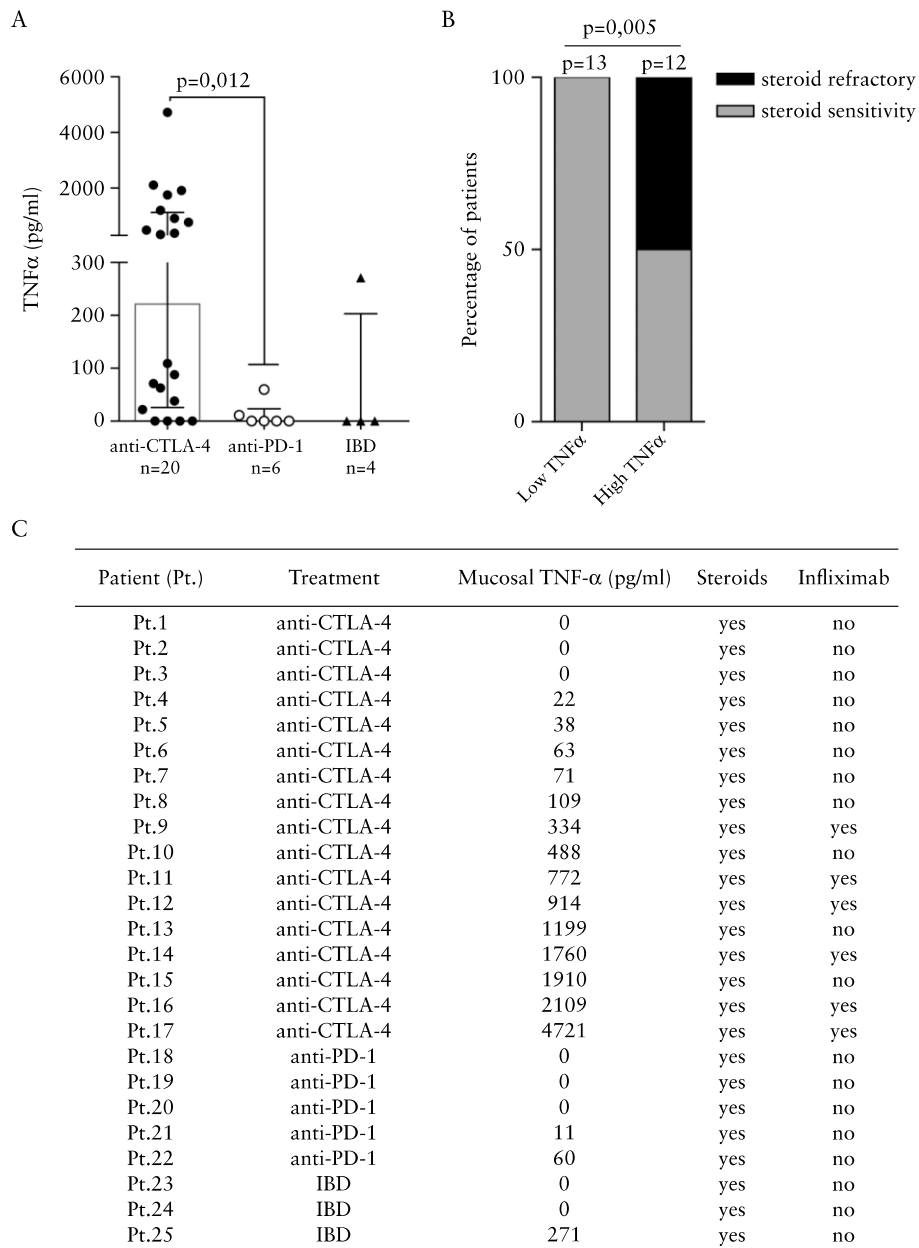


**Figure 2.** ICOS expression within CD4<sup>+</sup> T cells in αCTLA-4-induced colitis and αPD-1-induced colitis and inflammatory bowel disease [IBD] patients. **A.** Flow cytometry analysis of the number of conventional CD4<sup>+</sup> T cells [Tconv] expressing ICOS<sup>+</sup> [left panel] and Treg expressing ICOS<sup>+</sup> [right panel] between αCTLA-4-induced colitis, αPD-1-induced colitis, and IBD patients. **B.** Flow cytometry analysis of the proportion of ICOS<sup>+</sup> Tconv cells [left panel] and ICOS<sup>+</sup> Treg cells [right panel] within total CD4<sup>+</sup> T cells. **C.** Flow cytometry analysis of the proportion of FoxP3<sup>+</sup> [left panel] and FoxP3<sup>+</sup> [middle panel] among ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells and the ratio FoxP3<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> [right panel] in αCTLA-4-induced colitis, αPD-1-induced colitis, and IBD patients. Each dot represents one patient. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ns = not significant by Kruskal-Wallis test.

CD8<sup>+</sup> T cells including intraepithelial CD8<sup>+</sup> T cells, but without collagen layer thickening. The lack of collagenous colitis observed in this study might be explained by the fact that no patients received αPD-1 treatment after αCTLA-4 treatment failure.

One of the limitations of this study was the control group. Patients receiving αCTLA-4 or αPD-1 without developing colitis would have been the best control; however, colonoscopy in asymptomatic

patients was not ethically allowed. αCTLA-4-related colitis has some resemblance to IBD, such as patchy areas of inflammation, localisation to rectum; colon; ileum; duodenum; and lymphocytic infiltrate.<sup>15,32</sup> Further, in IBD, systemic steroids and/or infliximab treatment are used to reach clinical response.<sup>13,32</sup> However, the pattern of ipilimumab-induced serological markers (perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies [pANCA] and antibodies to porin



**Figure 3.** Mucosal tumour necrosis factor alpha [TNF $\alpha$ ] in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis,  $\alpha$ PD-1-induced colitis, and inflammatory bowel disease [IBD] patients. A. TNF $\alpha$  concentrations in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis,  $\alpha$ PD-1-induced colitis, and IBD patients. B. Corticosteroid response according to TNF $\alpha$  concentration in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis,  $\alpha$ PD-1-induced colitis and IBD patients. The cut-off value was defined as the median value of TNF $\alpha$  concentrations from the entire cohort. C. Patient treatment according to mucosal TNF $\alpha$ . Each dot represents one patient. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ns = not significant by Kruskal-Wallis test [A] and by Fisher's exact test [B].

protein C of *Escherichia coli* [OmpC]) and the histological features of the inflammation were distinct from classical IBD.<sup>32</sup> Previous histological studies described features of acute colitis with crypt abscesses in  $\alpha$ CTLA-4-related colitis.<sup>13,15,32</sup> Contrary to Verschuren *et al.*, we did not observe, in this cohort, crypt irregularities often associated with chronic disease such as IBD.<sup>14</sup> Taken together,  $\alpha$ PD-1-induced colitis shares some but not all pathological similarities with microscopic colitis, and  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis shares some but not all pathological features of IBD. Moreover, our results suggest that distinct immune mechanisms might be implicated in the induction and/or maintenance of inflammation in  $\alpha$ CTLA-4- and in  $\alpha$ PD-1-induced colitis.

We observed that  $\alpha$ CTLA-4-related colitis was enriched with CD4<sup>+</sup> T cells whereas CD8<sup>+</sup> T cells were augmented in  $\alpha$ PD-1-induced colitis. CTLA-4 is expressed on CD4<sup>+</sup> T cells, and particularly on Treg cells. Blocking CTLA-4 using  $\alpha$ CTLA-4 antibodies induces activation, proliferation, and effector functions in CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>18,19,33</sup> Mucosal CD4<sup>+</sup> T cells were predominant compared with CD8<sup>+</sup> T cells in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis. This result suggests that  $\alpha$ CTLA-4 targets not only CD4<sup>+</sup> T cells in the tumour environment but also in the gut mucosa. The accumulation of activated effector ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells may be linked to colon inflammation and/or may indirectly favour inflammation through recruitment and activation of other inflammatory cells. It is now well described that

the PD-1/PD-L1 axis in the tumour microenvironment represents a potent immune escape mechanism that blocks antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells.<sup>22</sup> Previous studies in the tumour microenvironment have demonstrated that pre-existing CD8<sup>+</sup> T cells are increased after PD-1 blockade, and that these cells have increased proliferative and cytotoxic functions.<sup>23</sup> Interestingly, CD8<sup>+</sup> T cells were predominant in biopsies of  $\alpha$ PD-1-induced colitis, suggesting this population to be the main T cell actors in  $\alpha$ PD-1-induced colitis contrary to  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis. A recent meta-analysis of the risk of irAE in patients treated with  $\alpha$ CTLA-4 or  $\alpha$ PD-1 demonstrated that the spectrum of inflammatory adverse events is very different between these therapies.<sup>34</sup> This seems consistent with our data suggesting that immune mechanisms involved may be different.

Treg harbour high levels of CTLA-4<sup>35,36</sup> and intermediate levels of PD-1.<sup>37</sup> In our study, no depletion in mucosal Treg seemed to be observed in immunohistochemistry and flow cytometry analysis. This is in accordance with a previous study in which no evidence of Treg reduction was observed after  $\alpha$ CTLA-4 treatment.<sup>9</sup> Activated T cells were present in virtually all the biopsies, and might have reflected the activation of immune cells. Conversely, high numbers of ICOS<sup>+</sup> conventional CD4<sup>+</sup> T cells were observed only in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis. In a mouse model, an increase in ICOS expression was described, mainly on Treg after blockade of CTLA-4. In this model, ICOS<sup>+</sup> Treg could inhibit memory Th1 responses in an IL-10-dependent manner, and could repress experimental intestinal inflammation.<sup>21</sup> In the same study, CTLA-4 blockade was protective, could improve trinitrobenzene sulphonic acid [TNBS]-induced colitis, and  $\alpha$ CTLA-4 injection was associated with a high frequency of ICOS<sup>+</sup> Treg within ICOS<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>21</sup> Thus mice never developed clinical colitis after CTLA-4 blockade, which is a major difference as compared with some patients treated with  $\alpha$ CTLA-4 therapies. In patients treated with  $\alpha$ CTLA-4, ICOS-expressing CD4<sup>+</sup> T cells were mainly Tconv and not Treg cells. Activated ICOS<sup>+</sup> Tconv preferentially induce Th1 responses with IFN $\gamma$  release, whereas ICOS<sup>+</sup> Treg induce immunosuppressive responses by secreting IL-10.<sup>21,27</sup> Thus, the balance of effector/regulatory T cells within ICOS<sup>+</sup> T cells suggests predominance of pro-inflammatory T cells after CTLA-4 blockade in patients with  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis. These results are reminiscent of previous studies in which ICOS induction on peripheral CD4<sup>+</sup> T cells during ipilimumab treatment has been proposed as a biomarker of ipilimumab efficacy in patients with cancer. It must be noted that no imbalance between Treg and Tconv expressing ICOS was observed in IBD patients or in patients treated with  $\alpha$ PD-1, which further supports different immune-related mechanisms between  $\alpha$ CTLA-4- and  $\alpha$ PD-1-induced colitis.

Patients with  $\alpha$ CTLA-4- and  $\alpha$ PD-1-induced colitis may respond to steroids. Infliximab could be another option for the treatment of steroid-resistant  $\alpha$ CTLA-4/ $\alpha$ PD-1-induced colitis. Infliximab is theoretically contraindicated in patients with cancer. In this study, the level of TNF $\alpha$  protein in the mucosa was higher after CTLA-4 blockade compared with PD-1 blockade. Low mucosal TNF $\alpha$  concentrations were associated with steroid sensitivity. Schreiber and colleagues have showed, in a cohort of 137 patients with Crohn's disease, that increased intestinal secretion of TNF $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  was predictive of acute relapse within the following year.<sup>38</sup> Recently Atreya *et al.* described, in patients with Crohn's disease receiving infliximab, that the numbers of membrane-bound TNF $\alpha$  (mTNF $\alpha$ ) cells had significantly higher short-term response rates to treatment as compared with patients with low amounts of mTNF $\alpha$  cells.<sup>39</sup> Thus, the level of mTNF $\alpha$  cells could serve as a predictive biomarker of clinical response to infliximab induction treatment.<sup>39</sup>

In another study, Olsen *et al.* showed that high TNF $\alpha$  gene expression in colorectal mucosa was an inverse predictor of remission after induction therapy with infliximab in ulcerative colitis.<sup>40</sup> In our study, we measured TNF $\alpha$  protein concentration spontaneously released by colonic biopsies. Using this simple method, we observed that low concentrations of TNF $\alpha$  were associated with steroid sensitivity. High TNF $\alpha$  concentration was associated with 50% resistance to corticosteroids. The low level of mucosal TNF $\alpha$  detected in  $\alpha$ PD-1-related colitis biopsies suggests that infliximab treatment might be less efficient at countering  $\alpha$ PD-1-induced colitis than  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis. The small cohort of patients with  $\alpha$ PD-1-induced colitis was a major limitation in this study, due to the poor relative incidence of this irAE. Further investigations in patients with  $\alpha$ PD-1-induced colitis are therefore needed to validate our results.

In conclusion, this study suggests that  $\alpha$ CTLA-4- and  $\alpha$ PD-1-induced colitis are two distinct immunohistopathological entities. To our knowledge, this work is the first to highlight distinct inflammatory infiltrates between  $\alpha$ CTLA-4- and  $\alpha$ PD-1-induced colitis, suggesting a different immune mechanism. Although based on a limited number of patients, the reduced levels of mucosal TNF $\alpha$  in  $\alpha$ PD-1-induced colitis biopsies suggest that infliximab might not be a good option in these patients, unlike patients with  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis.

## Funding

This study was supported by Gustave Roussy Cancer Campus, Fondation Gustave Roussy, the Institut national de la santé et de la recherche médicale [INSERM], the Direction Générale de l'Offre de Soins [GOLD TRANSLA 12–174], the Institut National du Cancer [GOLD 2012–062 N° Cancéropôle: 2012-1-RT-14-IGR-01], and SIRIC SOCRATE [INCa DGOS INSERM 6043], MMO programme: [ANR-10IBHU-0001]. CC was supported by a fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale [FRM].

## Conflict of Interest

NC reports grants from Cytune Pharma. CR has participated in advisory boards for Roche, GSK, Merck, Novartis, Amgen, BMS, and Novartis. KF has participated in advisory boards for Merck and Genentech. YL has participated in advisory boards for Merck, Roche, Genentech, Astra Zeneca. JA has participated in advisory boards for BMS and Roche. FC has participated in advisory boards for MSD [oncology] and Enterome and has been a speaker for Hospira and Mayoly Splindler. ES has participated in advisory board for Novartis. The other authors have no conflicts of interest to declare.

## Acknowledgments

Authors thank Jonathan M. Pitt for editorial assistance.

## Author Contributions

NC, CC, JA, and FC were involved in the study concept and design, drafting of the manuscript, obtaining funding and supervision of the study. NC, CC, and JA were also involved in acquisition, analysis, and interpretation of data. JYS was involved in the interpretation of data and critical review of the manuscript. ES, CR, DP, VR, KF, YL, NK, MC, CM, CM, LC, LB, AR, PL, and MC were involved in the acquisition of clinical, endoscopic, and immunological data.

## Supplementary Data

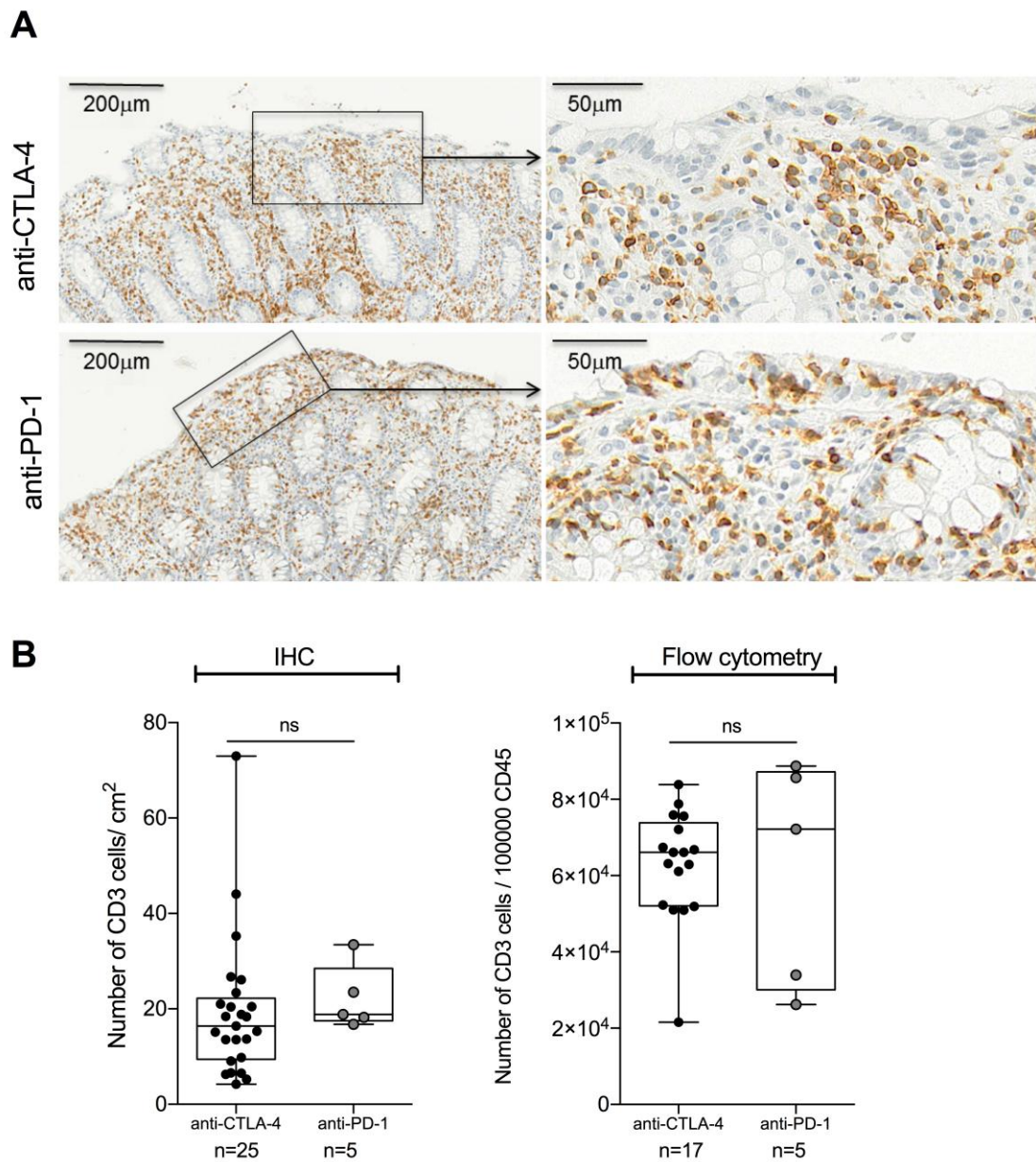
Supplementary data are available at *ECCO-JCC* online.



## References

- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;**363**:711–23.
- Robert C, Thomas L, Bondarenko I, *et al.* Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011;**364**:2517–26.
- Robert C, Schachter J, Long GV, *et al.*; KEYNOTE-006 investigators. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2015;**372**:2521–32.
- Garon EB, Rizvi NA, Hui R, *et al.*; KEYNOTE-001 Investigators. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015;**372**:2018–28.
- Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, *et al.*; CheckMate 025 Investigators. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2015;**373**:1803–13.
- Ferris RL, Blumenschein GJ, Fayette J, *et al.* Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2016;**375**:1856–67.
- Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, *et al.* Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015;**373**:1627–39.
- Nancey S, Boschetti G, Cotte E, *et al.* Blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 by ipilimumab is associated with a profound long-lasting depletion of Foxp3+ regulatory T cells: a mechanistic explanation for ipilimumab-induced severe enterocolitis? *Inflamm Bowel Dis* 2012;**18**:E1598–600.
- Lord JD, Hackman RC, Moglebust A, *et al.* Refractory colitis following anti-CTLA4 antibody therapy: analysis of mucosal FOXP3+ T cells. *Dig Dis Sci* 2010;**55**:1396–405.
- Weber JS, Kähler KC, Hauschild A. Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *J Clin Oncol* 2012;**30**:2691–7.
- Eigentler TK, Hassel JC, Berking C, *et al.* Diagnosis, monitoring and management of immune-related adverse drug reactions of anti-PD-1 antibody therapy. *Cancer Treat Rev* 2016;**45**:7–18.
- Champiat S, Lambotte O, Barreau E, *et al.* Management of immune checkpoint blockade dysimmune toxicities: a collaborative position paper. *Ann Oncol* 2016;**27**:559–74.
- Marthey L, Mateus C, Mussini C, *et al.* Cancer immunotherapy with anti-CTLA-4 monoclonal antibodies induces an inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2016;**10**:395–401.
- Verschuren EC, van den Eertwegh AJ, Wonders J, *et al.* Clinical, endoscopic, and histologic characteristics of Ipilimumab-associated colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016;**14**:836–42.
- Beck KE, Blansfield JA, Tran KQ, *et al.* Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J Clin Oncol* 2006;**24**:2283–9.
- Pagès C, Gornet JM, Monsel G, *et al.* Ipilimumab-induced acute severe colitis treated by infliximab. *Melanoma Res* 2013;**23**:227–30.
- Weber J, Thompson JA, Hamid O, *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II study comparing the tolerability and efficacy of ipilimumab administered with or without prophylactic budesonide in patients with unresectable stage III or IV melanoma. *Clin Cancer Res* 2009;**15**:5591–8.
- Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995;**3**:541–7.
- Chambers CA, Sullivan TJ, Allison JP. Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells. *Immunity* 1997;**7**:885–95.
- Jain N, Nguyen H, Chambers C, Kang J. Dual function of CTLA-4 in regulatory T cells and conventional T cells to prevent multiorgan autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:1524–8.
- Coquerelle C, Oldenhove G, Acolty V, *et al.* Anti-CTLA-4 treatment induces IL-10-producing ICOS+ regulatory T cells displaying IDO-dependent anti-inflammatory properties in a mouse model of colitis. *Gut* 2009;**58**:1363–73.
- Spranger S, Spaepen RM, Zha Y, *et al.* Up-regulation of PD-L1, IDO, and T[regs] in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8+ T cells. *Sci Transl Med* 2013;**5**:200ra116.
- Tumeh PC, Harvley CL, Yearley JH, *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014;**515**:568–71.
- Laurent S, Queirolo P, Boero S, *et al.* The engagement of CTLA-4 on primary melanoma cell lines induces antibody-dependent cellular cytotoxicity and TNF- $\alpha$  production. *J Transl Med* 2013;**11**:108.
- Maul J, Lodenkemper C, Mundt P, *et al.* Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25[high] T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005;**128**:1868–78.
- Chen H, Liakou CI, Kamat A, *et al.* Anti-CTLA-4 therapy results in higher CD4+ICOShi T cell frequency and IFN-gamma levels in both nonmalignant and malignant prostate tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:2729–34.
- Fu T, He Q, Sharma P. The ICOS/ICOSL pathway is required for optimal antitumor responses mediated by anti-CTLA-4 therapy. *Cancer Res* 2011;**71**:5445–54.
- Liakou CI, Kamat A, Tang DN, *et al.* CTLA-4 blockade increases IFN-gamma-producing CD4+ICOShi cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:14987–92.
- Baert F, Wouters K, D'Haens G, *et al.* Lymphocytic colitis: a distinct clinical entity? A clinicopathological confrontation of lymphocytic and collagenous colitis. *Gut* 1999;**45**:375–81.
- Tanaka M, Mazzoleni G, Riddell RH. Distribution of collagenous colitis: utility of flexible sigmoidoscopy. *Gut* 1992;**33**:65–70.
- Baroudjian B, Lourenco N, Pagès C, *et al.* Anti-PD1-induced collagenous colitis in a melanoma patient. *Melanoma Res* 2016;**26**:308–11.
- Berman D, Parker SM, Siegel J, *et al.* Blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 by ipilimumab results in dysregulation of gastrointestinal immunity in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunol* 2010;**10**:11.
- Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, *et al.* Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science* 1995;**270**:985–8.
- Komaki Y, Komaki F, Yamada A, *et al.* Meta-analysis of the risk of immune-related adverse events with anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 and anti-programmed death 1 therapies. *Clin Pharmacol Ther* 2017, Jan 24. doi: 10.1002/cpt.633. [Epub ahead of print.]
- Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25[+]CD4[+] regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000;**192**:303–10.
- Read S, Greenwald R, Izcue A, *et al.* Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol* 2006;**177**:4376–83.
- Currie AJ, Prosser A, McDonnell A, *et al.* Dual control of antitumor CD8 T cells through the programmed death-1/programmed death-ligand 1 pathway and immunosuppressive CD4 T cells: regulation and counter-regulation. *J Immunol* 2009;**183**:7898–908.
- Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J, *et al.* Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. *Lancet* 1999;**353**:459–61.
- Atreya R, Neumann H, Neufert C, *et al.* In vivo imaging using fluorescent antibodies to tumor necrosis factor predicts therapeutic response in Crohn's disease. *Nat Med* 2014;**20**:313–8.
- Olsen T, Goll R, Cui G, Christiansen I, Florholmen J. TNF-alpha gene expression in colorectal mucosa as a predictor of remission after induction therapy with infliximab in ulcerative colitis. *Cytokine* 2009;**46**:222–7.

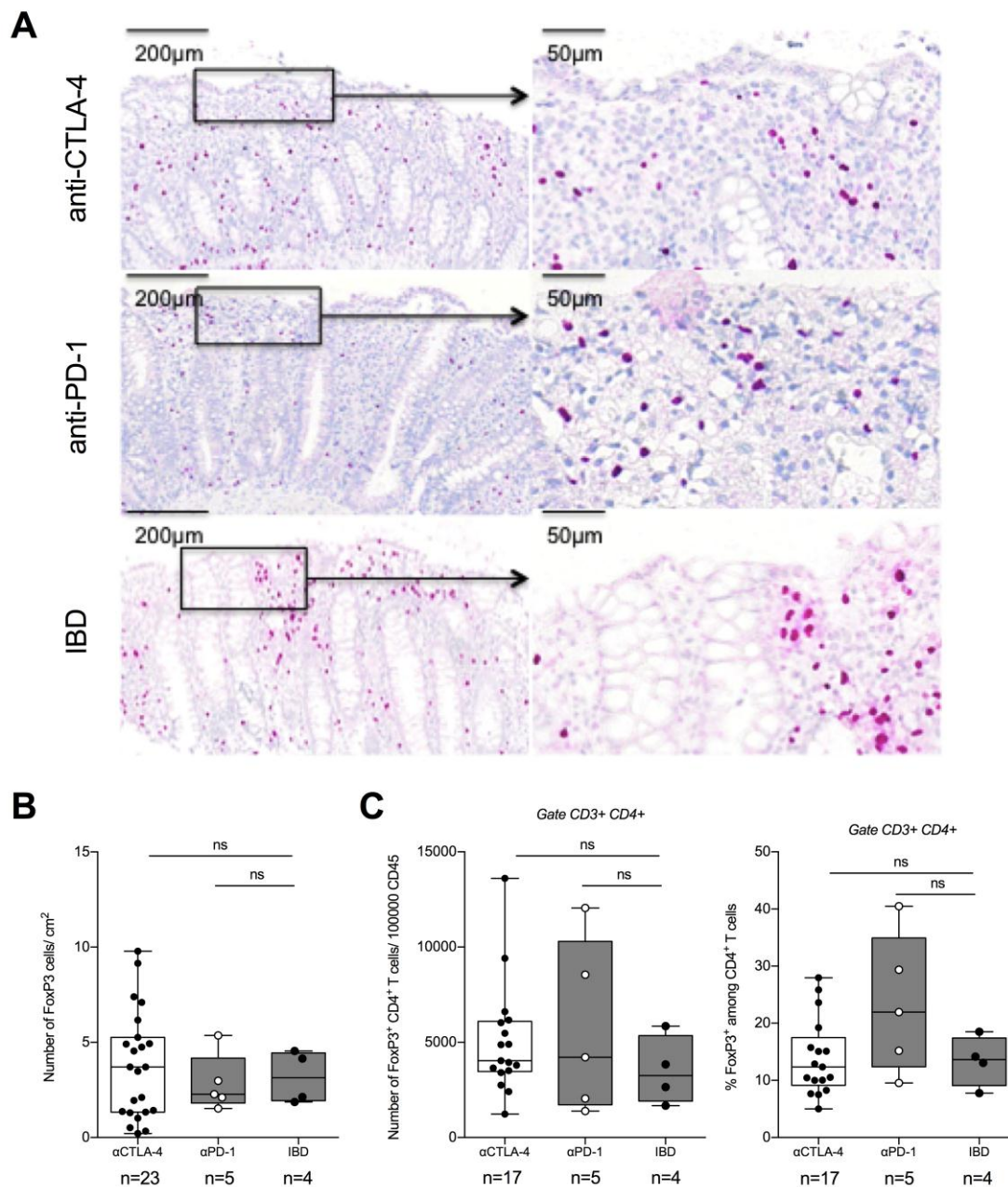
## Supplemental Figure 1



### Supplemental Figure 1: CD3<sup>+</sup> infiltration in $\alpha$ CTLA-4-induced colitis and $\alpha$ PD-1-induced colitis

**A.** Representative immunohistochemical detection of CD3<sup>+</sup> cells in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis (upper panel) and  $\alpha$ PD-1-induced colitis (lower panel). **B.** Immunohistochemical (left panel) and flow cytometry analysis (right panel) of absolute counts of CD3<sup>+</sup> T cells in  $\alpha$ CTLA-4- and  $\alpha$ PD-1-induced colitis. Each dot represents one patient. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , *ns* = not significant by Mann Whitney tests (B)

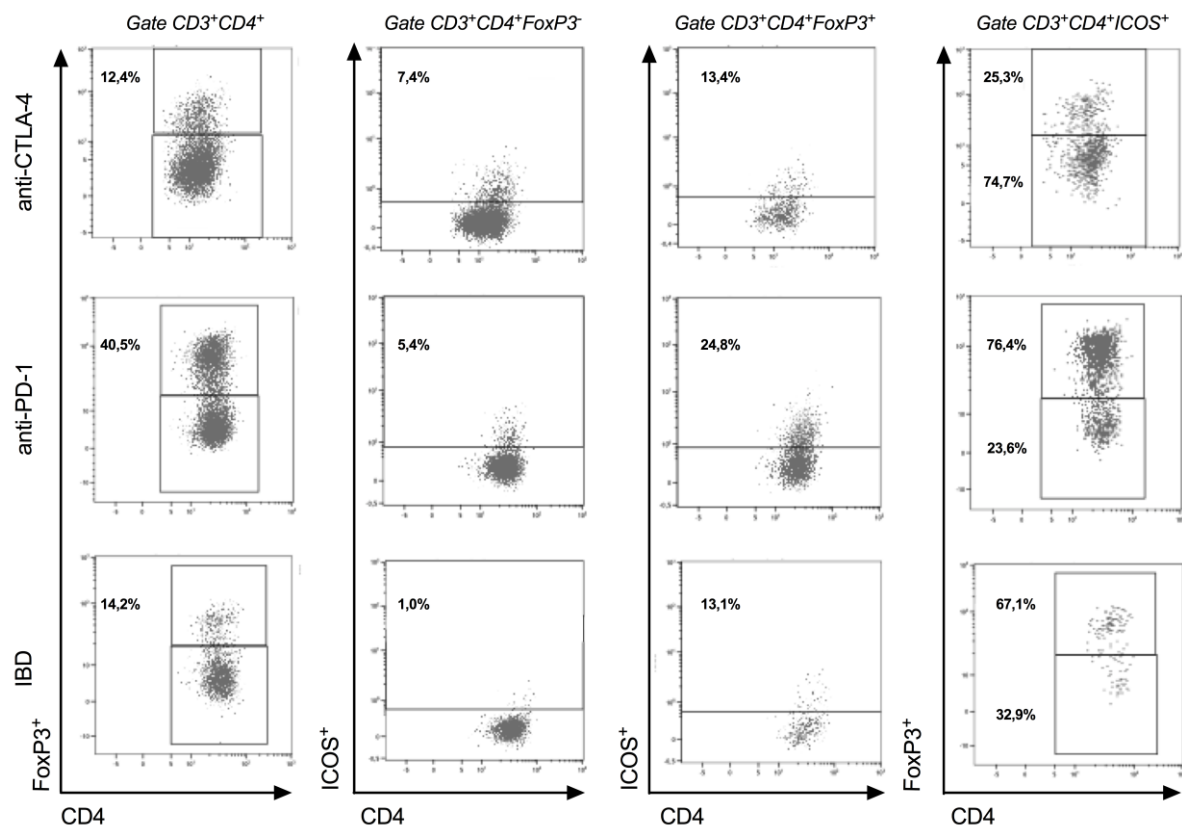
## Supplemental Figure 2



### Supplemental Figure 2: FoxP3<sup>+</sup> infiltration in $\alpha$ CTLA-4-induced colitis and $\alpha$ PD-1-induced colitis

A. Representative immunohistochemical detection of FoxP3<sup>+</sup> in  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis (upper panel),  $\alpha$ PD-1-induced colitis (middle panel) and IBD patients (lower panel). B. Immunohistochemical analysis of absolute counts of FoxP3<sup>+</sup> cells between  $\alpha$ CTLA-4-,  $\alpha$ PD-1-induced colitis and IBD patients. C. Flow cytometry analysis of absolute counts of FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells, and percentage of FoxP3<sup>+</sup> among CD4<sup>+</sup> T cells in  $\alpha$ CTLA-4-,  $\alpha$ PD-1-induced colitis and IBD patients. Each dot represents one patient. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, *ns* means not significant by Kruskal-Wallis test (B-C).

### Supplemental Figure 3



**Supplemental Figure 3: Representative dot plots of ICOS<sup>+</sup> Treg and Tconv cells in colon biopsies from patients with  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis,  $\alpha$ PD-1-induced colitis or IBD.**

Representative Dot plot of  $\alpha$ CTLA-4-induced colitis (upper panels),  $\alpha$ PD-1-induced colitis (middle panels) and IBD (lower panels). Intra-cellular FoxP3<sup>+</sup> expression among CD4<sup>+</sup> T cells (left panels), ICOS<sup>+</sup> expression within conventional CD4<sup>+</sup> T cells (Tconv) (middle left panels), ICOS<sup>+</sup> expression within Treg cells (middle right panels) and FoxP3<sup>+</sup> expression among ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells (right panels).

## Article 2.

« **Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab** » (*Annals of Oncology 2017*)

N. Chaput †, P. Lepage †, **C. Coutzac**, E. Soularue, K. Le Roux, C. Monot, L. Boselli, E. Routier, L. Cassard, M. Collins, T. Vaysse, L. Marthey, A. Eggermont, V. Asvatourian, E. Lanoy, C. Mateus, C. Robert † & F. Carbonnel †

**Contexte** L'ipilimumab est un anticorps monoclonal dirigé contre le CTLA-4, et a montré son efficacité dans le mélanome métastatique et, a ainsi reçu l'AMM dans cette indication. Les études ultérieures ont montré que seulement 18% des patients ont une réponse thérapeutique à long terme. De plus, environ 20% des patients traités par l'ipilimumab développaient des colites sévères, pouvant imposer l'interruption du traitement anti-cancéreux efficace. Des biomarqueurs prédictifs de la réponse clinique et/ou de la toxicité colique sont nécessaires pour optimiser la sélection des patients qui tireront bénéfice de ce traitement. Les colites induites par l'ipilimumab présentent des caractéristiques similaires avec les MICI. Il semble que l'inflammation colique associée à la dysbiose dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) est impliquée dans sa physiopathologie. De plus, des travaux récents établissent un lien entre le microbiote intestinal et la réponse anti-tumorale de l'anti-CTLA-4 dans des modèles précliniques. Se basant sur ces données, nous avons émis l'hypothèse que la réponse clinique et/ ou la survenue d'une colite induite par l'ipilimumab peut dépendre de la composition du microbiote intestinal. L'objectif de l'étude a été d'évaluer si le microbiote intestinal pouvait prédire la réponse anti-tumorale et/ou la survenue d'une colite chez les patients atteints de mélanome métastatique et traités par ipilimumab.

**Patients et Méthodes** Vingt-six patients avec un mélanome métastatique et traités par ipilimumab ont été prospectivement inclus. La composition du microbiote intestinal a été analysée par le séquençage des gènes de l'ARNr 16S en pré-thérapeutique et avant chaque

perfusion d'ipilimumab. Les patients ont été regroupés en cluster en fonction des espèces prédominantes dans leur microbiote intestinal. Un immunophénotypage des cellules mononuclées du sang périphérique a été étudié en parallèle.

**Résultats principaux** La composition du microbiote fécal en pré-thérapeutique est associée à la réponse anti-tumorale et à la survenue de la colite chez les patients atteints de mélanome métastatique et traités par ipilimumab. En comparaison avec les patients ayant un microbiote enrichi en *Bacteroides* (cluster B), les patients avec une flore enrichie en *Faecalibacterium* et autres *Firmicutes* (cluster A) ont une meilleure survie globale et sans progression. Chez les patients développant une colite induite par l'ipilimumab, l'enrichissement en *Firmicutes* (*Faecalibacterium prausnitzii* et *Gemmiger formicilis*) en pré-thérapeutique est associé à la survenue de colite, alors que les phylotypes de *Bacteroidetes* sont associés à l'absence de colite. Une faible proportion de Treg en périphérie est associée au cluster A, au bénéfice clinique à long terme et à la survenue de la colite. L'ipilimumab entraîne une induction plus importante de l'expression d'ICOS sur les LT CD4<sup>+</sup>, ainsi que du CD25 soluble sérique chez les patients appartenant au groupe enrichi en *Faecalibacterium* (cluster A).

**Conclusion** Le microbiote intestinal enrichi en *Faecalibacterium* en pré-thérapeutique est associé à la fois à une meilleure réponse clinique au traitement mais également à un risque plus élevé de développer une colite induite par l'ipilimumab chez les patients atteints d'un mélanome métastatique.

De façon inattendue, ces données nous révèlent qu'une flore intestinale enrichie en bactéries du phylum des *Firmicutes* connues pour être anti-inflammatoires et immunorégulatrices au niveau de la muqueuse intestinale est associée à la fois à la réponse anti-tumorale mais également au risque de développer une colite induite par l'ipilimumab.

ORIGINAL ARTICLE

# Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab

N. Chaput<sup>1,2†</sup>, P. Lepage<sup>3†</sup>, C. Coutzac<sup>1,4</sup>, E. Soularue<sup>1,4,5</sup>, K. Le Roux<sup>3</sup>, C. Monot<sup>3</sup>, L. Boselli<sup>1</sup>, E. Routier<sup>6</sup>, L. Cassard<sup>1</sup>, M. Collins<sup>4,5</sup>, T. Vaysse<sup>4,5</sup>, L. Marthey<sup>4,5</sup>, A. Eggermont<sup>6,7</sup>, V. Asvatourian<sup>8,9</sup>, E. Lanoy<sup>8,9</sup>, C. Mateus<sup>4</sup>, C. Robert<sup>4,6†</sup> & F. Carbonnel<sup>4,5\*,†</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunomonitoring in Oncology, CNRS-UMS 3655 and INSERM-US23, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif; <sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, Chatenay-Malabry; <sup>3</sup>Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Paris; <sup>4</sup>Faculty of Medicine, University Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre; <sup>5</sup>Department of Gastroenterology, Kremlin Bicêtre Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Le Kremlin Bicêtre; <sup>6</sup>Dermatology Unit, Department of Medicine, Gustave Roussy, Cancer Campus, Villejuif; <sup>7</sup>INSERM U1015, Gustave Roussy, Cancer Campus, Villejuif; <sup>8</sup>Biostatistics and Epidemiology Unit, Gustave Roussy Cancer Campus (GRCC), Villejuif; <sup>9</sup>University Paris-Saclay, Université Paris-Sud, UVSQ, CESP, INSERM, Villejuif, France

\*Correspondence to: Prof. Franck Carbonnel, Department of Gastroenterology, Kremlin Bicêtre Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), University Paris Sud, 78 rue du Général Leclerc, 94270, Le Kremlin Bicêtre, France. Tel: +33-1-45-21-74-11; E-mail: fcarbonnel7@gmail.com

†These authors contributed equally to this work.

**Background:** Ipilimumab, an immune checkpoint inhibitor targeting CTLA-4, prolongs survival in a subset of patients with metastatic melanoma (MM) but can induce immune-related adverse events, including enterocolitis. We hypothesized that baseline gut microbiota could predict ipilimumab anti-tumor response and/or intestinal toxicity.

**Patients and methods:** Twenty-six patients with MM treated with ipilimumab were prospectively enrolled. Fecal microbiota composition was assessed using 16S rRNA gene sequencing at baseline and before each ipilimumab infusion. Patients were further clustered based on microbiota patterns. Peripheral blood lymphocytes immunophenotypes were studied in parallel.

**Results:** A distinct baseline gut microbiota composition was associated with both clinical response and colitis. Compared with patients whose baseline microbiota was driven by *Bacteroides* (cluster B,  $n = 10$ ), patients whose baseline microbiota was enriched with *Faecalibacterium* genus and other Firmicutes (cluster A,  $n = 12$ ) had longer progression-free survival ( $P = 0.0039$ ) and overall survival ( $P = 0.051$ ). Most of the baseline colitis-associated phylotypes were related to Firmicutes (e.g. relatives of *Faecalibacterium prausnitzii* and *Gemmiger formicilis*), whereas no colitis-related phylotypes were assigned to Bacteroidetes. A low proportion of peripheral blood regulatory T cells was associated with cluster A, long-term clinical benefit and colitis. Ipilimumab led to a higher inducible T-cell COSTimulator induction on CD4+ T cells and to a higher increase in serum CD25 in patients who belonged to *Faecalibacterium*-driven cluster A.

**Conclusion:** Baseline gut microbiota enriched with *Faecalibacterium* and other Firmicutes is associated with beneficial clinical response to ipilimumab and more frequent occurrence of ipilimumab-induced colitis.

**Key words:** ipilimumab, colitis, melanoma, microbiota

## Introduction

Immunotherapy has become a major therapeutic strategy in oncology. The trail was blazed by ipilimumab, an antibody directed against Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4), which demonstrated a significant survival benefit in patients with

metastatic melanoma (MM) [1, 2]. It has previously been reported that 22% of MM patients treated with ipilimumab have prolonged survival [3].

Ipilimumab reactivates T cells and therefore affects a much wider repertoire of T cells than those involved only in the anti-cancer response [4, 5]. This probably explains why CTLA-4

blockade is associated with immune-related adverse events (irAE) [6, 7]. Colitis is the most frequent irAE associated with CTLA-4 blockade [7, 8] and severe colitis may need anti-TNF therapy and sometimes colectomy [8, 9]. In this context, reliable biomarkers of efficacy and/or toxicity ensuring the risk/benefit ratio optimization of this drug would be of paramount interest. Colitis due to ipilimumab shares several features with inflammatory bowel disease (IBD) [9]. In IBD, dysregulated inflammation is associated with a dysbiotic composition of the intestinal microbiota, which is proposed to be the antigenic driver of the disease [10–12]. In addition, studies carried out in mice have suggested that the microbiota composition is critical to promote an anti-tumor immune response to anti CTLA-4 and anti PDL-1 monoclonal antibodies [13, 14].

Based on these data, we hypothesized that the ipilimumab-induced anti-cancer response, as well as immune-related enterocolitis associated with this agent, may depend on the gut microbiota. This prospective study was aimed to test this hypothesis in patients with MM treated with ipilimumab.

## Patients, materials and methods

### Data and materials availability

All data and materials are available from the corresponding author upon request. DNA sequence reads from this study have been submitted to the NCBI under the Bioproject ID PRJNA379764 and are available from the Sequence Read Archive (Biosamples accession numbers SAMN06620410 - SAMN06620492).

### Patients

Patients with MM treated with ipilimumab were prospectively enrolled at the Gustave Roussy Cancer Campus between March 2013 and December 2014. Patients were informed of the study and consented to participate. This study was approved by the Kremlin Bicêtre Hospital Ethics Committee (GOLD study; SC12-018; ID-RCB-2012-A01496-37) and all procedures were carried out in accordance with the Declaration of Helsinki. Patients had a pre-specified clinical workup; feces and blood were collected at baseline ( $V_1$ ), before each ipilimumab infusion ( $V_2$ ,  $V_3$ ,  $V_4$ ), at the end of treatment (i.e. 3 weeks after the last infusion;  $V_5$ ) and, if present, at the time of colitis occurrence ( $V_{Tox}$ ). Ipilimumab was administered intravenously every 3 weeks at a dose of 3 or 10 mg/kg and could be continued after  $V_4$ , at a maintenance dose of one infusion every 12 weeks, in patients whose disease was controlled (response or stable disease). When immune-mediated enterocolitis ( $\geq$  grade III) was suspected, patients were referred to the Gastroenterology Department of Bicêtre Hospital. The diagnosis of ipilimumab-induced colitis was made in patients who had endoscopic signs of inflammation and no other cause of colitis, such as ischemia and infection (stool tests for bacterial pathogens and *Clostridium difficile* toxin had to be negative).

Response to ipilimumab was assessed by several criteria. Long-term clinical benefit was defined by response decrease of tumor burden  $\geq$ 50% relative to baseline, according to immune related response criteria [15, 16] or stable disease (decrease of tumor burden of less than 50% but with less than 25% increase relative to nadir) for more than 6 months. Patients with poor benefit were defined as patients with a lack of long-term benefit, i.e. with progression-free survival (PFS) of  $<$ 6 months (with immune related progressive disease defined as a confirmed increase in tumor burden  $\geq$ 25% relative to nadir) [15, 16]. All responses were confirmed by a subsequent assessment no less than 4 weeks from the date first documented. Use of antibiotics was also documented before each ipilimumab

injection and is included in supplementary Table S3, available at *Annals of Oncology* online.

### Bacterial composition assessment by high-throughput sequencing

Fecal samples were collected anaerobically at baseline ( $V_1$ ), before each ipilimumab infusion ( $V_2$ ,  $V_3$ ,  $V_4$ ), at the end of the treatment ( $V_5$ ) and at the time of colitis ( $V_{Tox}$ ) and were kept at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. Total DNA was extracted from fecal sample aliquots ( $\sim$ 150 mg), as previously described using both physical and chemical lysis [17]. Culture-independent 16S rRNA gene sequencing was carried out on 83 fecal samples ( $n=26$  patients; supplementary Table S3, available at *Annals of Oncology* online). Both 454 pyrosequencing (Life Sciences, a Roche company, Branford, CT) and MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA) technologies were applied on the  $V_3$ – $V_4$  16S rRNA gene region. Gut bacterial composition was determined prospectively without knowledge of colitis or of clinical benefit, which was determined at the end of the study. Details of bacterial composition assessment by high-throughput sequencing and statistical analyses can be found in supplementary materials, available at *Annals of Oncology* online.

### Fresh whole blood immune monitoring and soluble immune markers

Blood samples were collected at baseline ( $V_1$ ), before each ipilimumab infusion ( $V_2$ ,  $V_3$ ,  $V_4$ ), at the end of treatment ( $V_5$ ) and at the time of colitis ( $V_{Tox}$ ). Phenotyping was carried out on fresh whole blood or on fresh peripheral blood mononuclear cells isolated by Ficoll density gradient and frozen for later analyses (see supplementary materials, available at *Annals of Oncology* online). All serum samples were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until further analysis of soluble immune markers of inflammation (IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, TNF $\alpha$ , sCD25) and bacterial translocation (sCD14). Details of immune monitoring can be found in supplementary materials, available at *Annals of Oncology* online. We monitored memory T cells and inducible T-cell Costimulator (ICOS) induction on T cells because previous studies had demonstrated that both could be related to clinical responses [18]. Regulatory T cells play a crucial role in the maintenance of immune homeostasis in the gut and are supposed to be a major target for anti-CTLA-4 treatment [19]. The heterodimer  $\alpha 4\beta 7$  plays a crucial role in the intestinal homing of T cells; we monitored  $\alpha 4^+\beta 7^+$  T cells to gain some insight in the mechanism of ipilimumab-induced colitis. We monitored soluble immune markers of inflammation and bacterial translocation as a complement to microbiota composition. Indeed, microbiota composition affects gut barrier function, local as well as systemic immunity [20–25, 26].

### Statistical analyses

A formal sample-size calculation was not carried out for this pioneering study. Associations between microbiota dominant profile and immunological parameters were assessed with the Spearman correlation coefficient and a two-sided Wilcoxon test. No adjustment for multiple comparisons was made because of the exploratory component of the analyses. Fisher's exact test was used to examine the association between microbiota clusters and immune parameters; microbiota clusters and colitis, as well as microbiota clusters and clinical responses.

Overall survival (OS) and PFS according to intestinal microbiota (cluster A versus cluster B) and according to the number of conventional CD4 $^+$  T cells (low number of conventional CD4 versus high number of conventional CD4) were estimated using the Kaplan–Meier method and compared using the log-rank test.

When considering the occurrence of toxicity, progression and death lead to informative censoring, because when patients are censored at progression or death, their risk of toxicity could differ from that of patients who are not censored. Competing risk analysis is a method to deal with competing events, in order to avoid selection bias induced by informative censoring.



Therefore, toxicity cumulative incidence function (CIF) was estimated through a competing risk analysis in which toxicity was the event of interest, death or progression was the competing event and patients alive without progression or toxicity at their last follow-up were censored from the date of last follow-up. The toxicity CIFs in the different gut microbiota clusters and for the different conventional CD4 levels were estimated using the SAS macro %CIF and compared using the stratified Gray's test [27, 28]. These analyses were carried out using SAS software, Version 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

## Results

### Clinical characteristics of the patients

Fifty-five patients were included in the study and followed-up for at least 6 months. Among them, 13 patients did not receive ipilimumab, while 4 patients received only a single infusion of ipilimumab and died soon thereafter due to their melanoma; they were therefore excluded from further analyses. Among the 38 remaining patients, 26 provided fecal samples at baseline (i.e. before the first dose of ipilimumab) for microbiota analysis. Nine of these 26 patients (34.6%) had a long-term clinical benefit and seven (26.9%) developed an immune-mediated colitis. The clinical characteristics of patients with or without colitis and with or without long-term clinical benefit are shown in supplementary Tables S1 and S2, available at *Annals of Oncology* online, respectively.

### Microbiota composition is not modified by ipilimumab treatment, except at the time of colitis

The gut microbiota was not significantly modified over the course of the ipilimumab treatment. Main bacterial phyla, Firmicutes and Bacteroidetes, remained stable over time (supplementary Figure S1A, available at *Annals of Oncology* online). Even though bacterial genera proportions differed between the different time points, they were not significantly altered by ipilimumab treatment (Wilcoxon test  $P > 0.05$ ; supplementary Figure S1B, available at *Annals of Oncology* online). Likewise, diversity was not altered by ipilimumab injections as assessed by both Shannon and Simpson indices (supplementary Figure S1C, available at *Annals of Oncology* online). Altogether these data indicate that ipilimumab does not induce a gut microbial dysbiosis in patients with MM.

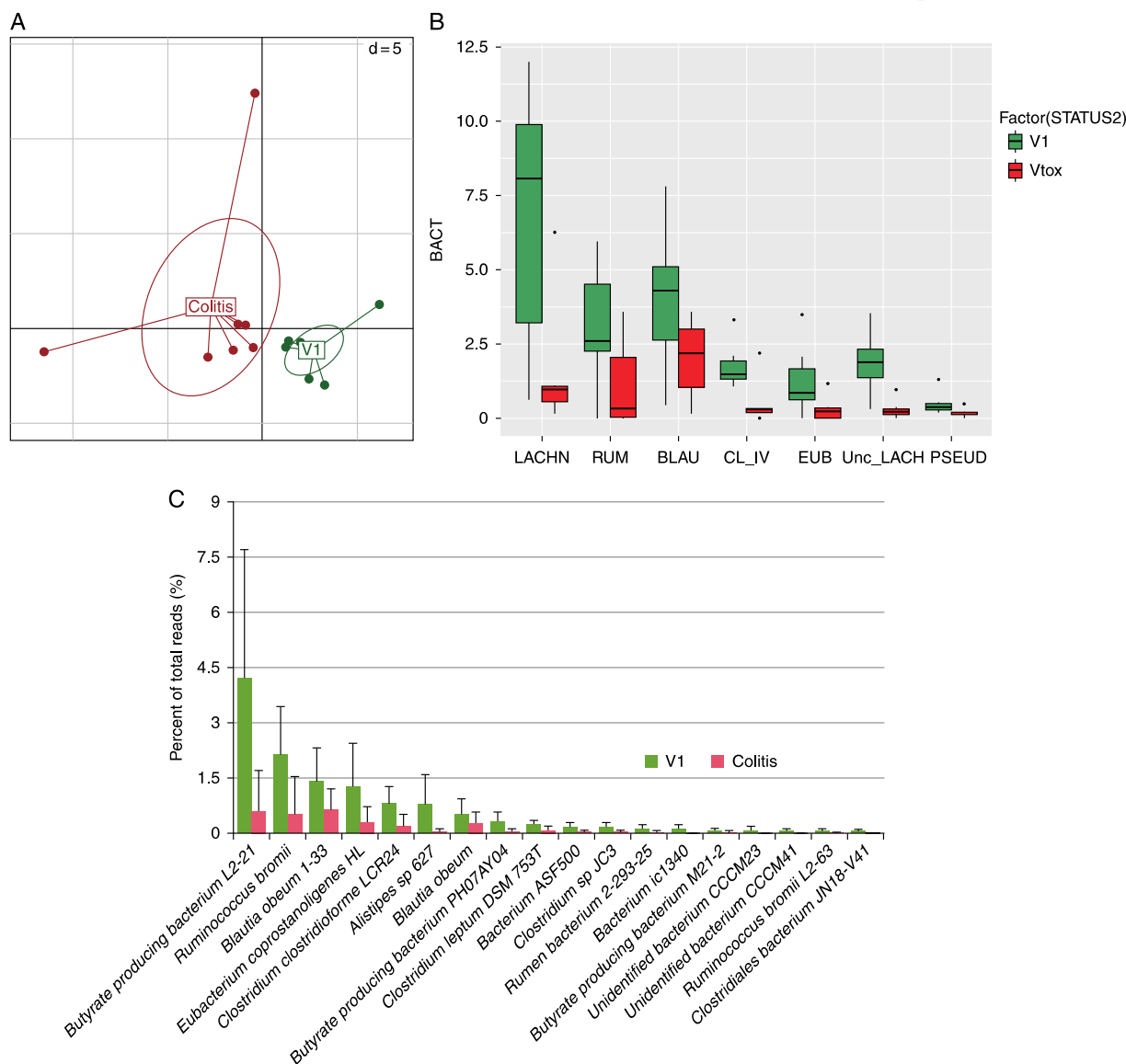
Seven patients provided fecal samples both at baseline ( $V_1$ ) and during colitis ( $V_{tox}$ ). Immune-related colitis was associated with a shift in the gut microbial composition as highlighted on the principal component analysis (PCA; Figure 1A). These differences were significant at the family level (Wilcoxon test,  $P = 0.0049$ ) and at the genus level ( $P = 0.0059$ ). The proportions of seven genera were significantly reduced by at least twofold at  $V_{tox}$ , compared with  $V_1$  (Figure 1B). They all belonged to the Firmicutes phylum (*Ruminococcus*, *Lachnospiraceae incertae sedis*, *Blautia*, *Clostridium IV*, *Eubacterium*, unclassified *Lachnospiraceae* and *Pseudoflavonifractor*) and were dominant members of the microbiota. Similarly, 18 bacterial isolates, mostly Firmicutes, were significantly reduced between  $V_1$  and  $V_{tox}$  (paired Student's  $t$ -test  $P < 0.05$ , Figure 1C). Finally, colitis was associated with a decreased bacterial diversity, as reflected by

a lower Shannon diversity index at the time of colitis ( $V_1$  Shannon = 5.58,  $V_{tox}$  Shannon = 4.65; paired Student's  $t$ -test  $P = 0.042$ ).

### Baseline microbiota composition is associated with subsequent clinical response and immune-related colitis

At  $V_1$ , inter-class PCA based on genera composition showed a significant clustering of patients depending on their clinical benefit in response to ipilimumab, either long-term clinical benefit or poor clinical benefit (Monte-Carlo test,  $P = 0.0090$ ; Figure 2A). This was also true at finer taxonomic levels such as species or OTUs composition ( $P = 0.0050$  and  $P = 0.0080$  respectively). Moreover, fecal microbiota at  $V_1$  allowed the correct classification of 84.6% of patients into either the long-term or poor clinical benefit category, and the accuracy reached more than 99% (5000 bootstraps) for patients with poor benefit, as assessed by a Random Forest analysis. The receiver-operating characteristic curve provided an area under the curve (AUC) of 0.77, which indicates a fair classification based on overall microbial composition. Main genera accounting for this stratification are *Faecalibacterium*, *Gemmiger*, *Bacteroides* and *Clostridium XIVa*, and when proportions of these genera were solely considered for testing the stratification the classification power increased and the score was nearly excellent (AUC = 0.895; supplementary Figure S2, available at *Annals of Oncology* online). While high proportions of *Bacteroides* were present at baseline in patients with poor clinical benefit (Wilcoxon test,  $P = 0.034$ ), *Faecalibacterium* percentages were significantly higher in patients with long-term benefit ( $P = 0.0092$ ; Figure 2B). Baseline fecal microbiota composition was also significantly associated with patients' OS and survival longer than 18 months (Wilcoxon test,  $P = 0.011$ ; Figure 2C). All patients with an OS longer than 18 months could indeed be classified based on their gut microbial composition at  $V_1$  and all showed higher proportions of OTUs affiliated to Firmicutes: *Ruminococcus* and *Lachnospiraceae* genus (relatives of *Faecalibacterium prausnitzii* L2-6, *Gemmiger formicilis* and *butyrate-producing bacterium* SS2-1; Figure 2D). It should be noted that although prescription of antibiotics may alter microbiota composition, antibiotics before ipilimumab treatment does not influence baseline dominant microbiota and none of the potentially predictive OTUs or bacterial taxon were associated with antibiotic use (supplementary Figure S3, available at *Annals of Oncology* online).

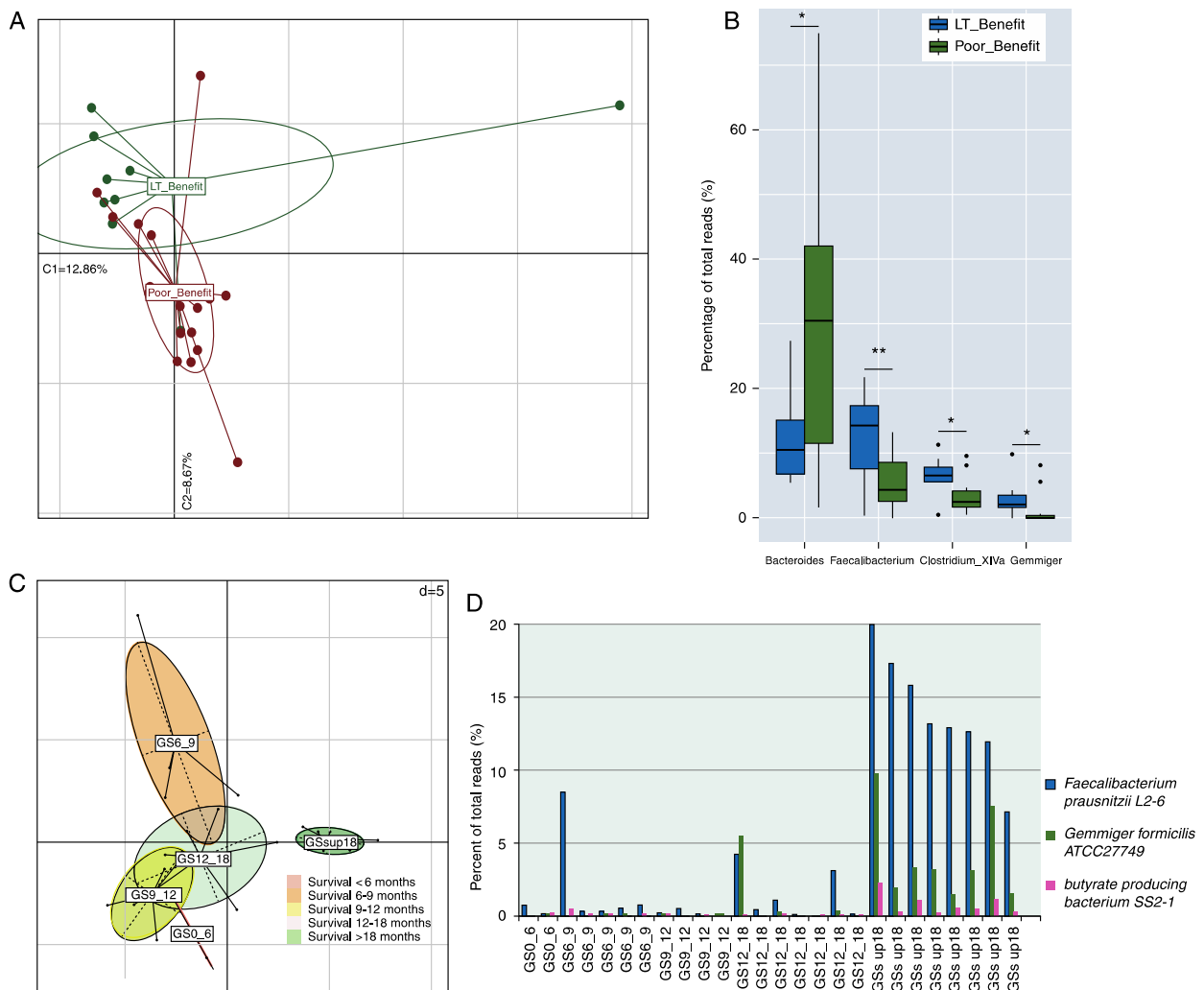
When the microbiota composition of patients was considered at baseline independently from their clinical characteristics and without *a priori* hypotheses ( $k$ -means clustering algorithm and Calinski-Harabasz index), three groups of patients emerged that were defined as clusters: clusters A, B and C. The inter-class PCA based on genera composition depending on belonging to any of these three clusters highlighted that this stratification was significant (Monte-Carlo test,  $P = 0.00099$ ; Figure 3A). Microbiota of patients belonging to cluster A ( $n = 12$  at baseline) was driven by *Faecalibacterium* and other Firmicutes (unclassified *Ruminococcaceae*, *Clostridium XIVa* and *Blautia*). Cluster B ( $n = 10$  at baseline) was enriched in *Bacteroides*, and cluster C ( $n = 4$  at baseline) was enriched in *Prevotella* (Figure 3B). Clinical characteristics of patients according to microbiota clustering are described in supplementary Table S4, available at *Annals*



**Figure 1.** Gut microbiota at baseline and during colitis in patients with metastatic melanoma treated with ipilimumab. (A) Principal component analysis representation of patient distribution based on bacterial genera composition between baseline visit (V<sub>1</sub>) and colitis. Seven patients had fecal samples collected at both baseline and time of colitis onset. Monte-Carlo simulated  $P$ -value=0.0059. Component 1 explains 13.59% of variance; component 2 explains 11.45% of variance. (B) Relative abundance of dominant (>1% of total reads) gut microbial genera significantly reduced during colitis (V<sub>tox</sub>) when compared with baseline (V<sub>1</sub>). LACHN, *Lachnospiracea incertae sedis*; RUM, *Ruminococcus*; BLAU, *Blautia*; CL\_IV, *Clostridium* IV; EUB, *Eubacterium*; Unc\_LACH, unclassified *Lachnospiraceae*; PSEUD, *Pseudoflavonifractor* (paired  $t$ -test  $P$ <0.05 for all genera). (C) Proportions as percent of total reads of significantly impacted bacterial isolates during colitis (V<sub>tox</sub>) when compared with baseline (V<sub>1</sub>). Only significant (paired  $t$ -test  $P$ <0.05) data are presented.

of Oncology online. Cluster A was associated with longer PFS than cluster B ( $P=0.0039$ ; Figure 3D) and, to a lesser extent, longer OS ( $P=0.051$ ; Figure 3C). Most of the 22 patients from the *Bacteroides*-driven cluster B (80%) received subsequent treatments, including anti-PD-1 agents in 50% of the patients while 58% of patients from the *Faecalibacterium*-driven cluster A were treated with subsequent therapies, but only 25% of them received anti-PD-1 agents. Cluster A was also associated with a higher proportion of long-term clinical benefit (8/12; 67%) compared with cluster B (0/10;  $P=0.0017$ , Fisher's exact test).

At the phyla level, microbiota of patients prone to develop colitis was enriched in Firmicutes at baseline (Wilcoxon test,  $P=0.009$ ), while high proportions of Bacteroidetes was observed in patients who did not develop colitis ( $P=0.011$ ; Figure 4A). In competing risk analysis, belonging to cluster A (driven by *Faecalibacterium* and other Firmicutes) tended to be associated with a shorter colitis-free cumulative incidence compared with cluster B (driven by *Bacteroides*) (Gray's test;  $P=0.054$ , Figure 4B). Using linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis, 15 bacterial OTUs were detected as potential biomarkers

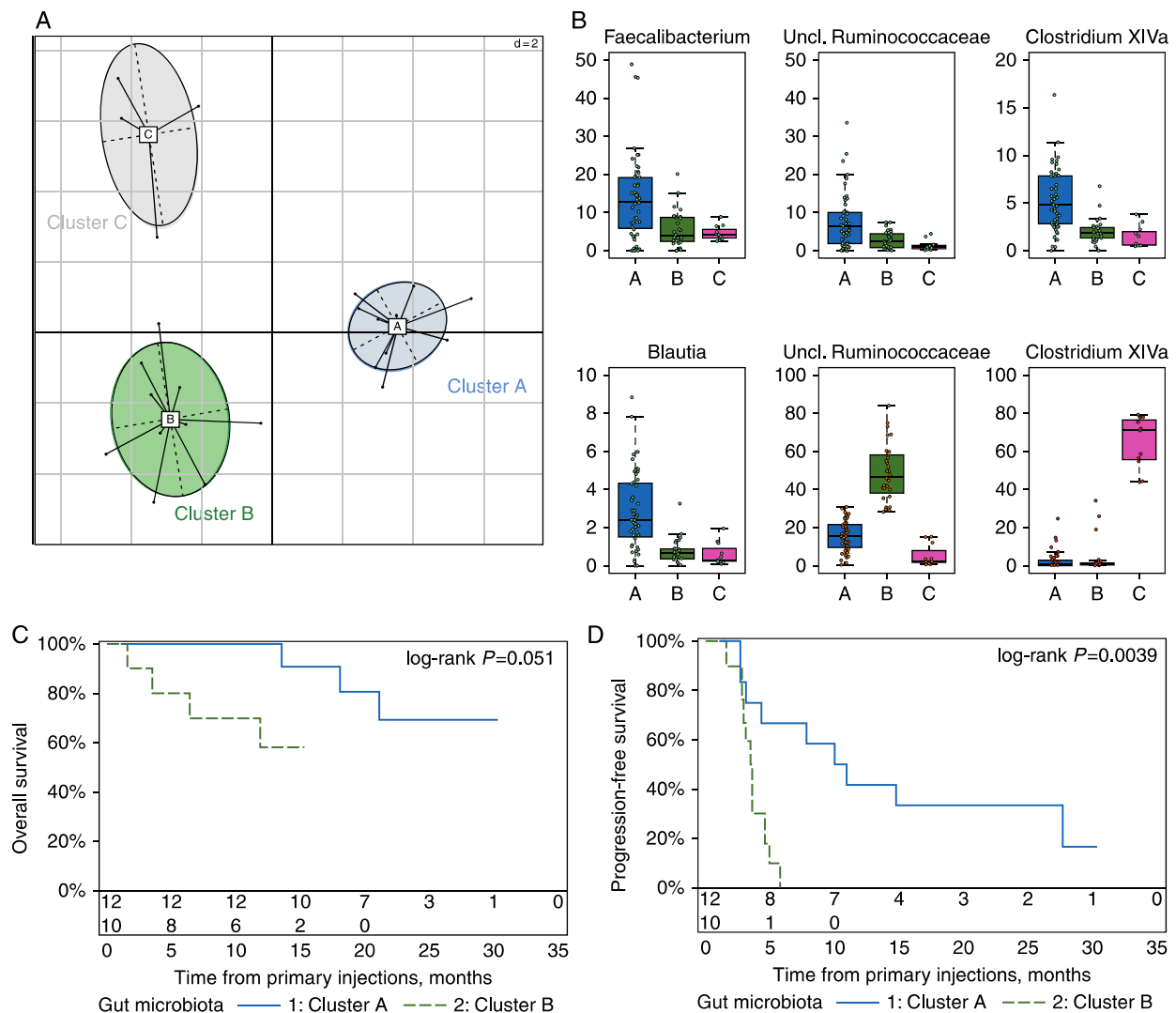


**Figure 2.** Baseline gut microbiota as a predictor of response to ipilimumab. (A) Principal component analysis representation of patients' distribution based on bacterial genera composition at baseline ( $V_1$ ) depending on the benefit of ipilimumab treatment; LT Benefit: long-term benefit (in green) versus Poor Benefit (in dark red). Component 1 explains 12.86% of variance; component 2 explains 8.67% of variance. Monte–Carlo simulated  $P$ -value=0.0090. (B) Boxplot of the percentages of four dominant (>1% of total reads) genera differentially represented between both groups, i.e. *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Clostridium XIVa* and *Gemmiger*; LT\_Benefit, long-term benefit versus Poor Benefit; \* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.001. (C) Inter-class principal component analysis representation of patient distribution based on bacterial genera composition at baseline ( $V_1$ ) depending on overall survival time following ipilimumab treatment; GS0\_6: overall survival ranging from 0 to 6 months ( $n=2$ ), GS6\_9: overall survival ranging from 6 to 9 months ( $n=5$ ), GS9\_12: overall survival ranging from 9 to 12 months ( $n=4$ ), GS12\_18: overall survival ranging from 12 to 18 months ( $n=7$ ), GSsup18: overall survival superior to 18 months ( $n=8$ ). Monte–Carlo simulated  $P$ -value= 0.011. (D) Percentages of three specific OTUs highlighted as biomarkers at baseline ( $V_1$ ) of overall survival duration >18 months. Each patient's microbiota are presented in the graph. GS0\_6: overall survival ranging from 0 to 6 months ( $n=2$ ), GS6\_9: overall survival ranging from 6 to 9 months ( $n=5$ ), GS9\_12: overall survival ranging from 9 to 12 months ( $n=4$ ), GS12\_18: overall survival ranging from 12 to 18 months ( $n=7$ ), GSsup18: overall survival >18 months ( $n=8$ ).

either of colitis-free progression or colitis onset during ipilimumab treatment (Figure 4C). Five (out of six) OTUs from the Bacteroidetes phylum (such as *B. uniformis*, *B. vulgatus* and *Parabacteroides distasonis*) were associated with absence of colitis, whereas OTUs associated with subsequent colitis related mostly to the Firmicutes phylum (8/9 OTUs). Several of these potential colitis-predictive baseline OTUs (relatives of *F. prausnitzii* L2-6, *butyrate producing bacterium* L2-21 and *G. formicilis* ATCC 27749) were also associated with longer OS.

### Baseline immune parameters related to microbiota clustering, clinical benefit and ipilimumab-induced colitis

Twenty-six patients had both immune monitoring and microbiota composition analysis at  $V_1$ . Patients from cluster C could not be included in this analysis due to the low number of patients belonging to this cluster ( $n=4$ ). Since patients who belonged to cluster A ( $n=12$ ) and cluster B ( $n=10$ ) had no differences in



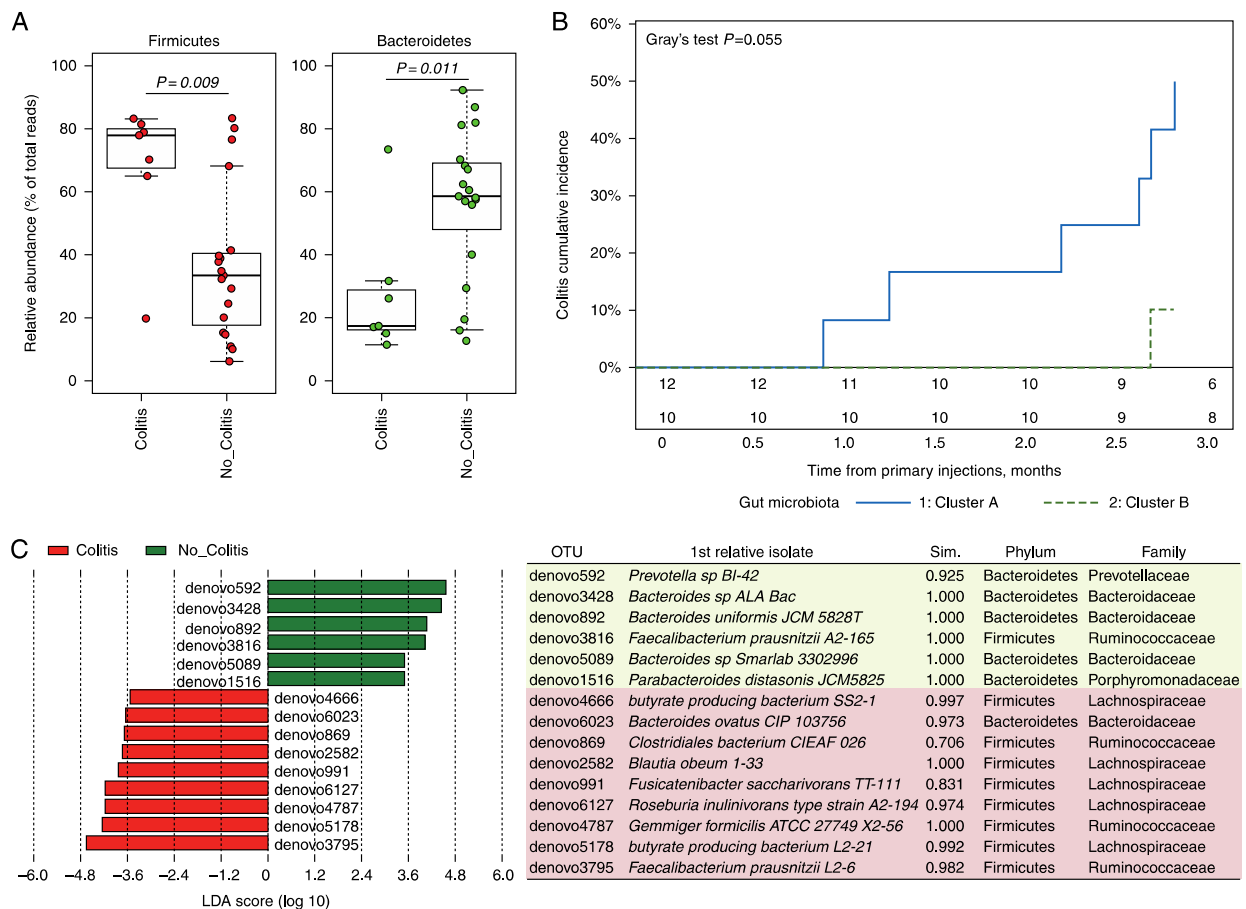
**Figure 3.** Baseline Gut microbiota composition predicts clinical response to ipilimumab. (A) Inter-class principal component analysis representation of patient's stratification into 3 statistically robust clusters (A, B and C) at baseline ( $V_1$ ). Monte-Carlo simulated  $P$ -value=0.00099. (B) Bacterial genera discriminating the 3 different clusters at baseline were assessed with a Random Forest analysis, and confirmed with a Wilcoxon test. Percentage of reads for each of these six genera is represented for each cluster. Genera significantly (Wilcoxon test) overrepresented in patients from cluster A are in blue, genus significantly overrepresented in patients from cluster B is in green, and genus significantly overrepresented in patients from cluster C is in grey. (C) Baseline gut microbiota composition and overall survival (OS). Kaplan-Meier survival curves of patients classified into two groups according to clusters, cluster A versus cluster B. (D) Baseline gut microbiota composition and progression-free survival. Kaplan-Meier curves of patients classified into two groups according to clusters, cluster A versus cluster B.  $P$  values are indicated on each graph.

absolute counts of peripheral-blood  $CD4^+$  and  $CD8^+$  T cells (supplementary Table S5, available at *Annals of Oncology* online), the main T cell subpopulations were considered as a percentage. Patients who belonged to the *Faecalibacterium*-driven cluster A had a low proportion of baseline regulatory T cells (Tregs), and had a significantly lower proportion of baseline  $\alpha 4^+\beta 7^+$   $CD4^+$  ( $P=0.045$ ) and  $\alpha 4^+\beta 7^+$   $CD8^+$  ( $P=0.034$ ) T cells, compared with those who belonged to the *Bacteroides*-driven cluster B (Figure 5A).

Patients with long-term benefit tended to have a lower frequency of regulatory T cells ( $P=0.056$ ) and a lower frequency

of  $\alpha 4^+\beta 7^+$   $CD4^+$  ( $P=0.015$ ) and  $\alpha 4^+\beta 7^+$   $CD8^+$  ( $P=0.0081$ ) T cells, compared with those with poor clinical benefit (Figure 5B). Although serum concentrations of several biomarkers of inflammation (IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, TNF $\alpha$ , sCD25) and sCD14 considered as a marker of bacterial invasion (translocation) were measured, none of these were associated with any cluster or clinical benefit at baseline (supplementary Tables S5 and S6, available at *Annals of Oncology* online).

Patients who developed ipilimumab-induced colitis tended to have significantly higher absolute numbers of  $CD4^+$  T cells ( $P=0.053$ ) and had significantly lower levels of IL-6, IL-8 and

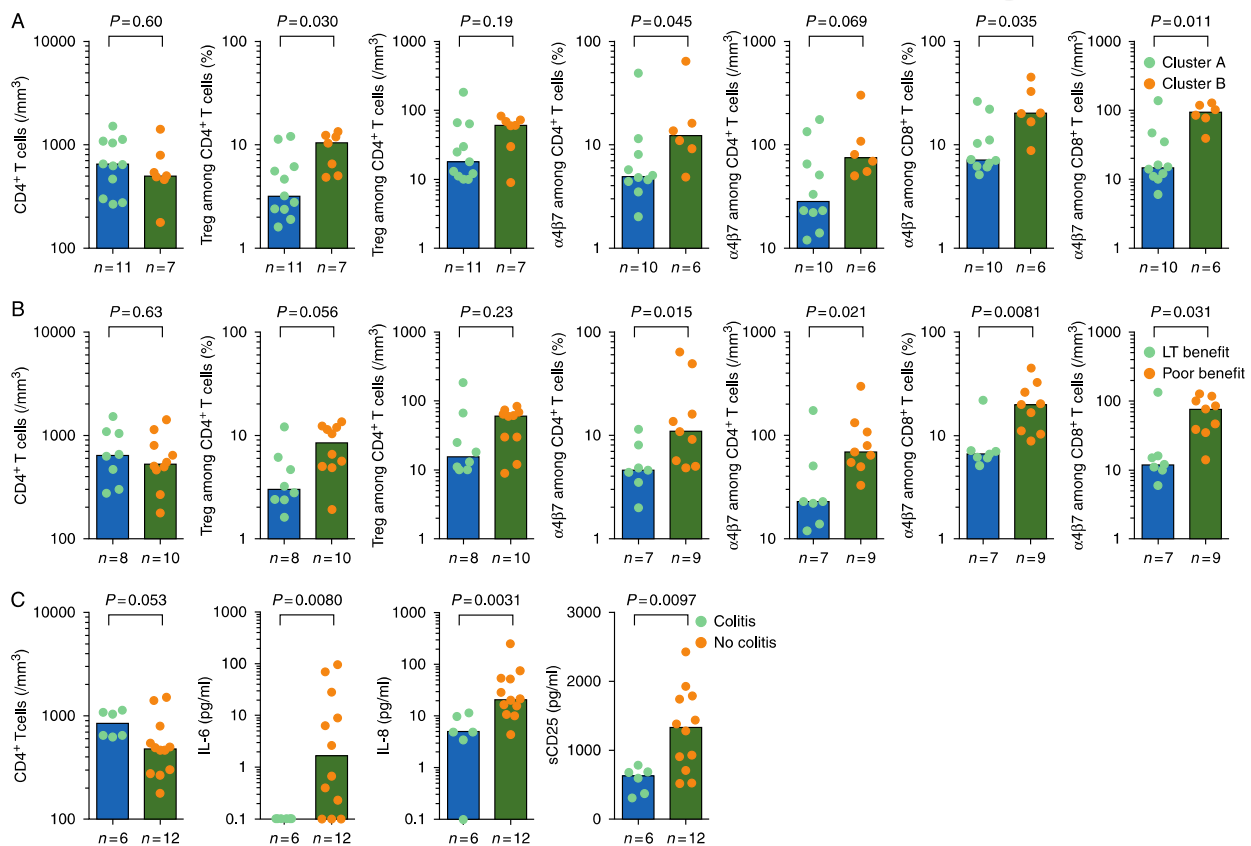


**Figure 4.** Gut microbiota composition at baseline predicts ipilimumab-induced colitis. (A) Boxplot of relative abundance of the two dominant phyla Firmicutes and Bacteroidetes at baseline between patients prone to or resistant to ipilimumab-induced colitis. A Wilcoxon test has been applied to assess significance and  $P$ -values are indicated on the graph. (B) Colitis cumulative incidence (Gray's test) of patients classified into two groups according to clusters, cluster A versus cluster B.  $P$  values are indicated on the graph. (C) OTUs predictive of colitis development during ipilimumab treatment. LefSe uses linear discriminant analysis (LDA) to estimate the effect size of each differentially abundant feature (i.e. bacterial OTU). On the left panel, OTUs in red are biomarkers of colitis development (Colitis). OTUs in green are biomarkers of the absence of colitis development (No\_Colitis). Best biomarkers show the highest absolute LDA score with a minimal threshold of 3.5 (i.e. OTU denovo592 for the No\_Colitis group and OTU denovo3795 for the Colitis group). Right panel indicates the taxonomic affiliation of each of these OTUs. Sim.: similarity between the OTU read and the first assigned isolate 16S sequence, assessed by the RDP Sab\_score. The RDP S\_ab score is a percentage of shared 7-mers between two sequences.

sCD25 at baseline compared with patients without colitis (Figure 5C; supplementary Table S7, available at *Annals of Oncology* online). In competing risk analysis, patients with high numbers of conventional CD4<sup>+</sup> T cells had a shorter colitis-free cumulative incidence, compared with those with low numbers of conventional CD4<sup>+</sup> T cells ( $P=0.0038$ , supplementary Figure S4, available at *Annals of Oncology* online). The median percentage of Tregs were lower before introduction of ipilimumab in patients who developed colitis during the course of ipilimumab compared with patients without colitis (2.5% versus 8.4%,  $P=0.018$ ). However, absolute numbers of Tregs were not significantly different (supplementary Table S7, available at *Annals of Oncology* online). None of the other CD4<sup>+</sup> T cell subpopulations at baseline were related to colitis onset (supplementary Table S7, available at *Annals of Oncology* online).

### The ICOS molecule is significantly up-regulated on CD4<sup>+</sup> T cells after ipilimumab treatment in patients who belong to *Faecalibacterium*-driven cluster A

Since immune parameters were monitored longitudinally, specific changes in immune activation during the course of ipilimumab treatment were assessed in patients from cluster A versus B. During ipilimumab treatment, ICOS was significantly increased on conventional CD4<sup>+</sup> T and Treg cells in patients who belonged to cluster A (Figure 6A and B), but not in those who belonged to cluster B (Figure 6A and B). Given that ICOS is induced on CD4<sup>+</sup> T cells after IL-2 stimulation, concentration of sCD25, a marker of IL-2 impregnation [29, 30], was surveyed during the course of ipilimumab treatment. Patients who belonged to cluster A showed a greater increase over time in sCD25 than patients from cluster B, as demonstrated by a higher  $V_{2/3}$  to  $V_1$  ratio compared with patients from cluster B (Figure 6C).



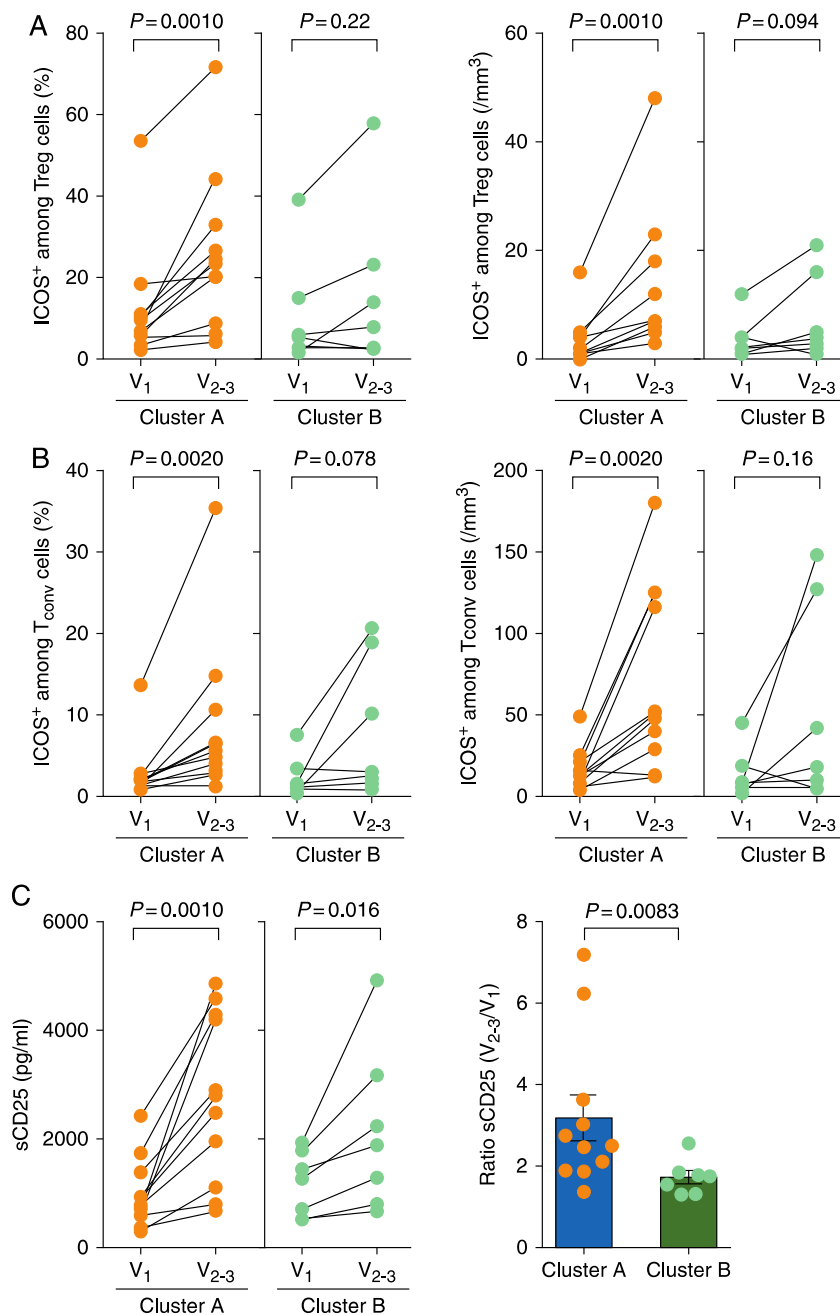
**Figure 5.** Baseline systemic immune status and microbiota composition. (A–C). Baseline ( $V_1$ ) percentages and absolute numbers of fresh whole blood CD4<sup>+</sup> T cells, Treg cells (% CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> within CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells); α4β7<sup>+</sup> among CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T cells, serum concentrations of IL-6, IL-8 and sCD25 were analyzed and compared between patients belonging to cluster A and patients belonging to cluster B (A); long-term clinical benefit (LT benefit) and poor clinical benefit (poor benefit) (B); patients with colitis (Colitis) and patients without colitis (No colitis) (C). Each dot represents one patient. *P* values are indicated on each graph; ns means "not significant"; Mann–Whitney tests were used.

## Discussion

This study shows that a distinct baseline gut microbiota composition is associated with an anti-cancer response and immune-mediated colitis in patients with MM treated with ipilimumab. Colonization by Firmicutes and more specifically by OTUs related to *F. prausnitzii* L2-6, *butyrate producing bacterium* L2-21 and *G. formicilis* ATCC 27749 is associated with both anti-cancer response and immune-related colitis. There is a higher representation of Bacteroidetes (mostly *Bacteroides* genus) in patients who have a poor anti-cancer response and who remain colitis-free. Dubin et al. recently showed an increased representation of bacteria belonging to the Bacteroidetes phylum among patients who remain free of ipilimumab-induced colitis in an American cohort of 34 patients [31]. Our results confirm these data in an independent cohort. Moreover, in our study, *Bacteroides* genus was also associated with poor response to anti-CTLA-4 treatment. Recent studies conducted in mice have shown that the efficacy of CTLA-4 and PDL-1 blockade is influenced by gut microbiota [13, 14]. In mice, anti-CTLA-4 treatment induced a microbial dysbiosis [13] that was not observed in our patients except at the time of ipilimumab-induced colitis. Furthermore, while we observed that higher proportions of *Bacteroides* at baseline were associated with minimal benefit of

ipilimumab in patients, fecal microbiota transplantation (FMT) from patients with MM into mice recipients revealed that specific species from the *Bacteroides* genus (*B. fragilis* and/or *B. thetaiotaomicron*) could elicit the immunostimulatory effects of CTLA-4 blockade [13]. However, FMT of human feces in mice have several limitations due to a bias in the reconstitution of the microbiota and is more distant from the clinical setting than our study. In our study, we directly assessed the anti-cancer efficacy of ipilimumab in patients with MM. Finally, since specific bacterial groups were targeted by quantitative PCR in FMT experiments in mice, one cannot exclude that other species were involved in ipilimumab efficacy in this setting. In our dataset, *B. fragilis* and *B. thetaiotaomicron* were not abundantly represented at baseline (supplementary Figure S5, available at *Annals of Oncology* online). Overall, these bacterial species were more abundant in patients with poor clinical benefit who remained colitis-free.

We found that the *Faecalibacterium*-driven cluster A and clinical benefit were associated with low baseline percentage of circulating α4β7<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> Tregs. In addition, high proportions of *F. prausnitzii*, low baseline percentage of circulating CD4<sup>+</sup> Tregs and low baseline levels of systemic inflammatory proteins, such as IL-6, IL-8 and sCD25, were associated with subsequent colitis. Commensal bacteria, such as *F. prausnitzii*, and



**Figure 6.** Ipilimumab-induced blood immune modifications and baseline microbiota composition. The expression of ICOS on CD4<sup>+</sup> T cells was monitored in fresh whole blood before ipilimumab treatment (V<sub>1</sub>) and after one or two injections of ipilimumab (V<sub>2-3</sub>). Serum concentration of sCD25 was monitored before ipilimumab treatment (V<sub>1</sub>) and after one or two injections of ipilimumab (V<sub>2-3</sub>). Percentage of conventional CD4<sup>+</sup> T cells (T<sub>conv</sub>) was defined as %CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T excluding Treg cells. Graphs depict specific changes in Treg cells (A), T<sub>conv</sub> cells (B) and sCD25 (C) over the course of ipilimumab treatment in patients belonging to cluster A (white circles) and patients belonging to cluster B (black circles). For sCD25, V<sub>2-3</sub> to V<sub>1</sub> ratio was calculated [(sCD25 at V<sub>2-3</sub>)/(sCD25 at V<sub>1</sub>)] for patients from clusters A and B (C, right). Each dot represents one patient. *P* values are indicated on each graph. Wilcoxon matched-pairs signed rank (A, B and C, left) or Mann–Whitney (C, right) tests were used.

several butyrate-producing bacteria promote the development of tolerogenic macrophages and dendritic cells, as well as induced and thymic Treg accumulation, and thereby contribute to the anti-inflammatory balance of the intestines [32, 33]. It has been suggested that *F. prausnitzii* have an anti-inflammatory role in

IBD. Low abundance of *F. prausnitzii* and high amounts of Enterobacteriaceae predicted subsequent relapse in patients who had received an ileocaecal resection for Crohn's disease [23]. Although it is currently hypothesized that dysbiosis precedes IBD, until now it has not been possible to have access to pre-

illness microbiota in patients with IBD. The anti-inflammatory role of *F. prausnitzii* is based upon studies carried out in CD siblings and patients who already have the disease, whereas we studied patients before they received ipilimumab. Future studies will determine whether there is a specific microbiota associated with the subsequent development of IBD, and if it is close or far from that of patients who will develop colitis during ipilimumab treatment. However, our microbiota and immune monitoring data seem consistent. Baseline serum concentrations of pro-inflammatory cytokines were low in patients who developed colitis and in those who belonged to cluster A—this is in line with the anti-inflammatory role of *F. prausnitzii* and other Firmicutes. Previous studies have described correlations between specific components of the gut microbiota and systemic pro-inflammatory cytokine levels [21]. In our study, higher systemic inflammatory proteins and high proportions of Bacteroidetes at baseline were associated with resistance to colitis. *Bacteroides* enrichment has been shown to be associated with low-grade systemic inflammation, as opposed to anti-inflammatory species, such as *F. prausnitzii* [22–24, 34]. Taken together, these data suggest that the concentration of systemic inflammatory proteins at baseline might reflect microbiota composition and predict colitis in patients treated with ipilimumab. High proportion and numbers of  $\alpha 4^+ \beta 7^+$  T cells before ipilimumab treatment was associated with cluster B and poor benefit in patients. A previous paper has studied microbiota composition and blood T cell phenotype in patients with Crohn's disease, their related siblings and healthy controls. It showed that patients and siblings had a lower fecal concentrations of *Faecalibacterium prausnitzii* and a higher percentage and numbers of circulating  $\beta 7^+$  T cells [35], as we observed in patients from cluster B in our cohort. Ipilimumab blocks CTLA-4, a major peripheral tolerance mechanism. Regulatory T cells have a critical role in regulating the development of colitis and Treg cells express high levels of CTLA-4. It has been showed that *F. prausnitzii* is associated with an augmentation/induction of regulatory T cells in the gut. Thus, we can speculate that *F. prausnitzii* could be associated with a sequestration of  $\alpha 4^+ \beta 7^+$  T cells and Tregs within the intestines and, possibly, tumor beds. Treg cells harbor high levels of CTLA-4 and are therefore vulnerable to ipilimumab [36]. Consequently, ipilimumab could induce the inactivation of intratumoral and gut-associated CTLA-4<sup>+</sup> Treg cells leading to effector T cell activation and therefore anti-cancer response as well as colitis development.

In addition, patients who belong to the *Faecalibacterium*-driven cluster A have a higher ICOS induction on CD4<sup>+</sup> T cells and a higher increase in sCD25 (Figure 6). These results are reminiscent of previous studies where ICOS induction on CD4<sup>+</sup> T cells during the course of ipilimumab treatment has been proposed as a biomarker of ipilimumab efficacy in patients with cancer [18, 37, 38]. sCD25 is a biomarker that has been associated with IL-2 impregnation [30] and IL-2 is a major growth factor for T cells, particularly regulatory Treg cells which respond to IL-2 treatment even at low dosage. CTLA-4 engagement prevents ICOS expression [29] while IL-2 is a great inducer of ICOS expression on T cells, particularly on Treg cells that express constitutionally high affinity IL-2R chain (CD25 or IL-2R $\alpha$ ) [39–42]. Taken together, these observations suggest that gut microbiota composition at baseline could predict which patients will adequately respond to ipilimumab.

It can be argued that colitis could have been a time-dependent confounder on the causal relationship between microbiota composition and clinical response. However, it could induce an opposite bias, with a decrease of the benefit in the patients with colitis in whom ipilimumab treatment is stopped prematurely. We conducted a sensitivity analysis in the subgroup of patients who remained colitis-free. At the OTU level, the PCA was statistically significant ( $P = 0.048$ ), and there was a trend at the genera level (Monte-Carlo  $P$ -value = 0.084). The tendency for the 4 specific genera showed a similar trend, but differences were not significant anymore. While *F. prausnitzii* L2-6 was still significantly associated with patients having an OS longer than 18 months ( $P = 0.031$ ), significance was lower for *G. formicilis* ( $P = 0.064$ ) and for butyrate-producing bacterium SS2-1 ( $P = 0.10$ ) in this sub-cohort. In conclusion, trends between baseline microbiota composition and response to ipilimumab were similar in these small subgroups and in the whole group.

Our results suggest that baseline gut microbiota composition may be an important determinant of response and colitis associated with anti-CTLA-4 treatment. Further studies are needed to compare the predictive value of microbiota with that of other markers, and to explore these parameters in the context of various types of tumors and anticancer treatments. The combination of anti-CTLA-4 and anti-PD1 blockade was recently approved for the treatment of patients with MM and is also in development in other tumor types based on increased response rates (50%–60%) and prolonged PFS [43, 44]. The results in terms of OS will be available in the following months. However, this combination is much more toxic than each of the drugs given as monotherapy, with close to 60% grades 3–5 adverse events, many of them being severe colitis, and interruption of treatment in 40% of patients because of toxicity [43, 44]. One of the main objectives of several research teams in this field is thus to identify baseline parameters that could help to identify patients who need the combination versus those who could be controlled with a monotherapy and not expose them to the risk of developing severe adverse events. Microbiome prospective studies similar to our present study will therefore be critical to conduct in patients treated with anti-PD1 drugs alone or in combination with ipilimumab to identify potential favorable versus hostile flora in the context of these distinct immunotherapies. It will also be very important to conduct such studies in various tumor types to evaluate the impact of the microbiome in different tumors and with different drugs, since checkpoint inhibitors are now being investigated in a wide range of tumors.

## Acknowledgements

CC was supported by fellowships from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). The authors thank Fiona Ecartot (EA 3920, University Hospital Besançon, France) for editorial assistance. We are grateful to the INRA MIGALE bioinformatics platform (<http://migale.jouy.inra.fr>) for providing computational resources. We also thank the Genotoul Get-PlaGe sequencing platform. The authors wish to acknowledge the association: “Ensemble contre le Mélanome” in recognition of its help.



## Funding

This study was funded by Gustave Roussy Cancer Campus, Fondation Gustave Roussy, the Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), the Direction Générale de l'Offre de Soins (DGOS; GOLD TRANSLA 12-174), the Institut National du Cancer (INCa; GOLD 2012-062 N° Cancéropôle: 2012-1-RT-14-IGR-01), and SIRIC SOCRATE (INCa DGOS INSERM 6043), MMO program: ANR-10IBHU-0001).

## Disclosure

NC reports grants from Cytune Pharma. CR has participated in advisory boards for Roche, GSK, Merck, Novartis, Amgen, BMS and Novartis. FC has participated in advisory boards for MSD (oncology) and Enterome and has been a speaker for Hospira and Mayoly Splindler. All remaining authors have declared no conflicts of interest.

## References

- Robert C, Thomas L, Bondarenko I et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011; 364(26): 2517–2526.
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363(8): 711–723.
- Schadendorf D, Hodi FS, Robert C et al. Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2015; 33(17): 1889–1894.
- Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(4): 252–264.
- Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *J Clin Oncol* 2015; 33(17): 1974–1982.
- Weber JS, Kahler KC, Hauschild A. Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *J Clin Oncol* 2012; 30(21): 2691–2697.
- Beck KE, Blansfield JA, Tran KQ et al. Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J Clin Oncol* 2006; 24(15): 2283–2289.
- Gupta A, De Felice KM, Loftus EV, Khanna S. Systematic review: colitis associated with anti-CTLA-4 therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2015; 42(4): 406–417.
- Marthey L, Mateus C, Mussini C et al. Cancer immunotherapy with anti-CTLA-4 monoclonal antibodies induces an inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2016; 10(4): 395–401.
- Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009; 361(21): 2066–2078.
- Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140(6): 1720–1728.e3.
- Lepage P, Häslér R, Spehlmann ME et al. Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2011; 141(1): 227–236.
- Vétizou M, Pitt JM, Daillère R et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* 2015; 350(6264): 1079–1084.
- Sivan A, Corrales L, Hubert N et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* 2015; 350(6264): 1084–1089.
- Wolchok JD, Hoos A, O'Day S et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res* 2009; 15(23): 7412–7420.
- Snyder A, Makarov V, Merghoub T et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 2014; 371(23): 2189–2199.
- Seksik P. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003; 52(2): 237–242.
- Chen H, Liakou CI, Kamat A et al. Anti-CTLA-4 therapy results in higher CD4+ICOShi T cell frequency and IFN-gamma levels in both nonmalignant and malignant prostate tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(8): 2729–2734.
- Read S, Greenwald R, Izcue A et al. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol* 2006; 177(7): 4376–4383.
- Lukiw WJ. *Bacteroides fragilis* lipopolysaccharide and inflammatory signaling in Alzheimer's disease. *Front Microbiol* 2016; 7: 1544.
- Guigoz Y, Doré J, Schiffrin EJ. The inflammatory status of old age can be nurtured from the intestinal environment. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11(1): 13–20.
- Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013; 500(7464): 541–546.
- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(43): 16731–16736.
- Devillard E, McIntosh FM, Duncan SH, Wallace RJ. Metabolism of linoleic acid by human gut bacteria: different routes for biosynthesis of conjugated linoleic acid. *J Bacteriol* 2007; 189(6): 2566–2570.
- Mathewson ND, Jenq R, Mathew AV et al. Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. *Nat Immunol* 2016; 17(5): 505–513.
- Smith PM, Howitt MR, Panikov N et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 2013; 341(6145): 569–573.
- Gray RJ. A class of  $\chi^2$ -sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann Statist* 1988; 16(3): 1141–1154.
- Lin G, So Y, Johnston G. Analysing survival data with competing risks using SAS\* software. *Proc. SAS Glob. Forum 2012 Conference*, Cary, NC. SAS Inst. Inc. 2012.
- Riley JL, Blair PJ, Musser JT et al. ICOS costimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement. *J Immunol* 2001; 166(8): 4943–4948.
- Lotze MT, Custer MC, Sharrow SO et al. In vivo administration of purified human interleukin-2 to patients with cancer: development of interleukin-2 receptor positive cells and circulating soluble interleukin-2 receptors following interleukin-2 administration. *Cancer Res* 1987; 47(8): 2188–2195.
- Dubin K, Callahan MK, Ren B et al. Intestinal microbiome analyses identify melanoma patients at risk for checkpoint-blockade-induced colitis. *Nat Commun* 2016; 7: 10391.
- Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 2012; 489(7415): 231–241.
- Cebula A, Seweryn M, Rempala GA et al. Thymus-derived regulatory T cells contribute to tolerance to commensal microbiota. *Nature* 2013; 497(7448): 258–262.
- Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol* 2010; 105(11): 2420–2428.
- Hedin CR, McCarthy NE, Louis P et al. Altered intestinal microbiota and blood T cell phenotype are shared by patients with Crohn's disease and their unaffected siblings. *Gut* 2014; 63(10): 1578–1586.
- Romano E, Kusio-Kobialka M, Foukas PG et al. Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(19): 6140–6145.
- Fu T, He Q, Sharma P. The ICOS/ICOSL pathway is required for optimal antitumor responses mediated by anti-CTLA-4 therapy. *Cancer Res* 2011; 71(16): 5445–5454.

38. Liakou CI, Kamat A, Tang DN et al. CTLA-4 blockade increases IFN - producing CD4+ICOS<sup>hi</sup> cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(39): 14987–14992.
39. Sim GC, Martin-Orozco N, Jin L et al. IL-2 therapy promotes suppressive ICOS<sup>+</sup> Treg expansion in melanoma patients. *J Clin Invest* 2014; 124(1): 99–110.
40. Klatzmann D, Abbas AK. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(5): 283–294.
41. Chaput N, Flament C, Locher C et al. Phase I clinical trial combining imatinib mesylate and IL-2: HLA-DR(+) NK cell levels correlate with disease outcome. *Oncoimmunology* 2013; 2(2): e23080.
42. Yu A, Snowwhite I, Vendrame F et al. Selective IL-2 responsiveness of regulatory T cells through multiple intrinsic mechanisms supports the use of low-dose IL-2 therapy in type 1 diabetes. *Diabetes* 2015; 64(6): 2172–2183.
43. Hodi FS, Chesney J, Pavlick AC et al. Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(11): 1558–1568.
44. Larkin J, Hodi FS, Wolchok JD. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015; 373(13): 1270–1271.

**Table S1: Clinical characteristics of patients with or without colitis after receiving ipilimumab**

Characteristics	No colitis <i>n</i> =19 (%)	Colitis <i>n</i> =7 (%)
Median age – year [range]	61 [47-76]	63 [42-80]
Male sex	11 (58)	2 (29)
Disease stage *		
M1a	7 (37)	1 (14)
M1b	0 (0)	0 (0)
M1c	11 (58)	6 (86)
Elevated LDH (>250 UI/mL)	7 (37)**	1 (14)
Clinical response		
Long term clinical benefit	5 (26)	4 (57)
Minimal or no clinical benefit	14 (74)	3 (43)
Prior therapies:		
None	13 (68)	2 (29)
Chemotherapy	2 (11)	2 (29)
BRAF-inhibitor	0 (0)	2 (29)
Immune check point inhibitor	3 (16)	1 (6)
Others	1 (5)	0 (0)
Median survival - months	18	Not reached
Median progression - month	4	10
Treatment after progression		
None	5 (26)	3 (43)
Anti-PD-1	9 (47)	1 (14)
Others	4 (26)	3 (43)
Personal history of immune disorders	1 (5)	2 (22)
Immune related Adverse Event		
Thyroiditis	1 (5)	1 (14)
Hypophysitis	3 (16)	0 (0)
Hepatitis	3 (16)	0 (0)
Cutaneous toxicity	3 (16)	2 (22)
Other	1 (5)	1 (14)
NSAIDs prior to anti-CTLA-4	1 (5)	0 (0)
Antibiotics prior to anti-CTLA-4	4 (21)	0 (0)

LDH, lactate dehydrogenase; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs.

\* One patient with extended vaginal localization, surgery was not indicated.

\*\* 1 missing data

**Table S2: Clinical characteristics of patients with or without clinical benefit from ipilimumab**

Characteristics	Poor clinical benefit	Long term clinical benefit
	n=17 (%)	n=9 (%)
Median age – year [range]	64 [42-76]	61 [46-80]
Male sex	9 (53)	4 (44)
Disease stage *		
M1a	6 (35)	2 (22)
M1b	0 (0)	0 (0)
M1c	10 (59)	7 (78)
Elevated LDH (>250 UI/mL)	6** (35)	2 (22)
Ipilimumab induced colitis	3 (18)	4 (44)
Prior therapies:		
None	10 (59)	5 (56)
Chemotherapy	1 (6)	2 (22)
BRAF-inhibitor	0 (0)	2 (22)
Immune check point inhibitor	4 (24)	0 (0)
Others	2 (12)	0 (0)
Median survival - month	Not reached	Not reached
Median progression - month	3	28
Treatment after progression		
None	2 (12)	6 (67)
Anti-PD-1	10 (59)	1 (11)
Others	5 (29)	2 (22)
Personal history of immune disorder	1 (6)	2 (22)
NSAIDs prior to anti-CTLA-4	0 (0)	1 (11)
Antibiotics prior to anti-CTLA-4	3 (18)	1 (11)

Abbreviations as in Table S1

\* *One patient with extended vaginal localization, surgery was not indicated.*

\*\* *1 missing data*

**Table S3: Fecal samples repartition and distribution for each patient. The sampling time, sequencing technology and clinical information as well as antibiotics are indicated for each sample.**

Sample ID	Patient ID	Sampling Visit	ATB	Sequencing technology	Colitis Adverse event	IPI Response	IPI effect	Colitis associated microbiota	Colitis predicton	Response prediction	
G001_V1	G001	V1	0	454	Colitis	Poor_Benefit	1	1	1	1	
G001_V5	G001	V5	0	454	Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G001_tox	G001	Tox	0	454	Colitis	Poor_Benefit	1	1	0	0	
G001_post	G001	postTox	0	454	Colitis	Poor_Benefit	0	0	0	0	
G003_V1	G003	V1	0	454	No_Colitis	LT_Benefit	1	0	1	1	
G003_V3	G003	V3	0	454	No_Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G003_V4	G003	V4	0	454	No_Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G004_V1	G004	V1	0	454	No_Colitis	LT_Benefit	1	0	1	1	
G004_V2	G004	V2	0	454	No_Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G004_V3	G004	V3	0	454	No_Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G004_V4	G004	V4	0	454	No_Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G006_V1	G006	V1	0	454	No_Colitis	LT_Benefit	1	0	1	1	
G006_V2	G006	V2	0	454	No_Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G006_V3	G006	V3	0	454	No_Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G006_V4	G006	V4	0	454	No_Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G008_V1	G008	V1	0	454	Colitis	LT_Benefit	1	1	1	1	
G008_V2	G008	V2	1 (Ofloxacin)	454	Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G008_V3	G008	V3	0	454	Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G008_V4	G008	V4	0	454	Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G008_tox	G008	Tox	0	454	Colitis	LT_Benefit	1	1	0	0	
G008_post	G008	postTox	0	454	Colitis	LT_Benefit	0	0	0	0	
G009_V1	G009	V1	0	454	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	1	1	
G009_V3	G009	V3	0	454	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G012_V1	G012	V1	0	454	Colitis	LT_Benefit	1	1	1	1	
G012_V2	G012	V2	0	454	Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G012_V3	G012	V3	0	454	Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G012_V4	G012	V4	1 (Acide fusidique)	454	Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G012_tox	G012	Tox	0	454	Colitis	LT_Benefit	1	1	0	0	
G014_V1	G014	V1	0	454	Colitis	LT_Benefit	0	1	1	1	
G014_tox	G014	Tox	0	454	Colitis	LT_Benefit	0	1	0	0	
G015_V1	G015	V1	0	454	Colitis	LT_Benefit	1	1	1	1	
G015_V2	G015	V2	0	454	Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G015_V4	G015	V4	0	454	Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G015_V5	G015	V5	0	454	Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G015_tox	G015	Tox	0	454	Colitis	LT_Benefit	1	1	0	0	
G016_V1	G016	V1	0	454	Colitis	Poor_Benefit	1	1	1	1	
G016_V2	G016	V2	0	454	Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G016_V3	G016	V3	0	454	Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G016_tox	G016	Tox	0	454	Colitis	Poor_Benefit	1	1	0	0	
G017_V1	G017	V1	0	454	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	1	1	
G017_V3	G017	V3	0	454	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G017_V4	G017	V4	0	454	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G017_V5	G017	V5	0	454	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G020_V1	G020	V1	1 (Amoxicilline + Acide Clavulanique + Pipéracilline)	Miseq	No_Colitis	LT_Benefit	1	0	1	1	
G020_V2	G020	V2	0	Miseq	No_Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G020_V4	G020	V4	0	Miseq	No_Colitis	LT_Benefit	1	0	0	0	
G021_V1	G021	V1	1 (Norfloxacin)	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	1	1	
G021_V2	G021	V2	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G021_V3	G021	V3	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G022_V1	G022	V1	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	1	1	
G024_V1	G024	V1	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	1	1	
G024_V2	G024	V2	1 (Ofloxacin)	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G028_V1	G028	V1	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	1	1	
G028_V2	G028	V2	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G028_V3	G028	V3	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G028_V4	G028	V4	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G030_V1	G030	V1	0	Miseq	No_Colitis	LT_Benefit	0	0	1	1	
G034_V1	G034	V1	1 (Amoxicilline + Acide Clavulanique + Ciprofloxacin)	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	0	0	1	1	
G035_V1	G035	V1	0	Miseq	Colitis	Poor_Benefit	1	1	1	1	
G035_V4	G035	V4	0	Miseq	Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G035_tox	G035	Tox	0	Miseq	Colitis	Poor_Benefit	1	1	0	0	
G036_V1	G036	V1	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	1	1	
G036_V2	G036	V2	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G036_V3	G036	V3	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G037_V1	G037	V1	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	1	1	
G037_V2	G037	V2	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G037_V3	G037	V3	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G037_V4	G037	V4	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G038_V1	G038	V1	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	0	0	1	1	
G039_V1	G039	V1	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	1	1	
G039_V2	G039	V2	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G039_V4	G039	V4	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G039_V5	G039	V5	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G041_V2	G041	V2	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G041_V3	G041	V3	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G041_V4	G041	V4	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G042_V1	G042	V1	1 (Amoxicilline)	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	1	1	
G042_V2	G042	V2	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G046_V1	G046	V1	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	1	1	
G046_V2	G046	V2	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G046_V3	G046	V3	1 (Amoxicilline + Acide Clavulanique + Ofloxacin)	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
G048_V1	G048	V1	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	1	1	
G048_V3	G048	V3	0	Miseq	No_Colitis	Poor_Benefit	1	0	0	0	
							<b>N samples for comparison</b>	<b>76</b>	<b>14</b>	<b>26</b>	<b>26</b>

**Table S4: Clinical characteristics of patients receiving ipilimumab according to baseline fecal microbiota clustering**

Characteristics	Cluster A n=12 (%)	Cluster B n=10 (%)
Median age – year [range]	62 [42-80]	62 [47-74]
Male sex	6 (50)	4 (40)
Disease stage*		
M1a	2 (17)	5 (50)
M1b	0 (0)	0 (0)
M1c	10 (83)	4 (40)
Elevated LDH (>250 UI/mL)	3* (25)	4 (40)
Ipilimumab induced colitis	6 (50)	1 (10)
Prior therapies:		
None	6 (50)	6 (60)
Chemotherapy	3 (25)	1 (10)
BRAF-inhibitor	2 (17)	0 (0)
Immune check point inhibitor	1 (8)	2 (20)
Others	0 (0)	1 (10)
Median survival - month	Not reached	Not reached
Median progression - month	10	3
Clinical response		
Long term clinical benefit	8 (67)	0 (0)
Minimal or no clinical benefit	4 (33)	10 (100)
Treatment after progression		
None	5 (42)	2 (20)
Anti-PD-1	3 (25)	5 (50)
Others	4 (33)	3 (30)
Personal history of immune disorder	2 (17)	1 (10)
NSAIDs prior to anti-CTLA-4	1 (8)	0 (0)
Antibiotics prior to anti-CTLA-4	1 (8)	2 (20)

Abbreviations as in Table S1

\*One patient with extended vaginal localization, surgery was not indicated.

\*\* 1 missing data

**Table S5: Immunological characteristics prior to ipilimumab treatment (V<sub>1</sub>) according to baseline microbiota clusters (A versus B)**

Variable	Cluster A <sup>#</sup> (n=12)				Cluster B <sup>#</sup> (n=10)				Mann Whitney pval
	n	Median	Min	Max	n	Median	Min	Max	
Number CD4+T cells (/mm <sup>3</sup> )	11	646	268	1525	7	502	179	1416	0,59
% memory among CD4+ T cells	11	54	32	84	7	72	31	80	0,42
Number memory among CD4+ T cells	11	357	137	951	7	393	143	1029	0,72
% naive among CD4+ T cells	11	37	5	60	7	20	15	68	0,39
Number naive among CD4+ T cells	11	244	28	649	7	130	27	315	0,60
% Treg (Foxp3) among CD4+ T cells	11	3	2	12	7	10	4	13	<b>0,030*</b>
Number Treg (Foxp3) among CD4+ T cells	11	18	10	184	7	61	9	83	0,19
% α4β7 among CD4+ T cells	10	5	2	50	6	12	5	64	<b>0,045*</b>
Number α4β7 among CD4+ T cells	10	28	12	175	6	75	50	299	0,069
Number CD8+T cells (/mm <sup>3</sup> )	11	204	97	623	7	362	149	867	0,15
% memory among CD8+ T cells	11	34	3	50	7	39	2	62	0,59
Number memory among CD8+ T cells	11	56	13	196	7	152	8	419	0,25
% naive among CD8+ T cells	11	25	5	61	7	15	5	41	0,59
Number naive among CD8+ T cells	11	32	11	277	7	75	20	152	0,52
% α4β7 among CD8+ T cells	10	7	5	26	6	20	9	45	<b>0,034*</b>
Number α4β7 among CD8+ T cells	10	14,5	6	137	6	93	39	127	<b>0,011*</b>
IL-6 (pg/ml)	11	0	0	28	7	1	0	96	0,12
IL-8 (pg/ml)	11	10	0	53	7	22	4	252	0,057
sCD25 (pg/ml)	11	780	305	2427	7	1278	514	1925	0,53

<sup>#</sup>patients belonging to cluster A (n=12) or B (n=10) only 18 blood samples were collected at baselines (n=11 for Cluster A; n=7 for Cluster B); for the panel including α4β7 T cells analyses only 16 baseline points were realized (n=10 for Cluster A; n=6 for Cluster B); in two patients this panel could not be realized freshly due to technical concerns

**Table S6: Immunological characteristics prior to ipilimumab treatment (V<sub>1</sub>) according to clinical response to ipilimumab**

Variable	Poor clinical benefit (n=14)				Long term clinical benefit (n=8)				Mann Whitney pval
	n	Median	Min	Max	n	Median	Min	Max	
Number CD4+T cells (/mm <sup>3</sup> )	10	524	179	1416	8	641	277	1525	0,63
% memory among CD4+ T cells	10	70	31	80	8	67	34	84	0,76
Number memory among CD4+ T cells	10	356	137	1029	8	358	216	951	0,76
% naive among CD4+ T cells	10	21	15	68	8	30	5	60	0,65
Number naive among CD4+ T cells	10	135	27	649	8	160	28	622	0,83
% Treg (Foxp3) among CD4+ T cells	10	8	2	13	8	3	2	12	0,06
Number Treg (Foxp3) among CD4+ T cells	10	60	9	83	8	16	10	184	0,23
% $\alpha 4\beta 7$ among CD4+ T cells	9	11	5	64	7	5	2	11	<b>0,015*</b>
Number $\alpha 4\beta 7$ among CD4+ T cells	9	23	12	175	7	69	33	299	<b>0,021*</b>
Number CD8+T cells (/mm <sup>3</sup> )	10	321	127	867	8	205	97	623	0,56
% memory among CD8+ T cells	10	34	2	62	8	33	17	48	0,65
Number memory among CD8+ T cells	10	70	8	419	8	59	28	196	0,90
% naive among CD8+ T cells	10	15	5	61	8	21	5	46	1
Number naive among CD8+ T cells	10	54	13	277	8	43	11	191	0,4217
% $\alpha 4\beta 7$ among CD8+ T cells	9	20	9	45	7	7	5	22	<b>0,0081**</b>
Number $\alpha 4\beta 7$ among CD8+ T cells	9	77	14	127	7	12	6	137	<b>0,031*</b>
IL-6 (pg/ml)	10	0	0	96	8	0	0	28	0,48
IL-8 (pg/ml)	10	17	4	252	8	11	0	53	0,35
sCD25 (pg/ml)	10	1029	514	1925	8	788	305	2427	0,40

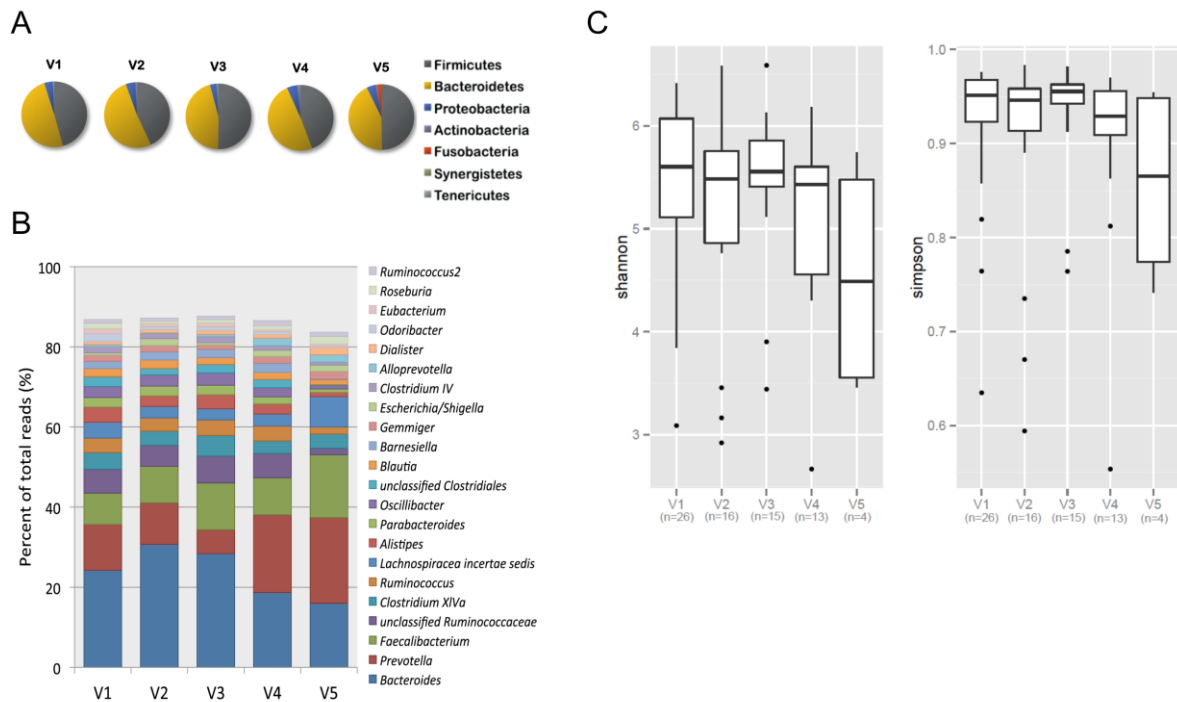
Patients with poor clinical benefit (n=14) or long term clinical benefit (n=8) only 18 blood samples were collected at baselines (n=10 for poor benefit; n=8 for LT benefit); for the panel including  $\alpha 4\beta 7$  T cells analyses only 16 baseline points were realized (n=9 for poor benefit; n=7 for LT benefit); in two patients this panel could not be realized freshly due to technical concerns.



**Table S7: Immunological characteristics prior to ipilimumab treatment (V<sub>1</sub>) between patients with or without ipilimumab-induced colitis**

Variable	No colitis (n=15)				Colitis (n=7)				Mann Whitney pval
	n	Median	Min	Max	n	Median	Min	Max	
Number CD4+T cells (/mm <sup>3</sup> )	12	469	179	1525	6	848	628	1139	0,053
% memory among CD4+ T cells	12	72	31	84	6	43	32	83	0,083
Number memory among CD4+ T cells	12	353	137	1029	6	360	252	544	0,55
% naive among CD4+ T cells	12	21	10	68	6	38	5	60	0,15
Number naive among CD4+ T cells	12	123	27	519	6	327	34	649	0,083
% Treg (Foxp3) among CD4+ T cells	12	8	2	13	6	3	2	6	<b>0,018*</b>
Number Treg (Foxp3) among CD4+ T cells	12	45	8	184	6	21	10	67	0,51
% $\alpha$ 4 $\beta$ 7 among CD4+ T cells	11	11	4	64	5	5	2	8	0,090
Number $\alpha$ 4 $\beta$ 7 among CD4+ T cells	11	69	12	299	5	33	22	65	0,23
Number CD8+T cells (/mm <sup>3</sup> )	12	242	97	867	6	220	127	456	0,75
% memory among CD8+ T cells	12	42	2	62	6	28	3	47	0,18
Number memory among CD8+ T cells	12	70	8	419	6	46	13	139	0,18
% naive among CD8+ T cells	12	15	5	61	6	31	5	61	0,62
Number naive among CD8+ T cells	12	50	11	191	6	50	12	277	0,98
% $\alpha$ 4 $\beta$ 7 among CD8+ T cells	11	20	5	45	5	7	7	11	0,27
Number $\alpha$ 4 $\beta$ 7 among CD8+ T cells	11	77	6	137	5	15	12	47	0,27
IL-6 (pg/ml)	12	3	0	96	6	0	0	0	<b>0,0080**</b>
IL-8 (pg/ml)	12	22	4	252	6	5	0	12	<b>0,0031**</b>
sCD25 (pg/ml)	12	1328	514	2427	6	630	305	780	<b>0,0097**</b>

Patients without colitis (n=15) or with colitis (n=7) only 18 blood samples were collected at baselines (n=12 with no colitis; n=6 with colitis); for the panel including  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 T cells analyses only 16 baseline points were realized (n=11 with no colitis; n=5 with colitis); in two patients this panel could not be realized freshly due to technical concerns

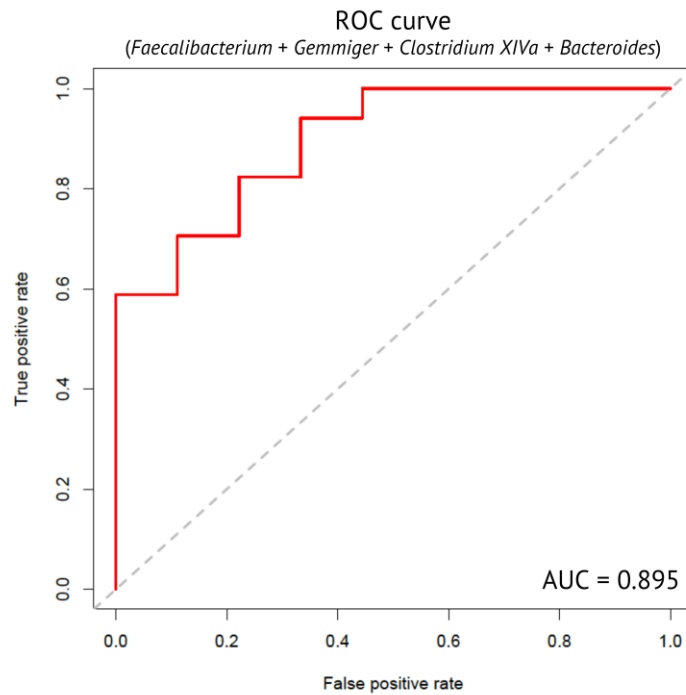


**Figure S1: Gut microbiota overtime follow-up during ipilimumab treatment.**

A. Bacterial phyla proportions over the course of ipilimumab treatment. Bacterial phyla are represented for all included patients at V<sub>1</sub> (baseline, n=26), V<sub>2</sub> (n=14), V<sub>3</sub> (n=15), V<sub>4</sub> (n=13) and V<sub>5</sub> (end of treatment, n=4).

B. Main bacterial genera proportions over the course of ipilimumab treatment. Only bacterial genera representing more than 1% of total reads on average are represented for all included patients at V<sub>1</sub> (baseline), V<sub>2</sub>, V<sub>3</sub>, V<sub>4</sub> and V<sub>5</sub> (end of treatment).

C. Diversity indices were calculated (Shannon and Simpson index) and were not modified over time (Wilcoxon test  $p > 0.05$ ).



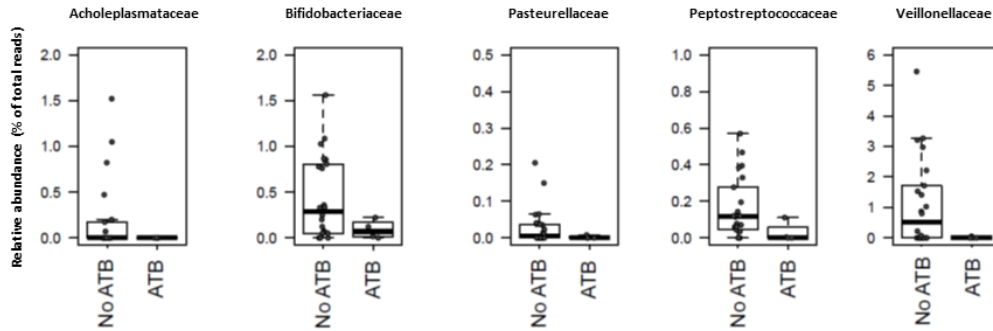
**Figure S2: Performance of four specific bacterial genera to predictively classify patients into long-term or poor benefit to Ipilimumab treatment.**

The performance of the classification is assessed by a ROC (Receiver operating characteristic) curve. Accuracy is measured by the area under the ROC curve (AUC). An area of 1 represents a perfect test; an area of 0.50 represents a worthless test and accuracy

A

Taxonomic level	Monte-Carlo pval
Phylum	0.58
Order	0.85
Family	0.48
Genus	0.46
OTUs	0.089

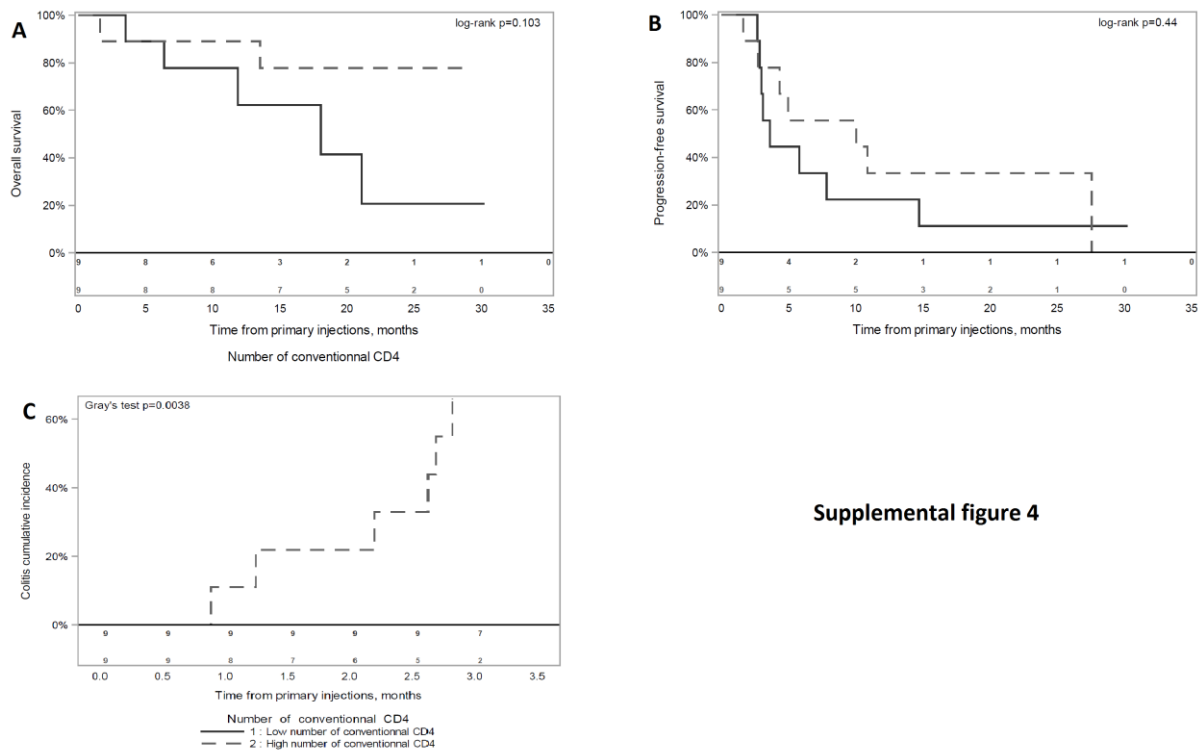
B



**Figure S3: Antibiotics prior to ipilimumab treatment does not influence baseline dominant microbiota.**

**A.** Inter-class PCAs were performed followed by a Monte-Carlo test to assess significance of patients clustering based on their microbiota composition at the different taxonomic levels. Antibiotics had no overall significant effects on patients' clustering.

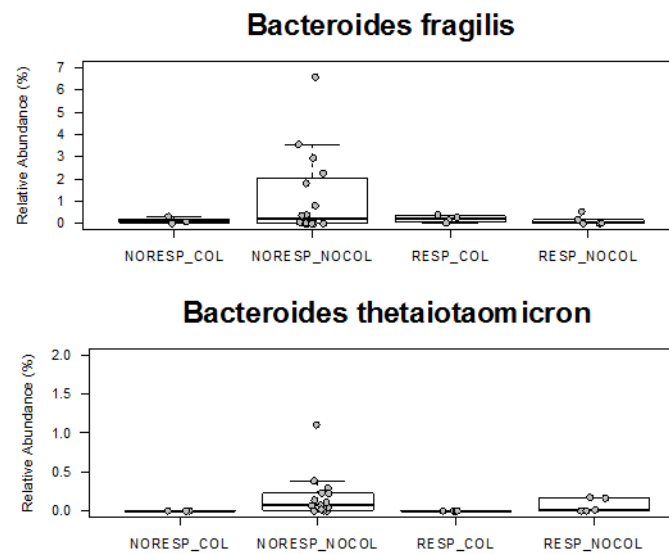
**B.** Relative abundance of five bacterial families significantly different between antibiotic treated and non-treated patients (Wilcoxon test  $p < 0.05$ ).



Supplemental figure 4

**Figure S4: Low absolute number of conventional CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells impacts clinical benefit and ipilimumab-induced colitis.**

CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> Conventional T cells were monitored on fresh peripheral whole blood in patients prior to ipilimumab treatment (V<sub>1</sub>). CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> Conventional T cells were defined as %CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T excluding Treg cells. Absolute numbers of CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> Conventional T cells were determined using Flow-Count Fluorospheres (Beckman Coulter) and flow cytometric immunophenotyping. **A.** Baseline (V<sub>1</sub>) absolute numbers of conventional CD4<sup>+</sup> T cells (conventional CD4) and overall survival (OS). Kaplan-Meier survival curves of patients classified into two groups according to the number of baseline conventional CD4<sup>+</sup> T cells, low number of conventional CD4 (<400/mm<sup>3</sup>) and high number of conventional CD4 (>400/mm<sup>3</sup>). **B.** As for A, but progression-free survival. **C.** Baseline (V<sub>1</sub>) absolute numbers of conventional CD4<sup>+</sup> T cells (conventional CD4) and colitis incidence. Colitis cumulative incidence (Gray's test) of patients classified into two groups according to the number of baseline conventional CD4<sup>+</sup> T cells. P values are indicated on each graph.



**Figure S5: At baseline, *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* were not abundantly represented in our dataset.** Patients with poor clinical benefit (NORESP) with or without colitis (COL and NOCOL) and patients with long- term clinical benefit (RESP), with or without colitis (COL and NOCOL) are represented. *Bacteroides fragilis* (upper panel) and *Bacteroides thetaiotaomicron* (lower panel) are shown. The highest percentage (6.58%) was reached for *B. fragilis*, these bacterial species were more abundant in patients with poor clinical benefit remaining colitis-free.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

### Materials and Methods

#### Microbiota composition assessment and statistical analyses

For both pyrosequencing (454) and MiSeq sequencing, the V3-V4 region of the 16S rRNA gene was amplified with the following primers: V3F «TACGGRAGGCAGCAG» (V3F bac339F modified with R instead of G) (Wilson KH, et al. J Clin Microbiol. 1990) and V4R «GGACTACCAGGGTATCTAAT» bac806R. For 454, applied quality filters were minimum length=250 bp, maximum length=600 bp, minimum quality threshold= 25, maximum number of homopolymers=6. For MiSeq, the filters were minimum length=200 bp and minimum quality threshold= 20. Applying these filters, an average of 1639 and 7377 reads/samples were kept for further analysis respectively with 454 and MiSeq technology. High quality reads were pooled, checked for chimeras, and grouped into Operational Taxonomic Units (OTUs) based on a 97% similarity threshold with uclust software from QIIME. Finally 462,312 high-quality reads (average 4,623 reads/sample) were analyzed and grouped into an average of 349 Operational Taxonomic Units (OTUs) per sample (97% similarity threshold; OTUs or phylotypes) based on uclust software from QIIME [1]. Estimates of phylotypes richness and diversity were calculated using both Shannon and Simpson indices on the rarefied OTU table ( $n=1,000$  reads). Singletons were removed and phylogenetic affiliation of each OTU was done by using ribosomal database project taxonomy [2] and performed from phylum to species level. The applied sequencing technology is indicated for each sample ( $n=83$ ) in the Table S3, as is the number of samples used for comparisons within the different part of the study. Statistical analyses were applied to decipher the influence of ipilimumab treatment, colitis development, and other clinical factors on the microbiota and to highlight a combination of microbial groups and immunological defects significantly involved in colitis development in MM patients. Statistical testing for significant differences between all

combinations of two groups was conducted using either paired Student or the Mann–Whitney test. The statistical language R version 3.1.3 was used for data visualization and to perform abundance-based principal component analysis (PCA) and inter-class PCA associated with Monte-Carlo rank testing on the bacterial genera (ade4 library). To decipher the impact of the different clinical outcomes (therapeutic efficacy, toxicity etc) on microbiota composition, principal component analyses with the different clinical factors as instrumental variables were computed based on the abundance of the different bacterial taxa for each individual (one analysis per environmental factor, data not shown). These inter-class PCA are appropriate to represent a typology displaying the diversity between individual's microbiota as it maximizes the variance between populations (here, Individuals' microbiota), instead of the total variance. Hence, inter-class PCA allows highlighting combinations of variables (bacterial phylotypes, or genera etc) that maximize variations observed between qualitative variables (e.g. environmental factors). Based on these inter-class PCA, statistical p-values of the link between the different environmental and clinical factors with microbiota profiles was assessed using a Monte-Carlo rank test (1000 replicates).

The Monte Carlo test is a multivariate and non-parametric test based on random permutations. The Monte Carlo sampling takes a small (relative to the total number of permutations) random sample of the possible replicates and test the null hypothesis that there are no significant differences in microbiota distribution between the different groups (e.g. based clinical outcome...). When the Monte Carlo test p-value is less than 0.05, one can confidently reject the null hypothesis that observed distribution between different classes (e.g. clinical factors) is due to random observation. The Random Forest classifier was applied to relative abundance data of distributed bacterial genera and OTUs to assess the variable importance of microbial components in the classification of each patient to a certain phenotype [3].



The random forest machine learning analyses (randomForest and ROCR packages) were applied to identify bacterial genera level that differentiates fecal community composition between groups. The purpose of a classifier such as random forest is to learn a function that maps a set of input values or predictors (here, relative to genera abundances) to a discrete output value (here, relative to clinical groups). Random forest is a powerful classifier that can use nonlinear relationships and complex dependencies between taxa. The degree of the success of the method is its ability to classify unseen samples correctly, estimated by training it on a subset of samples, and using it to categorize the remaining samples [3]. The cross-validation error is compared with the baseline error that would be achieved by always predicting the most common category. Random forest analysis was performed for each comparison on 5000 rarefied versions of the data. Additionally, random forest assigns an importance score to each genus by estimating the increase in error caused by eliminating that genus from the set of predictors. It also reports the Gini importance of a variable, which is computed as the sum of the Gini impurity decrease of every node in the forest for which that variable was used for splitting. Moreover, the LEfSe (linear discriminant analysis effect size) algorithm [4] was applied for high dimensional discovery of biomarkers that discriminate between patients that will have colitis but who may also respond (or not) to ipilimumab. The algorithm is freely available at <http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>. Finally, patients were statistically stratified based on their dominant gut microbial composition (genus level). Clustering of patients was performed with the k-means clustering algorithm and Calinski–Harabasz index to select the optimal number of clusters as previously described [5]. The k-means clustering algorithm implemented in R package clusterSim was used. Interclass PCA of genera composition with clusters as instrumental variable was also assessed, based on a Monte Carlo test with 1000 replicates. Lastly, random forest analysis was also performed to identify bacterial genera that differentiated fecal community composition between the three identified clusters.

## Fresh Whole Blood Immune monitoring

Whole blood was incubated with fluorochrome-conjugated antibodies for 15 min at room temperature, followed by 20 min of lysis (Versalyse, Beckman Coulter, Mervue, Galway, Ireland) for surface staining or permeabilized with PerFix-nc kit (Beckman Coulter) for intranuclear staining. PBMC were incubated with fluorochrome-conjugated membrane antibodies for 20 min at 4°C, followed by 45 min of permeabilization at 4°C with Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (eBioscience, San Diego, CA, USA), and ended by intranuclear staining with fluorochrome-conjugated antibodies for 45 min at 4°C. The following fluorochrome-conjugated antibodies were used: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD49d (clone: 9F10) , Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD103 (clone: Ber-ACT8) and anti-ICOS (CD278, clone: DX29) , Peridinin chlorophyll protein (PerCP)-conjugated anti-CD8 (clone: 2ST8.5H7) , Phycoerythrin-Cyanine 7 (PE-Cy7)-conjugated anti-CD4 (Clone: SK3) , Allophycocyanin (APC)-conjugated anti-integrin $\beta$ 7 (clone: FIB504) , Allophycocyanin-Cyanine 7 (APC-Cy7)-conjugated CD45RA (clone: HI100) , Lin<sup>-</sup> (V500)-conjugated anti-CD14 (clone: M5E2) , CD15 (clone: HI98) , CD16 (clone: 3G8) , CD19 (clone: HIB19), Brilliant Violet 510 -conjugated anti-NKp46 (clone: 9E2)) came from Becton Dickinson (BD, San Jose, CA, USA). PE-conjugated anti-CCR7 (clone: GO43H7) and anti-CD25 (clone: B1.49.9) , PE-Cy7-conjugated anti-CD45RA (clone: 2H4), APC-conjugated anti-CD103 (clone: 2G5) and anti-ICOS (clone: ISA-3), Alexa Fluor 647 (AF647)-conjugated anti-FoxP3 (clone: 259D) , Allophycocyanin Alexa Fluor 700 (AA700)-conjugated anti-CD3 (clone: UCHT1), Allophycocyanin Alexa Fluor 750 (AA750)-conjugated anti-CD45 (clone: J33) and anti-CD49d (clone: HP2/1) , Pacific Blue (PB)-conjugated anti-CD4 (clone: 13B8.2) and Krome orange-conjugated anti-CD8 (clone: B9.11) were obtained from Beckman Coulter. Phycoerythrin Dazzle 594-conjugated anti-CCR7 (clone: G043H7), Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PE-Cy5.5)-conjugated anti-integrin $\beta$ 7 (clone: FIB504) and Brilliant Violet 421 (VB421)-conjugated anti-CCR7 (clone: G043H7) were

purchased from Biolegend (San Diego, CA, USA), APC-conjugated anti-FoxP3 (clone: PCH101) from eBioscience, and Vioblue (VB)-conjugated anti-CD3 (clone: BW264/56) from Miltenyi (Bergisch Gladbach, Germany). Finally for death cell discrimination we used Vivid Yellow molecular probes from Life technologies. Stained cells were acquired using a Canto II flow cytometer (BD) or Gallios Cytometer (Beckman Coulter) and analyzed using Kaluza software (Beckman Coulter). Conventional T cells (CD4 and CD8) including memory and naïve cells ( naïve and memory cells were respectively defined by CCR7+CD45RA+ and CD45RA-); Treg cells (Foxp3 and CD25) and Gut-homing receptors (CD49d or  $\alpha$ 4,  $\beta$ 7, CD103) were longitudinally assessed in patients.

### Soluble immune markers

sCD25 was quantified using Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex assay HSCRMAG-32K-01 (Millipore, Darmstadt, Germany); IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 and TNF $\alpha$  Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex assay HCYTOMAG-60K-05 (Millipore). Human soluble CD14 (sCD14) Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was used to assess gut permeability in serum samples at V<sub>1</sub>.

### **Supplemental Materials and Methods bibliography**

1. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 2010; 7(5):335–336.
2. Cole JR, Wang Q, Cardenas E et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(Database):D141–D145.
3. Cutler DR, Edwards TC, Beard KH et al. RANDOM FORESTS FOR CLASSIFICATION IN ECOLOGY. *Ecology* 2007; 88(11):2783–2792.
4. Segata N, Izard J, Waldron L et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011; 12(6):R60.
5. Arumugam M, Raes J, Pelletier E et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473(7346):174–180.

### Article 3.

« Systemic microbial butyrate is associated with resistance to CTLA-4 blockade »

(soumis en septembre 2017)

C. Coutzac, J.M. Jouniaux, A. Paci, A. Seck, A. Vozy, V. Asvatourian, L. Cassard, P. Saulnier, L. Lacroix, P-L. Woerther, M. Desbois, K. Fizazi, C. Mateus, L. Boselli, J. Grivel, E. Soularue, P. Lepage, F. Carbonnel, C. Robert, N. Chaput

**Contexte** La composition du microbiote intestinal semble associée à la réponse clinique à l'ipilimumab. Un microbiote fécal en pré-thérapeutique, enrichi en *Faecalibacterium* et autres *Firmicutes* est associé à une meilleure survie chez les patients traités par ipilimumab pour un mélanome métastatique. Peu de travaux décrivent les mécanismes expliquant comment la composition du microbiote peut avoir un impact direct sur des tumeurs à distance. Les acides gras à chaînes courtes (AGCC) et en particulier le butyrate, sont connus pour avoir de nombreux effets modulateurs de l'immunité au niveau local mais également en systémique. Se basant sur nos précédents résultats, nous avons émis l'hypothèse que le butyrate issu du microbiote intestinal pourrait influencer l'immunité systémique et ainsi moduler la réponse anti-tumorale à l'anti-CTLA-4.

**Patients et Méthodes** Dans des modèles murins de tumeurs (MC38, CT26 et MCA101-OVA), nous avons évalué l'effet anti-tumoral de l'anti-CTLA-4 sous l'influence du butyrate. De la même manière, nous avons réalisé de l'immunophénotypages des populations lymphocytaires et des tests de re-stimulations peptidiques sur les ganglions drainant la tumeur MCA101-OVA. En parallèle, quarante patients avec un mélanome métastatique et traités par ipilimumab ont été suivis de manière prospective. Un immunophénotypage des cellules mononuclées du sang périphériques et les dosages des AGCC (acétate, propionate, butyrate et valérate) dans les séra et les selles des patients ont été réalisés en pré-thérapeutique

et avant chaque perfusion d'ipilimumab. Nous avons également mesuré dans cette cohorte de patients, l'abondance de *Faecalibacterium prausnitzii* dans les selles par qPCR.

**Résultats principaux** Nous avons montré dans des modèles murins de tumeurs (MC38, CT26 et MCA101-OVA) une inhibition de l'efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA-4 chez les souris supplémentées en butyrate. La recherche des mécanismes associés à cette absence d'efficacité clinique a permis de conclure que le butyrate inhibait l'induction des molécules de costimulation CD80/CD86 sur les cellules dendritiques et l'accumulation des lymphocytes T mémoires dans les ganglions drainants la tumeur suite au traitement par anti-CTLA-4. Dans les conditions de blocage du CTLA-4, la restimulation *ex vivo* des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> par des peptides OVA CMH-I (SIINFEKL) and CMH-II (OVA-265-280) dans les ganglions drainant la tumeur a permis de montrer que le butyrate ne favorisait pas la sécrétion d'IFN $\gamma$  comparativement aux souris contrôles démontrant une diminution de l'induction de réponse T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques d'un antigène tumoral. En parallèle, chez les patients atteints de mélanome métastatique, nous avons observé que ceux qui présentaient un enrichissement en *Faecalibacterium prausnitzii*, avaient des concentrations sériques en butyrate plus faible en pré-thérapeutique. Une faible proportion de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels et une proportion élevée de Treg étaient observées chez les patients avec des concentrations sériques en butyrate élevées avant toute injection d'ipilimumab. La restimulation des lymphocytes T *ex vivo* avant tout traitement montrait une concentration d'IL-10 plus élevée chez ces patients en accord avec un taux sérique de Treg plus important. Une concentration élevée du butyrate sérique était associée à l'absence d'induction de CD25 soluble, de LT CD4<sup>+</sup> mémoires et une induction plus faible d'ICOS sur les LT CD4<sup>+</sup> conventionnels et les Treg au cours du traitement par ipilimumab. Enfin, la faible concentration sérique en butyrate est associée à une augmentation de la survie sans progression et globale des patients atteints de mélanome métastatique et traités par ipilimumab.

**Conclusion** Notre travail souligne l'impact du butyrate sérique sur les réponses immunitaires systémiques et ainsi sur la réponse anti-tumorale de l'anticorps anti-CTLA-4. Ces résultats offrent de nouvelles connaissances sur le lien entre le microbiote et la réponse aux immunothérapies.

## **Systemic microbial butyrate is associated with resistance to CTLA-4 blockade.**

**Authors:** C. Coutzac<sup>1,2</sup>, J.M. Jouniaux<sup>1</sup>, A. Paci<sup>3,4,5</sup>, A. Seck<sup>3,4</sup>, A. Vozy<sup>1</sup>, V. Asvatourian<sup>6,7</sup>, L. Cassard<sup>1</sup>, P. Saulnier<sup>8</sup>, L. Lacroix<sup>8</sup>, P-L. Woerther<sup>9</sup>, M. Desbois<sup>1</sup>, K. Fizazi<sup>2,10</sup>, C. Mateus<sup>11</sup>, L. Boselli<sup>1</sup>, J. Grivel<sup>1</sup>, E. Soularue<sup>1,2,12</sup>, P. Lepage<sup>13</sup>, F. Carbonnel<sup>2,12</sup>, C. Robert<sup>2,11</sup>, N. Chaput<sup>1,5</sup>

### **Affiliations:**

<sup>1</sup>Gustave Roussy Cancer Campus, Laboratory of Immunomonitoring in Oncology, CNRS-UMS 3655 and INSERM-US23, Villejuif, F-94805, France

<sup>2</sup>University Paris-Saclay, Faculty of Medicine, Le Kremlin Bicêtre

<sup>3</sup>Vectorology and Anticancer Therapies, UMR CNRS 8203, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif, F-94805, France

<sup>4</sup>Gustave Roussy Cancer Campus, Pharmacology and Drug Analysis Department, Villejuif, F-94805, France

<sup>5</sup>University Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry, F-92296, France

<sup>6</sup> Gustave Roussy Cancer Campus, Biostatistics and Epidemiology Unit, Villejuif, F-94805, France

<sup>7</sup> University Paris-Saclay, Université Paris-Sud, UVSQ, CESP, INSERM, Villejuif

<sup>8</sup> Genomic platform Molecular Biopathology unit and Biological Resource Center, AMMICA, INSERM US23/CNRS UMS3655, University Paris XI, Gustave Roussy, Villejuif France

<sup>9</sup> Gustave Roussy Cancer Campus, Department of Medical Biology and Pathology, Microbiology unit, Villejuif, F-94805, France

<sup>9</sup> Gustave Roussy Cancer Campus, Department of Medical Biology and Pathology, Microbiology unit, Villejuif, F-94805, France

<sup>10</sup> Gustave Roussy Cancer Campus, Department of Medical Oncology, Villejuif, F-94805, France

<sup>11</sup> Gustave Roussy, Cancer Campus, Dermatology Unit, Department of Medicine, Villejuif, F-94805, France

<sup>12</sup> Department of Gastroenterology, Kremlin Bicêtre Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Le Kremlin Bicêtre; France

<sup>13</sup> Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, F-78350, Jouy-en-Josas, France.

**Corresponding author:** Professor Nathalie Chaput ; Gustave Roussy Cancer Campus, Laboratoire d'Immunomonitoring en Oncologie, Villejuif F-94805, France. Email : nathalie.chaput@gustaveroussy.fr; Tel.: +33 (0)1 42 11 56 55 Fax : +33 (0)1 42 11 37 60 94

**Key words:** CTLA-4, ipilimumab, melanoma, short chain fatty acid, butyrate

**One-Sentence summaries:** High concentration of serum butyrate is associated with resistance to CTLA4-4 blockade in patients with advanced melanoma.



## **Abstract**

A link between gut microbiota composition and clinical benefit of immune checkpoints has been reported. Mechanisms underlying this relationship are unclear. Immune modulatory effect of microbial-derived metabolites in particular short chain fatty acids, including butyrate has been suggested. Here we show in mice and in patients treated with anti-CTLA-4 that high systemic butyrate levels were associated with resistance to CTLA-4 blockade, immunosuppressive profile, prevention of dendritic cells maturation, diminution of tumor antigen-specific T cells and accumulation of memory T cells during the course of anti-CTLA-4 treatment. Systemic butyrate was linked to *Faecalibacterium prausnitzii* enrichment in the stool of patients. We conclude that systemic microbial butyrate may be the missing link between gut microbiota composition and clinical response to anti-CTLA-4.

## **Introduction**

In the past ten years therapeutic strategies in oncology have been revolutionized by the use of immune checkpoint blocking antibodies. The aim of these antibodies is to induce cellular anticancer immune responses by promoting specific T lymphocytes into tumor beds. T cell co-stimulatory and co-inhibitory receptors regulate the activation, proliferation and effector functions of T lymphocytes. Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) is a co-inhibitory molecule expressed on the surface of highly activated T lymphocytes and induce inhibitory signals upon interaction with their ligands, CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on antigen-presenting cells (APC)(1). In clinical practice, CTLA-4 blockade using the therapeutic monoclonal antibody ipilimumab (anti-CTLA-4) was approved in patients with metastatic melanoma (MM) (2, 3). Approximately 18% of patients with MM treated with ipilimumab have a prolonged survival and 20% develop immune-related adverse events, the most frequent being colitis (IrAE) (4). More recently, the combination of ipilimumab with an anti-PD1 antibody, nivolumab, has been approved, based on an increase of the overall

response rate and a prolonged progression-free-survival duration (5) and increasing numbers of patients exposed to these treatments is expected. Predictive biomarkers are needed for a better selection of patients who will benefit from this treatment. Recently, studies suggested that microbiota composition was associated with antitumor efficacy in cancer bearing-hosts treated with anti-CTLA-4 mAb (6, 7) and anti-PD-L1 (8). The composition of gut microbiota also seems to be associated with the risk to develop anti-CTLA-4-induced colitis (7, 9). These recent studies highlight specific bacteria associated with clinical response and/or toxicities. Especially, baseline gut microbiota enriched with *Faecalibacterium* and other *Firmicutes* is associated with beneficial clinical response to ipilimumab (7, 9). However, scarce findings explain how the microbiota composition could have an impact on a distant tumor. In mice, anti-CTLA-4 was shown to induce a dysbiosis favoring the translocation of commensal bacteria that might allow IL-12-secretion by dendritic cells as well as the priming of commensal-specific Th1 cells that could migrate to the tumor and recognize tumor cells (6, 10). Another mechanism was described in mice treated with anti-PD-L1, where specific bacteria (i.e. *Bifidobacterium*) might increase dendritic cell function leading to enhance CD8<sup>+</sup> T cell priming and accumulation in the tumor beds under PD-L1 blockade conditions (8). In addition to the direct effect of commensal bacteria on immune system, it is well known that some bacterial groups produce metabolites that also have immune properties (11). These de-novo synthesized metabolites include short chain fatty acids (SCFA), which are the products of microbial fermentation of non-digestible dietary fibers, and include acetate (C2), propionate (C3), butyrate (C4) and valerate (C5). SCFA mediate several functions especially providing energy to intestinal epithelial cells (IEC) (12, 13). SCFA also play a pivotal role on immune modulation (11). Butyrate is well known to exerts systemic anti-inflammatory activities by affecting immune cell migration, adhesion, cytokine expression as well as affecting cellular processes such as proliferation, activation, and apoptosis (14). Considering our previous results on the association between gut microbiota composition and clinical

response and the effect of butyrate on the immune system, even at distant site, we hypothesized that anti-cancer response due to anti-CTLA-4 blockade may be influenced by microbial butyrate. In this study, we demonstrate that microbial systemic butyrate influence anti-CTLA-4 anti-tumor effect in mouse models and in patients with MM and treated with ipilimumab.

## **Results**

### ***Butyrate inhibits antitumor efficacy of CTLA-4 blockade in mice***

Two weeks before tumor inoculation and all along the experiment, sodium butyrate was given to mice in their drinking water at the concentrations of 100 mM and was compared to mice without sodium butyrate (pH-matched). Mice also received i.p. injections of anti-CTLA-4 or its isotype control (IgG2b). Significant reduction of the tumor growth was observed only in mice treated with anti-CTLA-4 without sodium butyrate in MCA101-OVA (Figure 1A) and CT26 tumor models (Figure 1C). In butyrate groups there was no difference in tumor growth between anti-CTLA-4 and IgG2b (Figure 1B and 1D). Same results were observed in the MC38 tumor model (Figure S1). HDAC inhibitors (such as butyrate) could diminish tumor-cell proliferation (15), favor tumor-antigen expression (16) as well as tumor immunogenicity. In our hands no difference of tumor growth could be observed between mice supplemented or not with sodium butyrate (Figure S2A), whereas tumor cell proliferation was inhibited by sodium butyrate *in vitro* as described by others (Figure S2B).

We measured SCFA concentrations in mice serum to confirm the higher level of butyrate in mice supplemented with sodium butyrate. Despite some heterogeneity due to the variability of water intake between mice, concentration of butyrate was higher in supplemented mice (Figure 1E, left panel) as well as proportion of butyrate among total SCFA i.e. acetate, propionate, butyrate and valerate (Figure 1E, right panel). Conversely, the concentrations of

acetate, propionate and valerate were lower in butyrate-supplemented mice, yet no significant differences were observed considering their proportion among total SCFA (Figure S3).

***Sodium butyrate reduced the accumulation of anti-CTLA-4-induced CD44<sup>high</sup> memory CD4<sup>+</sup> T cells.***

Previous study suggested that increased peripheral memory CD4<sup>+</sup> T cells after anti-CTLA-4 treatment was associated with clinical benefit in MM patients (17). We analyzed the proportion of memory CD4<sup>+</sup> T cells defined as CD44<sup>high</sup> expression among CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells in the tumor draining lymph node (tDLN) and in the spleen. As described in patients with cancer, we observed an augmentation of memory CD4<sup>+</sup> T cells in spleen and tDLN of mice treated with anti-CTLA-4 (Figure 2A). Interestingly, this increase was more important in mice that drank no butyrate, especially in tDLN ( $p < 0.0001$ ; Figure 2A, left panel) compared to mice that drank butyrate even though still significant ( $p = 0.031$ ; Figure 2A, left panel). In the spleen, the same tendency was observed but with less amplitude (Figure 2A, right panel).

***Anti-CTLA-4 treatment did not induced up-regulation of CD80 or CD86 on dendritic cells in butyrate-supplemented mice***

Since the proportion of CTLA-4 expression within CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells was not modified in tDLN between mice treated or not with anti-CTLA-4 (Figure 2B) as well as in mice supplemented or not with butyrate (Figure 2B), we examined the level of expression of CD80 and CD86 (CTLA-4 ligands) on dendritic cells (DC). The mean fluorescence intensity (MFI) of CD86 (Figure 2C, left panel) and CD80 (Figure 2D, left panel) was significantly higher in anti-CTLA-4-treated mice compared to IgG2b treated mice in mice that drank butyrate-free water. Interestingly in butyrate-supplemented mice, no up-regulation of CD86 (Figure 2C, right panel) or CD80 (Figure 2D, right panel) was detected. A similar result was observed for the percentage of CD80 within the DC population (Figure S3A). Finally, we observed a negative correlation between the proportion of CD86 and CD80 among DC and serum concentration of butyrate in anti-CTLA-4 treated mice (Figure S3B). Such correlation was not

observed in IgG2b treated mice (Figure S3C) demonstrating that butyrate inhibit anti-CTLA-4-induced CD80/CD86 up-regulation.

Altogether, these data suggest that butyrate abolished anti-tumor efficacy of CTLA-4 blockade and could prevent up-regulation of B7 molecules on DC in mice treated with anti-CTLA-4.

***Butyrate abolished anti-CTLA-4-induced OVA-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells.***

Since butyrate could limit up-regulation of B7 molecules after anti-CTLA-4 treatment, we evaluated OVA-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell induction in the tDLN of MCA101-OVA bearing mice. *In vitro* restimulation of tDLN with MHC-I (SIINFEKL) and MHC-II (OVA-265-280) OVA peptides evidenced, in mice that drank butyrate-free water, a significant induction of IFN $\gamma$  in tDLN of mice treated with anti-CTLA-4 compared to mice treated with IgG2b (Figure 2D and 2E, left panels). No such difference could be observed in mice supplemented with sodium butyrate (Figure 2D and 2E, right panels). In butyrate supplemented mice and not treated with anti-CTLA-4 (IgG2b group), a slight augmentation of IFN $\gamma$  was observed after restimulation with 0.1 and 1  $\mu$ g/mL of SIINFEKL compared to control without SIINFEKL even though not significant (Figure 2E-2F, right panels). This might be explained by the ability of butyrate to up-regulate MHC/antigen complexes (18). In our hands, a clear up-regulation of MHC molecules was observed at the tumor cell surface in a dose-dependent manner (Figure S4). Butyrate might enhance immunogenicity of tumor cells leading to higher secretion of IFN $\gamma$  after *ex-vivo* restimulation. Despite this, the efficacy of anti-CTLA-4 was completely inhibited in mice drinking water with sodium butyrate. These results suggest that sodium butyrate was able to restrain OVA-specific Th1 and Tc1 responses following CTLA-4 blockade.

***Less conventional T cells and high TCR-driven IL-10 release in patients with high concentration of serum butyrate before introduction of ipilimumab.***

We determined the concentration as well as proportion of butyrate among total SCFA in a cohort of patients with MM and treated with ipilimumab in stool and serum (Figure S5). In stools quantity and ratio in between SCFA (3:1:1 for acetate:propionate:butyrate) were as previously described (19). Interestingly only butyrate recovered in sera was correlated with butyrate from stools ( $p < 0.0017$ ); for other SCFA no or not meaningful correlation was observed (Figure S6). We previously demonstrated that baseline microbiota enriched in *Faecalibacterium* and other *Firmicutes* was associated with better outcome in MM patients treated with ipilimumab (7). Q-PCR analysis on baseline feces revealed higher relative abundance of fecal *F. prausnitzii* in patients with low systemic concentrations of butyrate (Figure 3A). No such difference could be observed for *B. fragilis* or *E. coli* assessed as controls (Figure S7).

Butyrate has been previously described as an immunoregulatory metabolite capable of favouring regulatory T cells (20, 21). However no data exist in humans, on peripheral regulatory T cells and the link with butyrate concentration. As shown in figure 3, high concentration of butyrate was associated with lower proportion of conventional T cells and higher proportion of regulatory T cells (Figure 3B). PBMC of patients were stimulated with plastic-bound anti-CD3 $\epsilon$  to determine the IL-10-driven cytokine release. IL-10-release was higher in patients with high butyrate concentration (Figure 3C). These data suggest that butyrate is associated with an immune regulatory profile in patients with MM before ipilimumab introduction.

***No IL-2 impregnation, weak ICOS up-regulation and no accumulation of memory T cells during anti-CTLA-4 treatment in patients with high serum concentration of butyrate.***

Next we assessed longitudinal modification of immune parameters in patients treated with ipilimumab according to serum butyrate concentration (7). Note that butyrate is not modified during ipilimumab treatment as well as other SCFA (Figure S5). We and others previously published that sCD25, ICOS expression and accumulation of memory T cells were rapidly

increased by anti-CTLA-4 treatment in patients that will finally have a long term clinical benefit (7, 17, 22). Moreover, anti-CTLA-4 treatment could not induce significant accumulation of memory T cells and antigen-specific T cell responses in mice supplemented with butyrate leading to a loss of antitumor efficacy (Figure 1 and Figure 2). In patients with high concentration of serum butyrate, no augmentation of sCD25 (Figure 4A), and no accumulation of memory T cells (absolute numbers, Figure 4B-4C and proportion (data not shown)), could be observed during the course of ipilimumab. Induction of ICOS was depicted in patients responding to ipilimumab (23) as well as in patients with baseline microbiota enriched in *Faecalibacterium* and other *Firmicutes* (7). We could observe ICOS induction in patients with high concentration of serum butyrate yet to a lesser extent compare to patients with low concentration of serum butyrate (Figure 4C).

#### ***High concentration of serum butyrate and clinical response to ipilimumab***

We looked forward an association between serum concentration of butyrate and clinical outcomes especially overall survival and progression free survival. Low baseline butyrate concentration (cut-off is the median value: 14, 48  $\mu\text{mol/L}$ ) was associated with longer overall survival and longer progression-free survival than patients with high level of serum butyrate ( $p = 0,0191$  and  $p = 0,0093$  respectively; Figure 5).

## **Discussion**

This work showed that systemic microbial butyrate modulates anti-CTLA-4-induced immune responses and its antitumor efficacy. SCFA, as butyrate, which are derived from gut microbial fermentation of indigestible foods, have important metabolic functions and are crucial for intestinal health. In our mouse model, serum butyrate was artificially increased without any modification of gut microbiota as demonstrated previously (20). Modulating only this parameter in mice led to anti-CTLA-4 blockade ineffectiveness. This result was not expected since butyrate has been shown through its histone deacetylase (HDAC) inhibitor activity to be

anti-tumorigenic (24), to limit angiogenesis (25) and to exert anti-inflammatory effects (11). In line with these observations we observed *in vitro* that sodium butyrate inhibits tumor cells proliferation in a dose dependent manner in accordance with previous findings (15, 16). While, these results suggest that butyrate may have a direct anti-tumor effect, no synergy for tumor eradication was observed in mice when combined with anti-CTLA-4 blockade.

Butyrate has been described to modulate immunity and inflammation (26). Note that within SCFA, butyrate is always associated with immune modulatory capacities (as for propionate) contrary to acetate (27). We hypothesized that butyrate could interfere with anti-CTLA-4-induced immune modulation. No modification of levels of CTLA-4 expression within T cells was observed. In mice, CTLA-4 blockade induces an up-regulation CD80 and CD86 co-stimulatory molecules, which was abolished by oral administration of sodium butyrate. CTLA-4 acts through cell-intrinsic (28) and cell-extrinsic pathways (29). Cell-intrinsic pathway involves the cytoplasmic domain of CTLA-4 resulting in negative signal transduction machinery in T cells. The cell extrinsic pathway evidenced in *in vivo* models (30) and *in vitro* with Human cells (29), consists of capture and removal of CD86 from monocyte-derived DC by the CTLA-4 molecule expressed by T cells by a process of trans-endocytosis (29). These phenomena resulted in decreased expression of CD86 on DC and impairment of co-stimulation via CD28. This mechanism is specific of CTLA-4/CD28 ligands and operates in an antigen-dependent manner *in vivo* (29). Butyrate was shown to prevent DC maturation *in vitro* (31, 32). In these studies butyrate was shown to act directly on DC maturation through the modulation of expression of several genes indicating a potent anti-inflammatory activity. In our settings, adding butyrate in mice treated with IgG2b did not induce modification of CD86/CD80 expression (in naive and tumor-bearing mice). These data suggest that blocking the interaction between CTLA-4 and CD86/CD80 is mandatory to observe butyrate-induced regulation. CTLA-4 being blocked we can rule-out the possibility that butyrate could augment trans-endocytosis by T cells; butyrate might rather prevent DC maturation through a direct



mechanism as suggested by *in vitro* studies (31, 32). In the MCA101-OVA tumor model, blocking CTLA-4 could increase antigen-specific Th1 and Tc1 responses in the tDLN; addition of sodium butyrate could switch off these antigen-specific Th1 and Tc1 responses. Several studies observed that sodium butyrate may induce T cell anergy (33) or reduce T cell priming capability (34). In these studies butyrate did not act directly on T cells but limited the capacity of DC to stimulate T cells. In our work, since butyrate abolished anti-CTLA-4-induced CD80/CD86 up-regulation *in vivo*, restoration of the B7/CD28 axis might remain insufficient to promote the expansion of memory T cells and antigen-specific T lymphocytes. In line with mice data where butyrate was shown to regulate the size and function of the colonic Treg pool by up-regulating IL-10 (20, 35) as well as accelerating extrathymic peripheral differentiation of Treg cells (21), an immune regulatory profile was associated with high level of serum butyrate before introduction of ipilimumab in patients. As in mice, longitudinal immune monitoring in patients with MM, provided evidence that butyrate could limit accumulation of memory T cells and was associated with resistance to ipilimumab treatment. Moreover no increase of sCD25, a marker of IL-2 impregnation or ICOS<sup>+</sup> within Treg cells, was observed in patients with high butyrate levels. These data suggest a poor restoration of CD28 signaling after CTLA-4 blockade (36) that results in reduced IL-2 secretion, memory T cell accumulation and ICOS induction in patients.

*In vivo* production of butyrate depends on the butyrate-producing bacteria such as Clostridiales cluster IV (represented by *F. prausnitzii*) and the Clostridiales cluster XIVa (represented by *Eubacterium rectale* /*Roseburia spp.*) of the phylum Firmicutes (37). In accordance with our previous finding, patients with low serum concentration of butyrate have higher relative abundance in *F. prausnitzii*. The level of fecal butyrate is influenced by several factors such as the gut microbiota composition (38), the transit time and the available substrata (39). Butyrate is also the major energy source for colonocytes (12), playing a crucial role in proliferation, differentiation of epithelial cells and gut permeability (19). Systemic

concentrations of SCFA depend on both the production and absorption rates in the gut, acetate being absorbed in the highest amount in the liver and reaches the highest peripheral concentrations (19–160  $\mu\text{mol/l}$ ) compared to propionate (1–13  $\mu\text{mol/l}$ ) and butyrate (1–12  $\mu\text{mol/l}$ ) (19). Peripheral concentrations measured in some patients with MM were clearly above these previously published values. It has been shown that gut microbiota impacts on the level of expression of enzymes involved in SCFA metabolism. Particularly butyrate-producing microbes increase the level of acyl CoA dehydrogenase involved in  $\beta$ -oxidation (13) and colonic mitochondrial 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA (mHMGCoA) synthase responsible for the biosynthesis of ketone bodies from butyrate (40). On the contrary absence of butyrate-producing microbes led to low levels of expression of these enzymes and low metabolism of butyrate (13, 40) . In line with these studies, we brought evidence that microbiota enriched with *F. prausnitzii* is associated with low systemic butyrate. Thus microbiota enriched with butyrate-producing bacteria should favor local (gut) metabolism of butyrate limiting its systemic recovery responsible for indirect microbiota-imprint on systemic immunity.

In conclusion, our study highlights the impact of systemic microbial butyrate on the anti-tumor response of anti-CTLA-4 blockade. This study provides a new insight into the relationship between the composition of the gut-microbiota and the clinical response to ipilimumab. The study of microbiota-derived metabolites should therefore represent an important area of research to identify and understand these links. Finally, forcing CD80/CD86 up-regulation in these patients could represent a new strategy to improve ipilimumab response rate.

## References

1. H. Bour-Jordan *et al.*, Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. *Immunol. Rev.* **241**, 180–205 (2011).
2. C. Robert *et al.*, Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2517–2526 (2011).
3. F. S. Hodi *et al.*, Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**, 711–723 (2010).
4. M. Maio *et al.*, Five-year survival rates for treatment-naïve patients with advanced melanoma who received ipilimumab plus dacarbazine in a phase III trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 1191–1196 (2015).
5. J. Larkin *et al.*, Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **373**, 23–34 (2015).
6. M. Vétizou *et al.*, Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science.* **350**, 1079–1084 (2015).
7. N. Chaput *et al.*, Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* (2017), doi:10.1093/annonc/mdx108.
8. A. Sivan *et al.*, Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science.* **350**, 1084–1089 (2015).
9. K. Dubin *et al.*, Intestinal microbiome analyses identify melanoma patients at risk for checkpoint-blockade-induced colitis. *Nat. Commun.* **7**, 10391 (2016).
10. L. Zitvogel, R. Daillère, M. P. Roberti, B. Routy, G. Kroemer, Anticancer effects of the microbiome and its products. *Nat. Rev. Microbiol.* (2017), doi:10.1038/nrmicro.2017.44.
11. N. Cerf-Bensussan, V. Gaboriau-Routhiau, The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 735–744 (2010).
12. D. R. Donohoe, A. Wali, B. P. Brylawski, S. J. Bultman, Microbial regulation of glucose metabolism and cell-cycle progression in mammalian colonocytes. *PloS One.* **7**, e46589 (2012).
13. D. R. Donohoe *et al.*, The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab.* **13**, 517–526 (2011).
14. K. Meijer, P. de Vos, M. G. Priebe, Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **13**, 715–721 (2010).
15. M. Comalada *et al.*, The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **132**, 487–497 (2006).

16. B. Singh, A. P. Halestrap, C. Paraskeva, Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources. *Carcinogenesis*. **18**, 1265–1270 (1997).
17. J. Felix *et al.*, Ipilimumab reshapes T cell memory subsets in melanoma patients with clinical response. *Oncoimmunology*. **5** (2016), doi:10.1080/2162402X.2015.1136045.
18. W. J. Magner *et al.*, Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. **165**, 7017–7024 (2000).
19. J. G. Bloemen *et al.*, Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* **28**, 657–661 (2009).
20. P. M. Smith *et al.*, The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. **341**, 569–573 (2013).
21. N. Arpaia *et al.*, Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. **504**, 451–455 (2013).
22. D. Hannani *et al.*, Erratum: anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade: obligatory contribution of IL-2 receptors and negative prognostic impact of soluble CD25. *Cell Res*. **25**, 399–400 (2015).
23. H. Chen *et al.*, Anti-CTLA-4 therapy results in higher CD4+ICOShi T cell frequency and IFN-gamma levels in both nonmalignant and malignant prostate tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 2729–2734 (2009).
24. N. J. Emenaker, M. D. Basson, Short chain fatty acids differentially modulate cellular phenotype and c-myc protein levels in primary human nonmalignant and malignant colonocytes. *Dig. Dis. Sci.* **46**, 96–105 (2001).
25. C. Pellizzaro, D. Coradini, M. G. Daidone, Modulation of angiogenesis-related proteins synthesis by sodium butyrate in colon cancer cell line HT29. *Carcinogenesis*. **23**, 735–740 (2002).
26. E. Blacher, M. Levy, E. Tatrovsky, E. Elinav, Microbiome-Modulated Metabolites at the Interface of Host Immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. **198**, 572–580 (2017).
27. E. E. Canfora, J. W. Jocken, E. E. Blaak, Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **11**, 577–591 (2015).
28. C. E. Rudd, A. Taylor, H. Schneider, CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol. Rev.* **229**, 12–26 (2009).
29. O. S. Qureshi *et al.*, Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*. **332**, 600–603 (2011).
30. M. F. Bachmann, G. Köhler, B. Ecabert, T. W. Mak, M. Kopf, Cutting edge: lymphoproliferative disease in the absence of CTLA-4 is not T cell autonomous. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. **163**, 1128–1131 (1999).
31. L. Liu *et al.*, Butyrate interferes with the differentiation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Cell. Immunol.* **277**, 66–73 (2012).

32. M. D. Säemann *et al.*, Bacterial metabolite interference with maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 238–246 (2002).
33. S. K. Jackson, A. DeLoose, K. M. Gilbert, The ability of antigen, but not interleukin-2, to promote n-butyrate-induced T helper 1 cell anergy is associated with increased expression and altered association patterns of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Immunology.* **106**, 486–495 (2002).
34. Y. Qiang *et al.*, Butyrate and retinoic acid synergistically imprint mucosal-like dendritic cell development from bone marrow cells. *Clin. Exp. Immunol.* (2017), doi:10.1111/cei.12990.
35. Y. Furusawa *et al.*, Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature.* **504**, 446–450 (2013).
36. G. J. Freeman *et al.*, Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science.* **262**, 909–911 (1993).
37. M. A. Mahowald *et al.*, Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 5859–5864 (2009).
38. S. H. Duncan *et al.*, Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1073–1078 (2007).
39. J. H. Cummings, E. W. Pomare, W. J. Branch, C. P. Naylor, G. T. Macfarlane, Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut.* **28**, 1221–1227 (1987).
40. C. Cherbuy *et al.*, Expression of mitochondrial HMGCoA synthase and glutaminase in the colonic mucosa is modulated by bacterial species. *Eur. J. Biochem.* **271**, 87–95 (2004).

## **Acknowledgements**

CC was supported by fellowships from Fondation pour la Recherche Medicale (FRM).

## **Funding**

This study was funded by Gustave Roussy Cancer Campus, Fondation Gustave Roussy, the Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), the Direction Générale de l'Offre de Soins (DGOS TRANSLA N°12-174), the Institut National du Cancer (INCa N° 2012-062; Cancéropôle: N° 2012-1-RT-14-IGR-01), and SIRIC SOCRATE (INCa DGOS INSERM 6043), MMO program: ANR-10IBHU-0001). Bristol-Myers Squibb (IGR II-ON Project referred as Gold project).

**Competing interests:** N. Chaput reports research grants from Cytune Pharma, GSK, BMS, Sanofi. C. Robert has participated in advisory boards for Roche, GSK, Merck, Novartis, Amgen, BMS and Novartis. K. Fizazi has participated in advisory boards for Merck and Genentech. F. Carbonnel has participated in advisory 438 boards for MSD (oncology) and Enterome and has been a speaker for Hospira and Mayoly Splindler. E. Soularue has participated in advisory board for Novartis. The other authors have no conflicts of interest to declare.

## **Supplemental Materials:**

Material and Methods

Table S1-S4

Figures S1-S7

# Figures legends

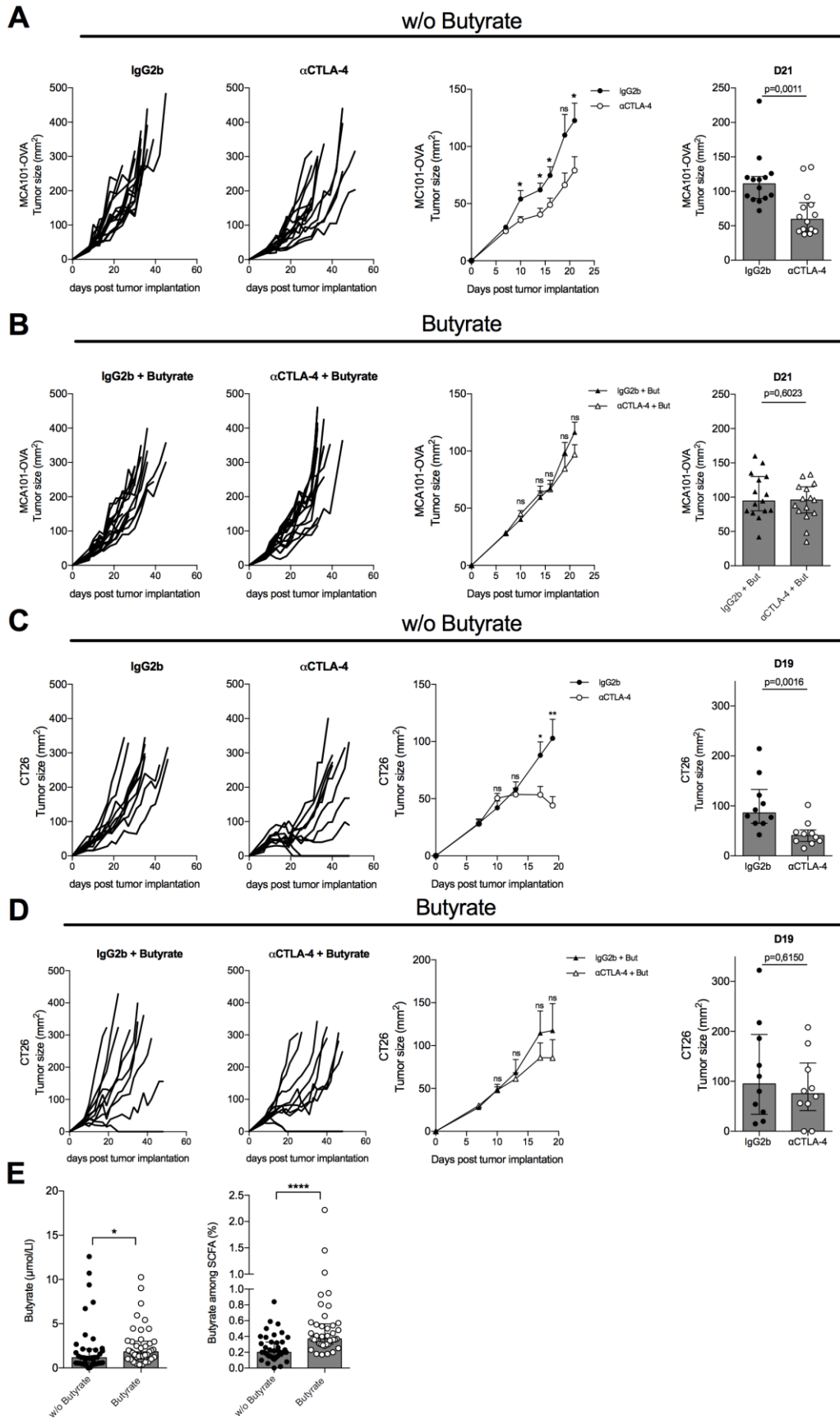
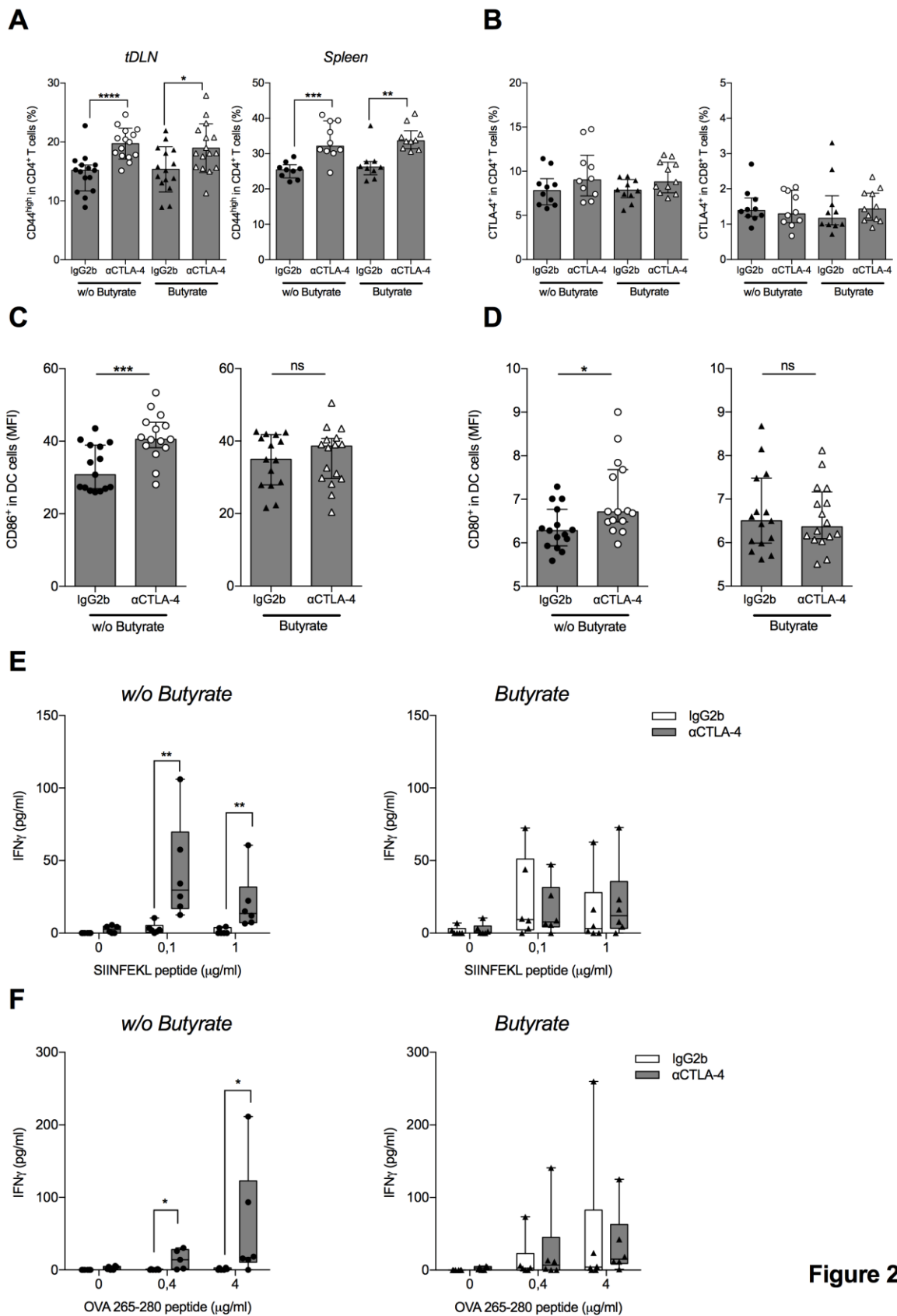


Figure 1

**Figure 1. Sodium butyrate inhibits antitumor efficacy of CTLA-4 blockade in mice.**

Tumor growth of MCA101-OVA and CT26 in mice without (A and C respectively) or with (B and D respectively) sodium butyrate in drinking water and treated with anti-CTLA-4 (9D9) or isotype control (IgG2b). Left panels show the MCA101-OVA and CT26 tumor size over time after tumor inoculation. Each line represents one mouse. Middle panels depict tumor size (mean  $\pm$  SD) in mice treated with anti-CTLA-4 or IgG2b from one representative experiment out of two (C-D) or three (A-B) independent experiments (n=9-11 mice/group). Right panels (A-B) represent median tumor size on D21 from pooled independent experiments (n=10 (A) and 15 (B) mice/group). Right panels (C-D) represent median tumor size on D19 from pooled independent experiments (n=10 mice/group). (E) Concentration (left panel) and percentage (right panel) of serum butyrate in mice from pooled independent experiments (n= 39-41 mice/group). Each dot represents one mouse; *p*-values are indicated on each graph; Wilcoxon test was used. \* *p* < 0.05; \*\* *p* < 0.01; \*\*\* *p* < 0.001; ns, not significant.

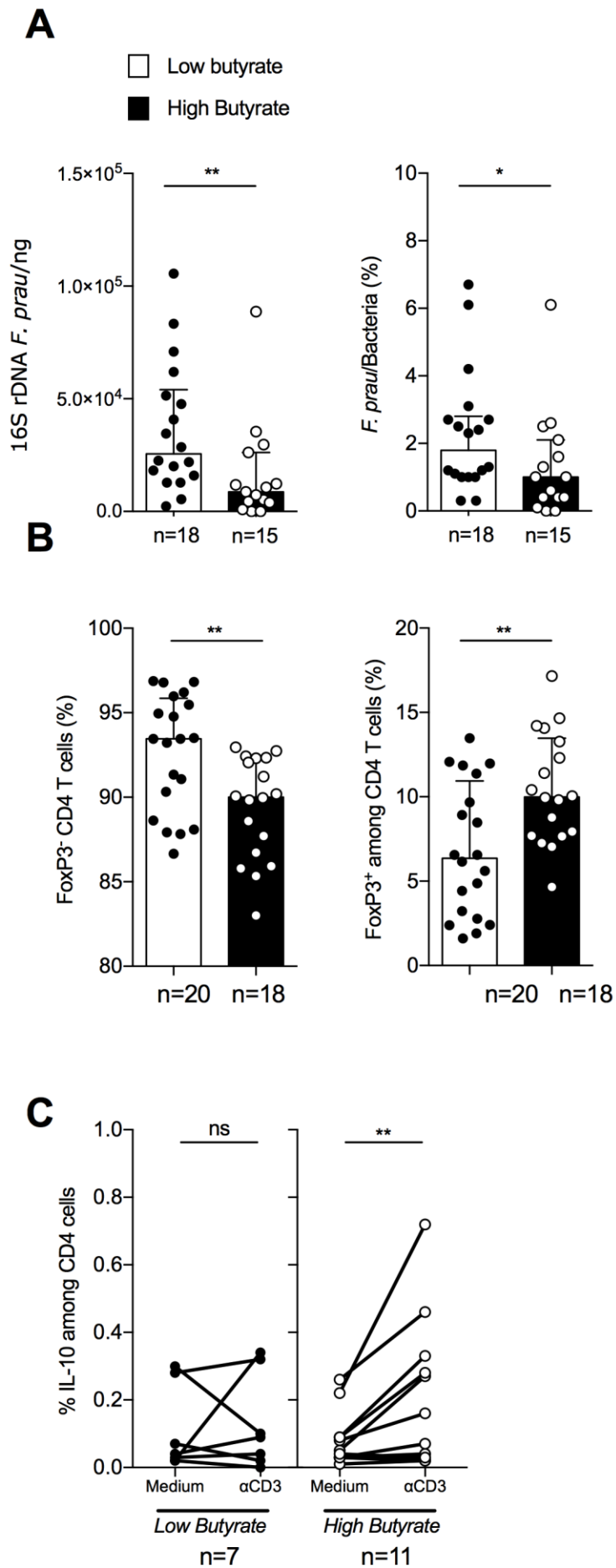




**Figure 2**

**Figure 2. Sodium butyrate limits anti-CTLA-4-induced DC maturation and T cell priming.**

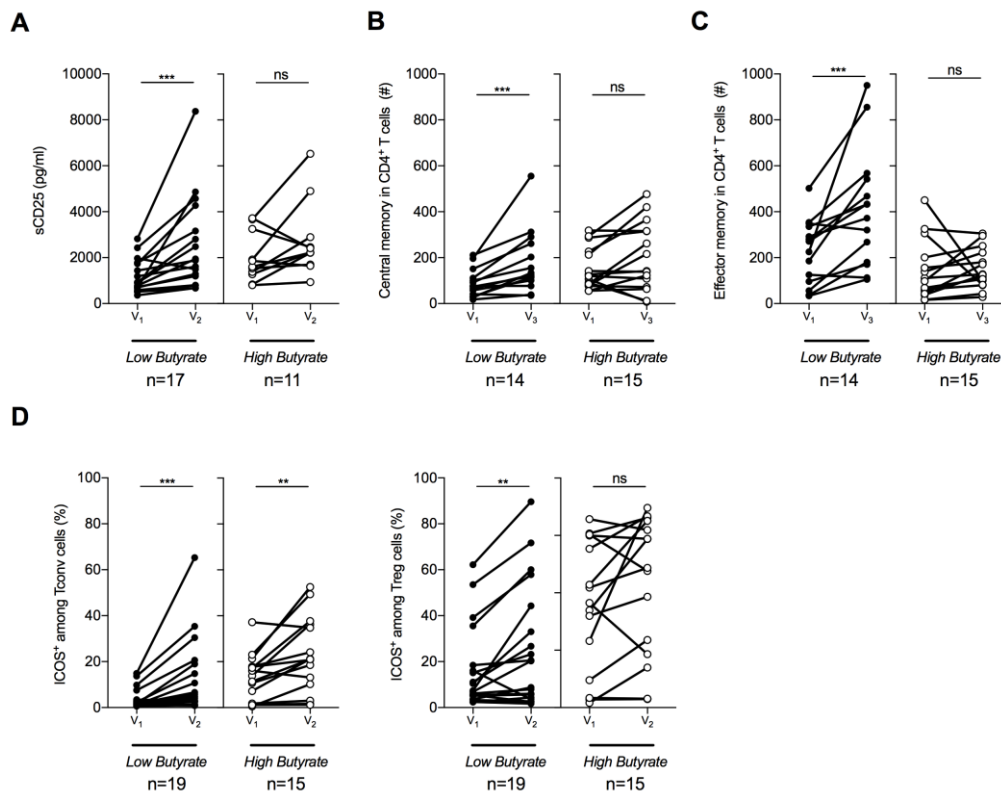
(A) Percentage of CD44<sup>high</sup> among CD4<sup>+</sup>T cells in the tumor-draining lymph node (tDLN) and in the spleen from pooled independent experiments (n=9-15 mice per group). (B) Percentage of CTLA-4<sup>+</sup> among CD4<sup>+</sup> T cells (left panel) or CD8<sup>+</sup> T cells (right panel) in tDLN from two independent experiments (n=10-11 mice). Mean fluorescence intensity (MFI) of CD86 (C) and CD80 (D) among dendritic cells (DC) in the tDLN from pooled independent experiments (n=14-15 mice). IFN $\gamma$  concentration after *ex vivo* restimulation of tDLN with MHC-I (SIINFEKL) (E) or MHC-II (OVA-265-280) OVA peptides (F) from one representative experiment out of two independent experiments (n=6 mice per group). *p*-values are indicated on each graph; Wilcoxon test was used. \* *p* < 0.05; \*\* *p* < 0.01; \*\*\* *p* < 0.001; ns, not significant.



**Figure 3**

**Figure 3. Baseline conventional CD4<sup>+</sup> T cells and TCR-driven IL-10 release in patients according to serum butyrate concentration.**

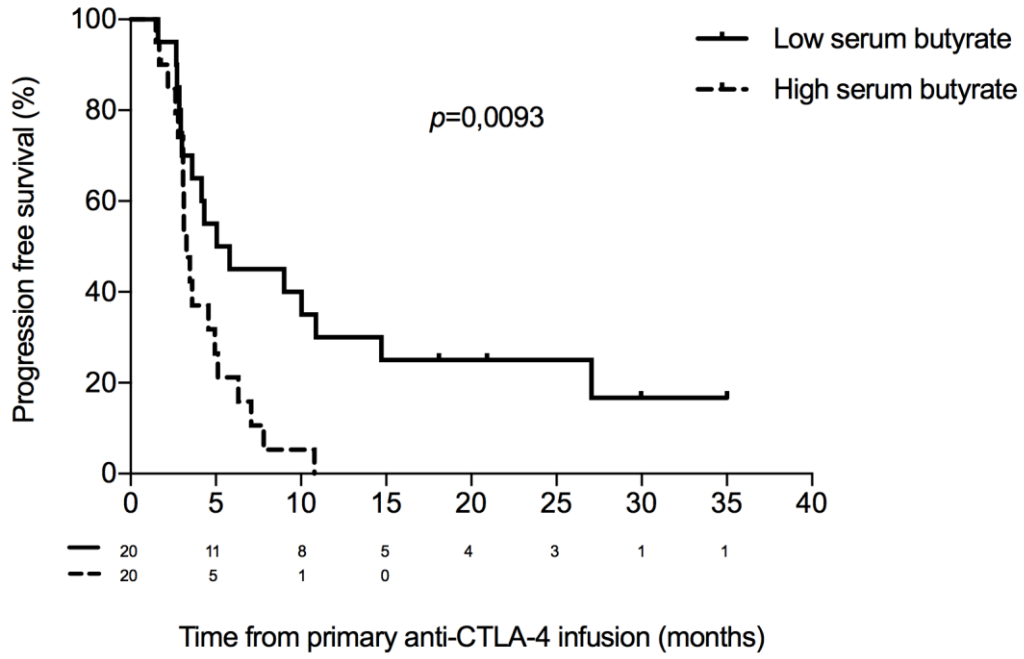
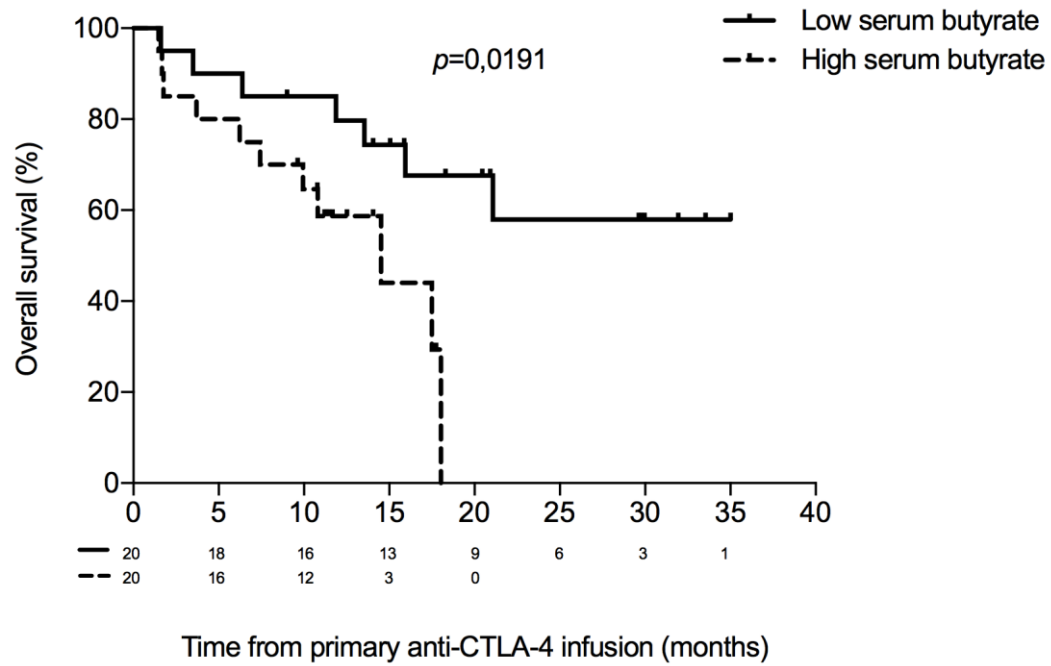
(A) Q-PCR analyses on feces at baseline of mean quantity 16S rDNA per ng of total genomic DNA for *F. prausnitzii* (16S rDNA *F.prau*/ng; left panel) and *Faecalibacterium prausnitzii*/ng to 16S rDNA bacteria/ng ratio x 100 (*F.prau*/Bacteria (%); right panel). Each dot represents mean quantity (assessed in duplicate for each sample) for one patient. (B) Percentage of conventional CD4<sup>+</sup> T cells (FoxP3<sup>-</sup>) (left panel) and percentage of Treg cells (FoxP3<sup>+</sup>) (right panel). (C) Percentage of IL-10<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup> T cells after 24h of culture in medium +/- plastic-bound anti-CD3ε. Each dot represents one patient. n are indicated on each graph; p-values are indicated on each graph; Mann–Whitney (A-B) and Wilcoxon (C) tests were used. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns, not significant.



**Figure 4**

**Figure 4. Longitudinal modulation of sCD25, ICOS expression and memory CD4<sup>+</sup> T cell during the course of ipilimumab according to serum butyrate concentration.**

(A) Serum concentration of sCD25 was monitored before ipilimumab treatment (V<sub>1</sub>) and after one or two injections of ipilimumab (V<sub>2</sub>). (B) Number of central and (C) effector memory CD4<sup>+</sup> T cells was monitored in fresh whole blood before ipilimumab treatment (V<sub>1</sub>) and after two injections of ipilimumab (V<sub>3</sub>). (D) The expression of ICOS on conventional (left panel) and Treg (right panel) CD4<sup>+</sup> T cells was monitored in fresh whole blood before ipilimumab treatment (V<sub>1</sub>) and after one injection of ipilimumab (V<sub>2</sub>). Each dot represents one patient. n are indicated on each graph; Wilcoxon signed-rank test was used. *p* -values are indicated on each graph \* *p* < 0.05; \*\* *p* < 0.01; \*\*\* *p* < 0.001; ns, not significant.

**A****B****Figure 5**

**Figure 5. High serum butyrate concentration is associated with dismal outcome.**

Kaplan–Meier survival curves of patients classified into two groups according to median butyrate concentrations. (A) Overall survival (B) progression free survival. Logrank test  $p$  - values are indicated on each graph, numbers of patients at risk are indicated on each graph.

## Supplemental Tables

**Table S1.** Clinical characteristics of patients treated with ipilimumab.

Characteristics	
Median age – year [range]	63 [36-85]
Male sex (%)	24 (60)
Immune checkpoint-blockade indication, n (%)	
Melanoma	38 (95)
Prostate carcinoma	2 (5)
Melanoma stage *	
M1a	11 (30%)
M1b	1 (3%)
M1c	25 (67%)
Prior therapies, n (%)	
None	23 (58)
Chemotherapy	5 (13)
BRAF-inhibitor	2 (5)
Hormonotherapy	2 (5)
Immune check point inhibitor	8 (20)
Others	3 (8)
Treatment after progression, n (%)	
None	16 (40)
Anti-PD-1	18 (45)
Others	6 (15)
Median survival - month [range]	18 [1-35]
Median progression - month [range]	4 [1-35]

\* One patient with extended vaginal localization, surgery was not indicated



**Table S2. Antibodies used for flow cytometry in mice.**

<i>Antigen</i>	<i>Clone</i>	<i>Fluorochrome</i>	<i>Supplier</i>
<b>CD3<math>\epsilon</math></b>	145-2C11	APC-Cy7, BV421	BD bioscience
<b>CD4</b>	RM4-5	APC-A700	BD bioscience
<b>CD8<math>\alpha</math></b>	53-6.7	BV421	BioLegend
<b>CD11b</b>	M1/70	APC	BD bioscience
<b>CD11c</b>	HL3	AF-700	BD bioscience
<b>CD19</b>	1D3	BV421	BD bioscience
<b>CD25</b>	PC61	PE	BD bioscience
<b>CD44</b>	IM7	FITC	BD bioscience
<b>CD45</b>	30-F11	BV510	BD bioscience
<b>CD62L</b>	MEL-14	PerCP-Cy5.5	BD bioscience
<b>CD80</b>	16-10A1	PerCP-Cy5.5	BD bioscience
<b>CD86</b>	GL-1	PE	BD bioscience
<b>CD152</b>	UC10-4B9	PE-Cy7	BioLegend
<b>CD278</b>	7E.17G9	PE-Cy7	BD bioscience
<b>CD335</b>	29A1.4	BV421	BD bioscience
<b>FoxP3</b>	FJK-16s	APC	eBioscience
<b>I-Ab</b>	AF6-120.1	FITC	BD bioscience
<b>Helios</b>	22F6	FITC	eBioscience
<b>Ki67</b>	B56	PerCP-Cy5.5	BD bioscience
<b>Ly6C</b>	AL-21	PE-Cy7	BD bioscience
<b>Ly6G</b>	1A8	APC-Cy7	BD bioscience

**Table S3. Samples collection.** Yes corresponds to samples that were indeed collected for each patient for serum, fresh whole blood and stools at  $V_1$ ,  $V_2$  and  $V_3$

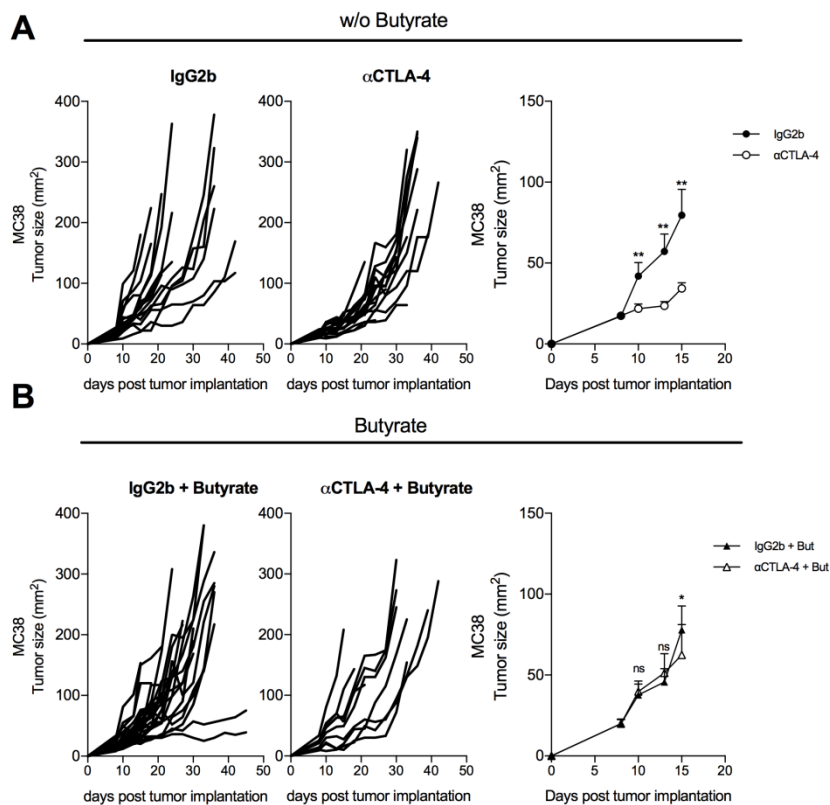
Patients #	Serum $V_1$	Serum $V_2$	Stool $V_1$	Blood $V_1$	Blood $V_2$	Blood $V_3$
1	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No
2	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
4	No	No	No	Yes	Yes	No
5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
6	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
7	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
8	No	No	No	Yes	Yes	Yes
9	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
10	Yes	No	Yes	Yes	No	No
11	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No
12	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
13	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
14	No	No	No	Yes	Yes	No
15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
16	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes
17	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
18	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes
19	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
20	No	No	No	Yes	Yes	Yes
21	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
22	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No
23	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
24	No	Yes	Yes	No	Yes	No
25	No	No	Yes	No	No	Yes
26	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
27	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
28	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes
29	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes
30	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes
31	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
32	No	No	No	No	No	No
33	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
34	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes
35	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
36	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes
37	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
38	Yes	No	Yes	Yes	No	No
39	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
40	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
41	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
42	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
43	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No
44	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
45	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes
46	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
47	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
48	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
49	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No
50	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>Number of samples</b>	<b>40</b>	<b>18</b>	<b>41</b>	<b>44</b>	<b>43</b>	<b>37</b>

**Table S4. 16S rDNA-targeted primers and probes used in this study.**

Target	Primers and Probes*	Sequence 5'-3'
<i>All bacteria</i>	F_Bact 1369F	CGG TGA ATA CGT TCC CGG
	R_Prok1492R	TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T
	<b>P_TM 1389PR</b>	<b>6FAM-CTTGTACACACCGCCCGTC-TAMRA</b>
<i>F. prausnitzii</i>	Fpra 413F	TGTAAACTCCTGTTGTTGAGGAAGATAA
	Fpra 543R	GCGCTCCCTTTACACCCA
	<b>Fpra 454PR</b>	<b>6FAM-CAAGGAAGTGACGGCTAACTACGTGCCAG-TAMRA</b>
<i>E. coli</i>	E.coli 395 F	CATGCCGCGTGTATGAAGAA
	E.coli 491R	CGGGTAACGTCAATGAGCAAA
	<b>E.coli 468PR</b>	<b>6FAM-TATTAACCTTACTCCCTTCCTCCCGCTGAA-TAMRA</b>
<i>B. fragilis</i>	B. Fragilis 44F	TCRGAAGAAAGCTTGCT
	B. Fragilis 206R	CATCCTTTACCGGAATCCT
	<b>B. Fragilis 93PR</b>	<b>6FAM-ACACGTATCCAACCTGCCCTTACTCG-TAMRA</b>
<i>DNA IAC<sup>‡</sup></i>	IAC F	TACGGATGAGGAGGACAAAGGA
	IAC R	CACTTCgCTCTgATCCATTgg
	<b>IAC PR</b>	<b>VIC®-CGCCGCTATGGGCATCGCA-TAMRA</b>

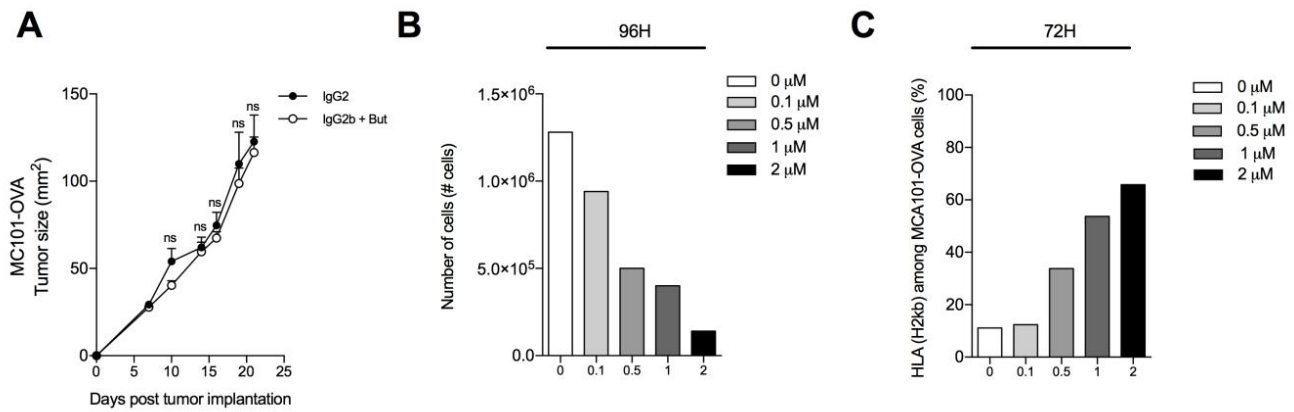
\*Probe sequences are in bold. P\_TM 1389PR, E. coli 468PR, B. fragilis 93PR and Fpra 454PR probes were 5'-labelled with FAM<sup>TM</sup> (6-carboxyfluorescein) as the reporter dye, whereas the IAC probe was 5'-labeled with VIC®(6-carboxyrhodamine) as reporter dye to allow multiplex detection. TAMRA<sup>TM</sup> was used as quencher dye at the 3'-end for all the probes. <sup>‡</sup>IAC, Internal Amplification Control; DNA IAC sequence (5'-3'): TACGGATGAGGAGGACAAAGGACGCCGCTATGGGCATCGCACCAATGGATCAGAGCGAAGTG.

## Supplemental Figures S1-S7



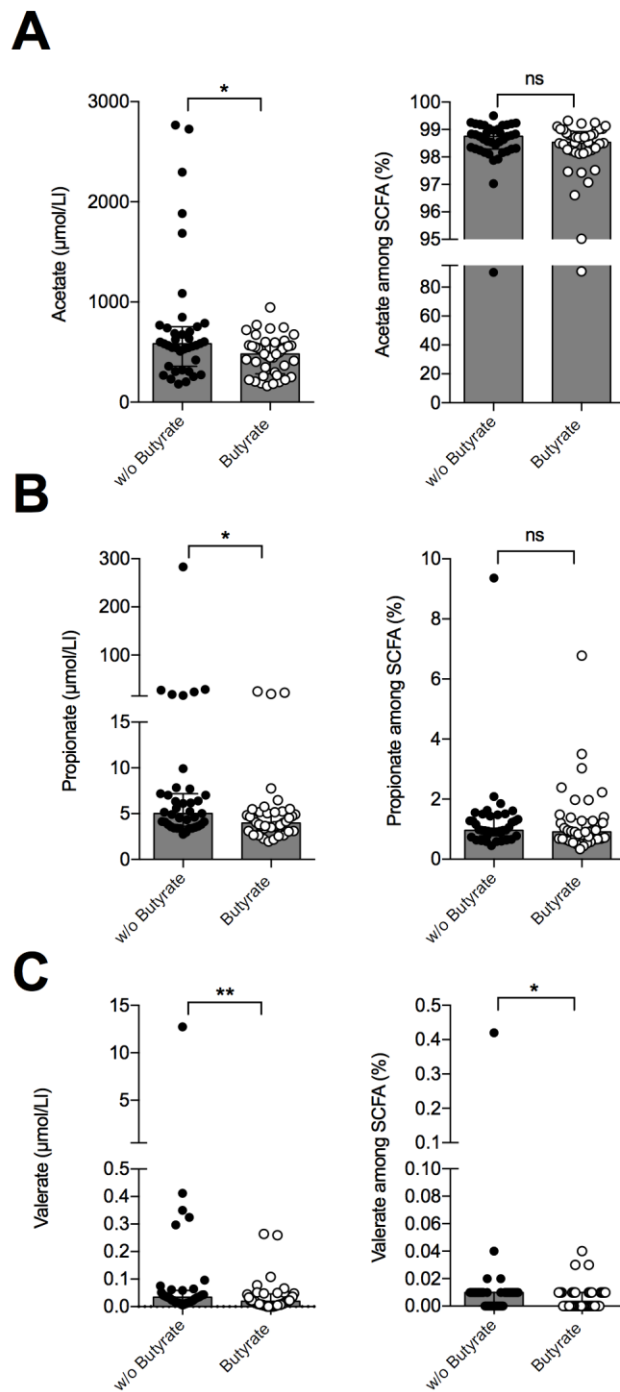
**Figure S1. Sodium butyrate inhibits antitumor efficacy of CTLA-4 blockade in mice.**

Tumor growth of MC38 in mice without (A) or with (B) sodium butyrate in drinking water and treated with three injections of anti-CTLA-4 (9D9) or isotype control (IgG2b). Left panels show the MC38 tumor size over time after tumor inoculation. Each line represents one mouse. Right panels depict mean  $\pm$  SD tumor size in mice treated with anti-CTLA-4 or its isotype control (IgG2b) from one representative experiment out of two independent experiments (n=10 mice/group). *p*-values are indicated on each graph; Mann–Whitney tests were used. \* *p* < 0.05; \*\* *p* < 0.01; \*\*\* *p* < 0.001; ns, not significant.



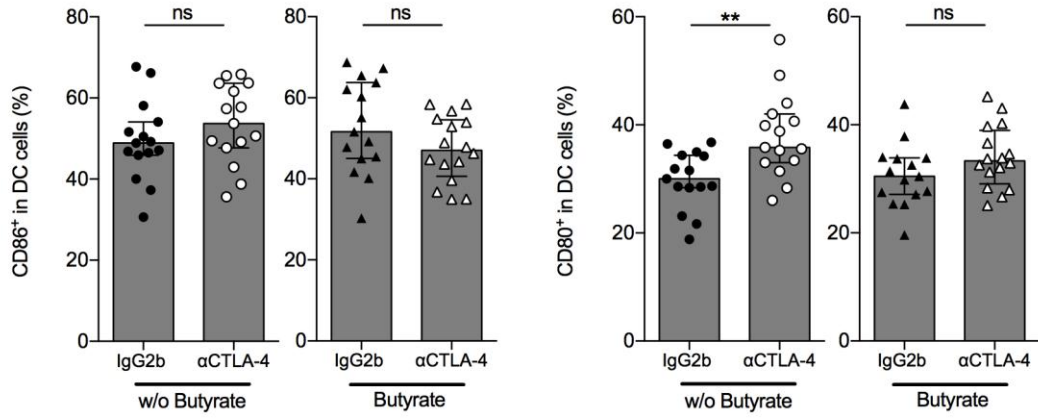
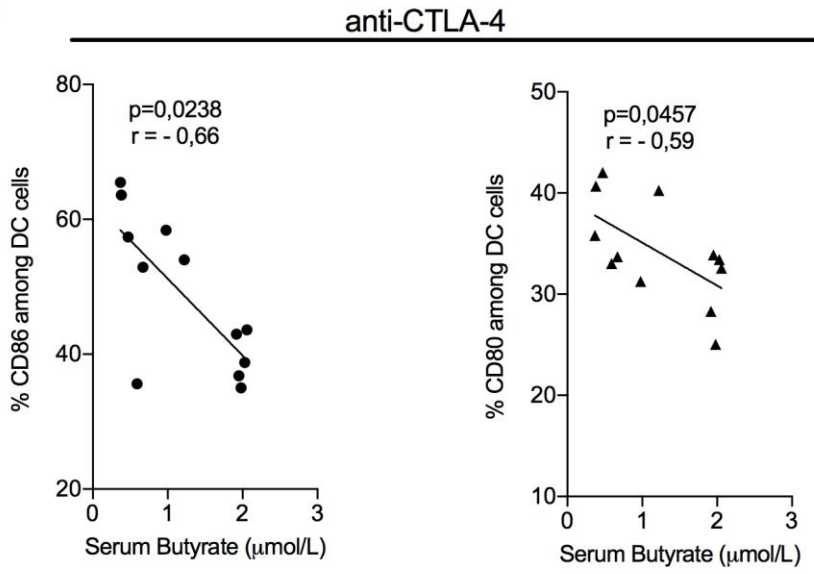
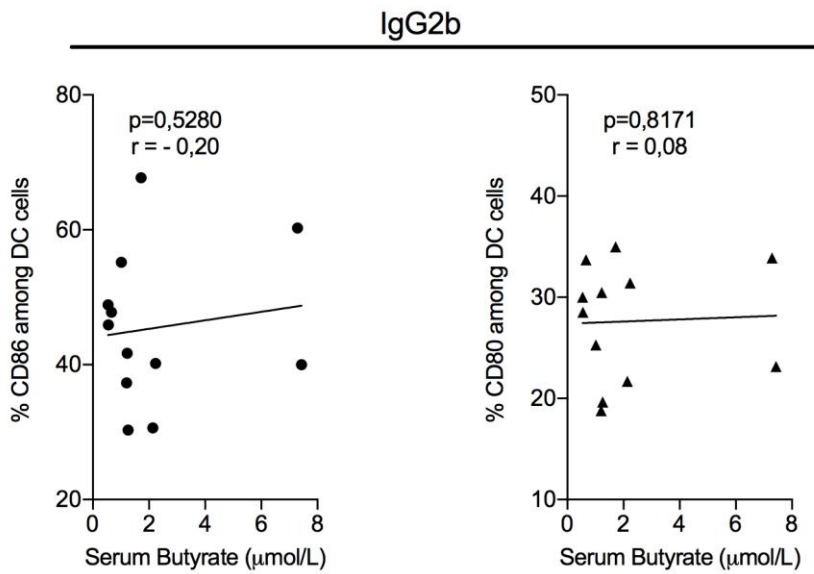
**Figure S2. Sodium butyrate modified proliferation and H-2Kb expression of the MCA101-OVA cell line.**

(A) Tumor growth of MCA101-OVA in mice treated with three injections of isotype control (IgG2b). The graph depicts the mean  $\pm$  SD of tumour sizes in mice supplemented with or without sodium butyrate from one representative experiment out of 2 independent experiments (n = 10 mice per group). (B) *In vitro* proliferation of MCA101-OVA cell line after 96h of culture in complete medium with escalating concentration of butyrate *in vivo*. (C) Percentage of H-2Kb surface-expression after 72h of culture in complete medium with escalating concentration of butyrate *in vivo*. Mann–Whitney tests were used. ns, not significant.



**Figure S3. Concentration of SCFA in serum of mice**

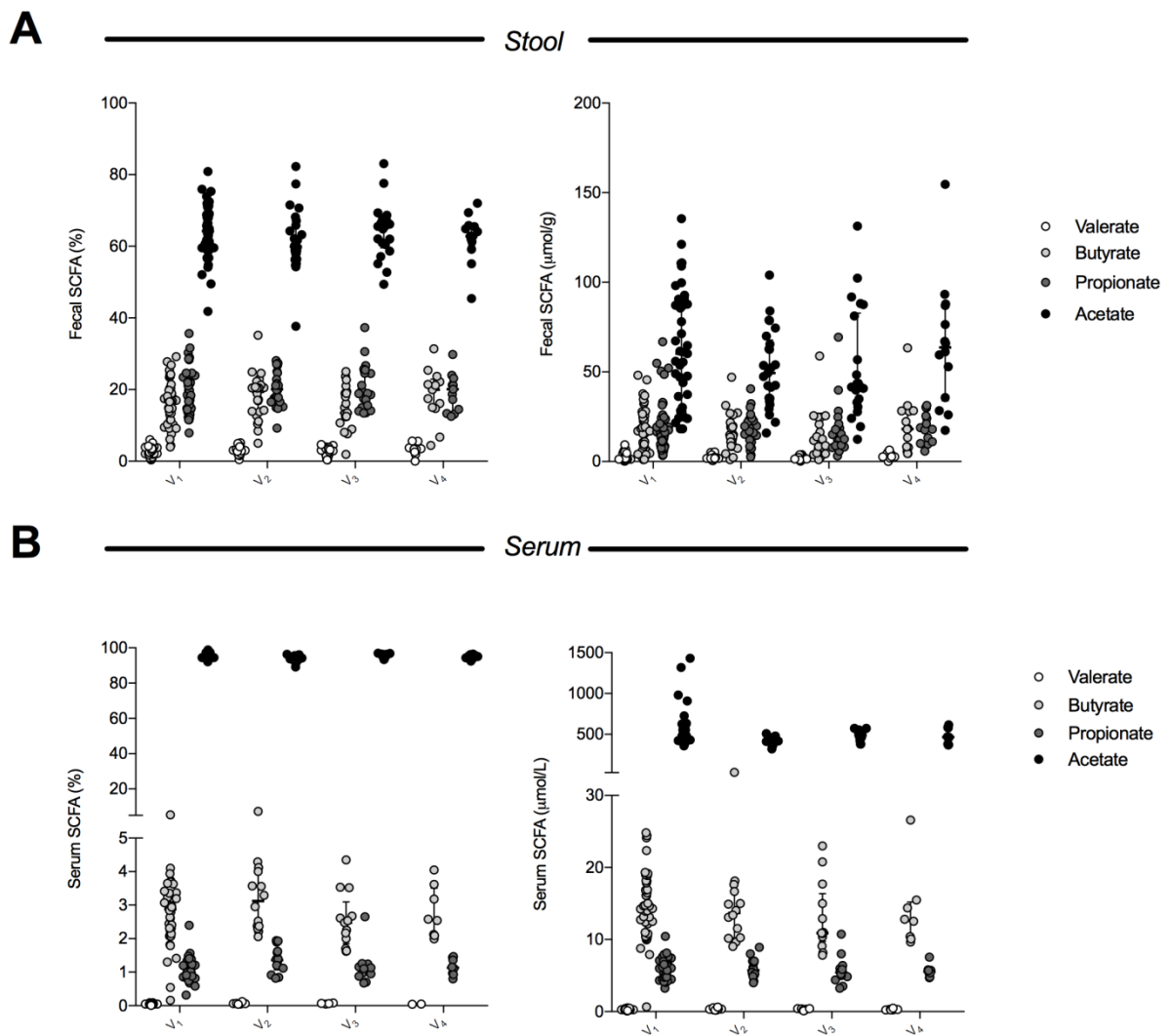
Concentrations (left panel) and percentage (right panel) of serum acetate (A), propionate (B) and valerate (C) in mice ( $n= 39\text{-}41$  mice per group). Each dot represents one mouse.  $p$ -values are indicated on each graph; Mann–Whitney tests were used. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns, not significant.

**A****B****C**

**Figure S4. Sodium butyrate limits anti-CTLA-4-induced DC maturation.**

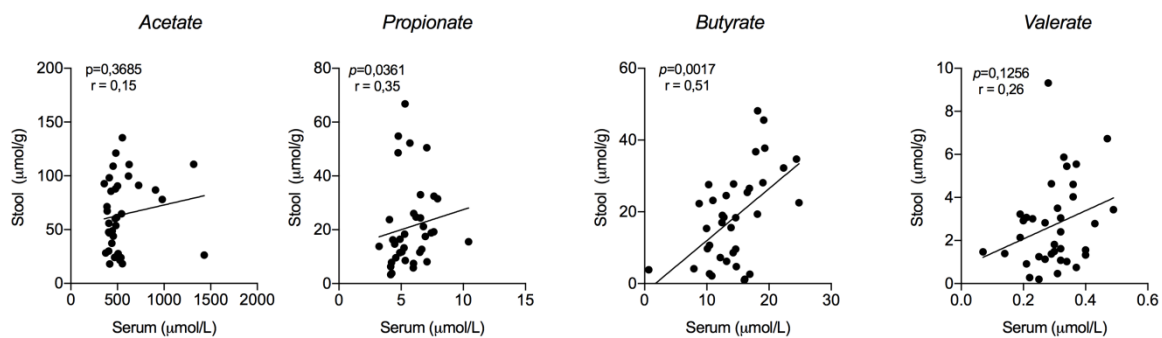
(A) Percentage of CD86 (left panel) and CD80 (right panel) among dendritic cells (DC) in the tDLN from pooled experiments (n=14-15 mice). (B-C) Correlation between the percentage of CD86 (left panel) and CD80 (right panel) and serum butyrate concentration in mice treated with anti-CTLA-4 (B) and IgG2b (C). Each dot represents one mouse. Spearman and Mann–Whitney tests were used. *p* -values are indicated on each graph \* *p* < 0.05; \*\* *p* < 0.01; \*\*\* *p* < 0.001; ns, not significant.





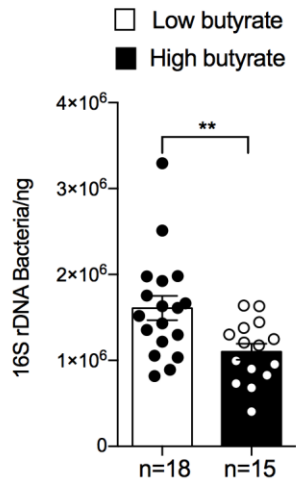
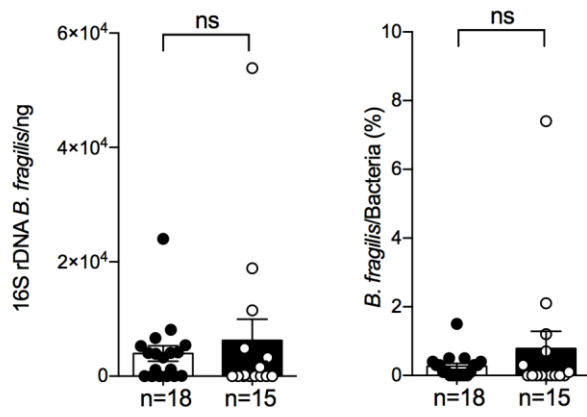
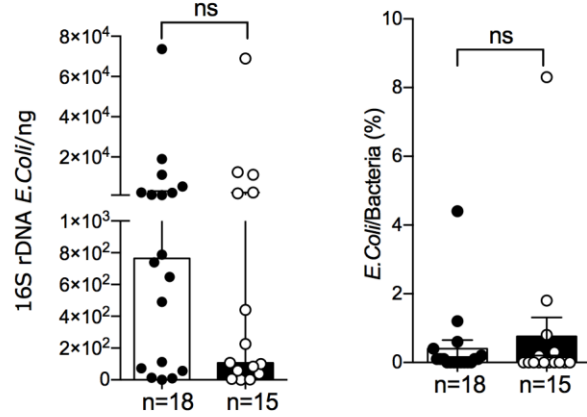
**Figure S5. SCFA quantification in stool and sera.**

(A) Percentage (left panel) and concentration (right panel) of fecal SCFA. (B) Percentage (left panel) and concentration (right panel) of serum SCFA. Each dot represents one patient.



**Figure S6. Correlations between fecal and serum SCFA in patients at baseline ( $V_1$ ).**

Correlations between concentrations of fecal and serum SCFA. Each dot represents one patient in pooled experiments. Spearman and Mann–Whitney tests were used.  $p$ -values are indicated on each graph \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns, not significant.

**A****B****C**

**Figure S7. Q-PCR on stools before introduction of ipilimumab.**

Q-PCR analyses on feces at baseline of mean quantity 16S rDNA per ng of total genomic DNA for all Bacteria (16S rDNA Bacteria/ng, A), *Bacteroides fragilis* (16S rDNA *B. fragilis*/ng; B, left panel) and *Escherichia coli* (16S rDNA *E.coli*/ng; C, left panel) and 16S rDNA/ng to 16S rDNA bacteria/ng ratio x 100 for *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*/Bacteria (%); B, right panel) and *Escherichia coli* (*E. coli*/Bacteria (%); C, right panel). Each dot represents mean quantity (assessed in duplicate for each sample) for one patient. Mann–Whitney tests were used. n and p-values are indicated on each graph \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; ns, not significant.

## **Supplemental Material and Methods**

### ***Mice and cell lines***

C57Bl/6 and Balb/c mice were purchased from Harlan Laboratories between 8 and 14 weeks of age. Mouse colon carcinoma MC38 and CT26 and fibrosarcoma MCA101-OVA cell lines were cultured in complete medium (RPMI 1640 medium supplemented with 1mM sodium/pyruvate, 1 mM of non-essential amino acids (NEAA), 100 IU/ mL penicillin/streptomycin, 2 mM L-Glutamine and 10% Fetal Bovin serum (FBS, Life Technologies)). For the MCA101-OVA cell line RPMI complete medium was supplemented with 1mg/ml hygromycin B (Thermofisher).

### ***Antibodies***

Anti-CTLA-4 (clone 9D9) and its isotype control IgG2b (clone MPC-11) were purchased from BioXcell. All of these reagents were diluted in sterile Phosphate Buffer Saline (PBS).

### ***Mouse experiments***

For all mouse experiments in the butyrate group, mice were treated 2 weeks before tumor inoculation and all along the experiment with sodium butyrate in the drinking water at the concentrations of 100mM (pH-matched) and changed every week.

Five hundred thousand of MC38 and MCA101-OVA tumor cells were inoculated subcutaneously (s.c) in the right flank of C57Bl/6 mice.  $2 \cdot 10^5$  CT26 tumor cells were inoculated subcutaneously (s.c) in the right flank of Balb/c mice. One hundred  $\mu$ g of anti-CTLA-4 or isotype control IgG2b were administered intraperitoneally (i.p) at day 7, 10 and 13. Tumor size was routinely monitored by means of a caliper. Mice were euthanized when the tumor volume  $\geq 2 \text{ cm}^3$  or boundary points were reached according to the French and European laws and regulations for the use of mice for scientific purposes.

For flow cytometry and serum analysis, mice were sacrificed 14 days post tumor inoculation, blood and draining lymph nodes were removed. Single cells were obtained after mechanical disruption. Serum samples were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until further analysis of SCFA dosages.

## ***Patients***

Forty Patients with metastatic melanoma and prostate cancer treated with ipilimumab were prospectively enrolled at Gustave Roussy Cancer Campus (Villejuif), between March 2013 and December 2014. Patients were informed of the study and consented to participate. They had a pre-specified clinical workup; feces and blood were collected at baseline ( $V_1$ ), prior to each ipilimumab infusion ( $V_2$ ,  $V_3$ ,  $V_4$ ). Patient's characteristics are describe in Table S1. All blood, serum and fecal samples used in this study are listed in table S3. Ipilimumab was administered intravenously every 3 weeks, at a dose of 3 or 10 mg/kg and could be continued after  $V_4$ , at a maintenance dose of one infusion every 12 weeks, in patients whose disease was controlled (response or stable disease). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll density gradient frozen in Hyclone media (Thermo Scientific) and stored at  $-196^{\circ}\text{C}$  for further *in vitro* experiments.

## ***Soluble immune markers in patients***

All serum samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis of soluble immune markers. Soluble CD25 (sCD25) was longitudinally quantified using Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex assay HSCRMAG-32K-01 (Millipore, Darmstadt, Germany).

## ***Flow cytometry analysis***

In mouse experiments, before staining, Fc receptors were blocked for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$  using anti-CD16/32 functional grade purified antibodies (eBioscience) at  $0.5\mu\text{g}/10^6$  cells. Cells were incubated for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$  with antibodies for cell surface staining. Antibody characteristics are described in Table S2. For Ki67 and FoxP3 staining, cells were fixed and permeabilized after cell surface staining according to the FoxP3 kit protocol (eBioscience). Samples were acquired on a Gallios Cytometer (Beckman Coulter) and analyzed using Kaluza software (Beckman Coulter). Dendritic cells (DC) were defined among CD45 positive cells by lineage negative (CD3/CD19/NKp46) and classe II MHC (IAb<sup>+</sup>) and CD11c<sup>+</sup>. In humans, immune monitoring on whole blood and on PBMC was performed as described previously (1).

### ***In vitro and ex vivo experiments***

*In vitro proliferation and H2-Kb staining of MCA101-OVA cell line:* To assess the direct effect of butyrate, we challenged 16000 tumor cells (MCA101-OVA) with escalating doses of sodium butyrate (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2  $\mu$ M) (Sigma Aldrich). At 48, 72 and 96 hours, cells were collected and viable cells were enumerated with Trypan Blue exclusion method and stained with PE-conjugated anti-H2-Kb (clone: AF6-88.5, Biolegend) or its isotype control (mouse IgG2a; Biolegend) to determine MHC class I molecule expression.

*Ex-vivo restimulation of T cells from tumor-draining lymph nodes (tDLN):* mice were sacrificed 21 days after MCA101-OVA inoculation, tDLN were removed and after mechanic dissociation  $2 \cdot 10^5$  mononuclear cells were stimulated with escalating doses of Ovalbumin CD4 epitope (OVA 265-280; Genecust) at 0, 0.4, and 4  $\mu$ g/ml or Ovalbumin CD8 epitope 257-264 (SIINFEKL; Genecust) at 0, 0.1 and 1 $\mu$ g/ml. The supernatants were assayed at 48h by ELISA for mouse IFN- $\gamma$  (Becton Dickinson).

*TCR cross-linking assay:* For cross-linking experiments, PBMC from patients with MM at V<sub>1</sub> were incubated in RPMI 1640 medium supplemented with 1mM sodium/pyruvate, 1 mM of non-essential amino acids (NEAA), 100 IU/ mL penicillin/streptomycin, 2 mM L-Glutamine and 10% Fetal Bovin serum (FBS, Life Technologie) in MaxiSorp plates (Nunc;  $2 \times 10^5$  cells per well), precoated with anti-CD3 mAb (BD Biosciences). PBMC were incubated 18 hours at 37°C and 5% of CO<sub>2</sub> then Brefeldin A (eBioscience) was added at 3 $\mu$ g/ml for 6 more hours, at the end of incubation cells were harvested, washed with PBS 1X and stained with anti-human CD4-PB (clone RPA-T4, Biolegend) CD8-KrO (Clone B9.11, Beckman Coulter) and IL-10-AF647.(clone JES-9D7, Biolegend). For IL-10 staining, permeabilization was realized with Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Bioscience, Franklins Lakes,NJ, USA) according to manufacturer instructions.

### ***Short chain Fatty Acid dosages***

Quantitation of SCFA including acetate, butyrate, propionate and valerate from serum and fecal samples was performed using LC-MS/MS method adapted from Lu Y. et al. (2). Hydrochloric acid was added to serum samples (25  $\mu$ L) and to faeces samples (20 mg) prior hydrazinquinolin (HQ) derivatization and before protein precipitation using acetonitrile. Organic phase (25  $\mu$ L) was diluted in the mobile phase (475  $\mu$ L) prior to injection for mass spectrometry analysis. SCFA free materials were used. The analyses were performed on a Acquity<sup>®</sup> UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) that included a binary solvent manager, a cooled auto-sampler and a column oven coupled with a Xevo<sup>®</sup> TQ-MS (Waters, Milford, MA, USA). A Waters BEH-C18 (2.1 x 100 mm, 1.7  $\mu$ m) from Waters (Milford, MA, USA) was used. The column was maintained at 40°C. The Waters Xevo<sup>®</sup> TQ-MS mass spectrometer was interfaced to the Acquity<sup>®</sup> UPLC system via an electrospray ionization (ESI) source used in positive mode. The system control and data acquisition were performed using MassLynx<sup>®</sup> software (v4.1, Waters, Milford, MA, USA). This method was adequately validated with good precision and recovery values according to ICH and EMA guidelines (3,4). Acetate was measured in serum from 2.5 to 1,000  $\mu$ M. Butyrate, propionate and valerate were measured in serum from 0.125 to 50  $\mu$ M. Acetate was measured in faeces from 2.25 to 150  $\mu$ mol/g. Butyrate, propionate and valerate were measured in faeces from 0.0225 to 7.5  $\mu$ mol/g.

### **Quantification of bacteria by Q-PCR**

For each patient, 200mg of feces were used. DNA extraction included a first step of mechanical lysis : samples were diluted in 400  $\mu$ L of ASL buffer in presence of 0.5 mm glass beads. Lysis was performed at 30 Hz during 30 min with the help of a TissueLyser (Qiagen). Next, samples were centrifuged at 12000 rpm during 4 min and 200  $\mu$ L of the supernatant was further extracted using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Extractions series were realized during five consecutive days (5



series), for each series, stool sample from the same patient (patient #30) was extracted, this sample confirmed the reproducibility of analyzes. Genomic DNA was immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. All DNA samples were quantified using Qubit™ 3 Fluorometer and Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (ThermoFisher) according to manufacturer instructions. For each sample dilutions were realized to test 10 ng of DNA per Q-PCR. All Q-PCR were performed using the TaqMan™ Gene Expression Master Mix kit (LifeTechnologies) in 25  $\mu\text{l}$  final volume (4  $\mu\text{l}$  of genomic DNA added per tube, 300 nM each primer and 100 to 200 nM of each probe,  $10^3$  copies of an internal amplification control (IAC)). All samples were analyzed in duplicate. All negative, very weak or discordant results were verified by another series of Q-PCR (in duplicate). All primers and probes used in this study (*all Bacteria*, *F. praunitzii*, *E. coli*, *B. fragilis* and *Internal Amplification Control (IAC)*) are presented in table S4 and were described in supplementary bibliography (5-8). Standard curves were performed using genomic DNA preparations: *F. praunitzii* kindly given by the French National Institute for Agronomic Research (INRA) (from 0.4 ng/Q-PCR (approximately  $1.2 \cdot 10^5$  16S targets) to 0.04 pg/Q-PCR (approximately 120 16S targets); *E. coli* CIP 7621 (approximately  $1.2 \cdot 10^6$  16S targets) to 0.4 pg/Q-PCR (approximately 120 16S targets)) and *B. fragilis* CIP 7716 (from 1.2 ng/Q-PCR (approximately  $1.2 \cdot 10^6$  16S targets) to 0.12 pg/Q-PCR (approximately 120 16S targets)). All primers, probes and IAC'sDNA were purchased from Sigma Life Science (Woolands, TX, USA). Amplifications were carried out using the following ramping profile: 1 cycle at  $50^{\circ}\text{C}$  for 1 min, 1 cycle at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min, followed by 40 cycles of  $95^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 min. Excepted for the *B. fragilis* Q-PCR, the annealing was at  $58^{\circ}\text{C}$  for 1 min. Q-PCR data were normalized to the expression levels of total bacteria measured by the all bacterial Q-PCR with *E. coli* standard curve. Final analyses according to serum butyrate levels were realized on data from 33 patients for whom serum butyrate concentrations and stool were available at  $V_1$ .

### ***Statistical analyses***

Statistical analyses were performed using the Prism 7.0 (GraphPad) Software. The two-sided Wilcoxon signed rank test was used to compare paired groups, while the Wilcoxon test was performed to compare 2 unmatched groups. Correlations between fecal and serum SCFA parameters were assessed using the Spearman correlation coefficient. Overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) according to SCFA dosages were estimated using the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test. OS and PFS analyses were carried out using PROC lifetest of SAS software, Version 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). All tests are two-tailed and were considered significant at a  $p$  value  $<0.05$ . Significant  $p$  values were annotated as follows  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ ,  $****p<0.0001$ , otherwise not significant was annotated ns.

### ***Human and mouse studies approval***

Immune monitoring in the blood of patients was approved by the Kremlin Bicêtre Hospital Ethics Committee (SC12-018; ID-RCB-2012-A01496-37) and the Declaration of Helsinki protocols were followed. Patients provided their written informed consent to participate in these studies prior to inclusion in the study. All animal experiments were carried out in accordance with French and European laws and regulations and approved by the French Animal Experimentation Ethics Committee n°26 (02004.02).

## Supplementary Bibliography

1. N. Chaput et al., Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann Oncol* (2017) 28 (6): 1368-1379.
2. Y. Lu, D. Yao, C. Chen. 2-Hydrazinoquinoline as a Derivatization Agent for LC-MS-Based Metabolomic Investigation of Diabetic Ketoacidosis. *Metabolites* (2013). 3, 993–1010.
3. International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (Q2R1) revised in November 2005.
4. Guideline on Bioanalytical Method Validation 21 Jul 2011, Evaluation Medicine Agency, [http://ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_Guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_Guideline/2011/08/WC500109686.pdf)
5. JP. Furet et al., Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Ecol.* (2009) Jun;68(3):351-62
6. Lopez-Siles et al. Mucosa-associated Faecalibacterium prausnitzii and Escherichia coli co-abundance can distinguish Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease phenotypes. *Int J Med Microbiol* (2014) May;304(3-4):464-75.
7. Huijsdens, X.W et al. J. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* (2002) Dec;40(12):4423-7.
8. Jia Tong et al., Application of quantitative real-time PCR for rapid identification of Bacteroides fragilis group and related organisms in human wound samples. *Anaerobe.* (2011) Apr;17(2):64-8.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

### **Efficacité anti-tumorale et colites induites par l'anti-CTLA-4 sont-ils associés ?**

Mon travail de thèse a porté essentiellement sur les deux axes limitant l'utilisation de l'ipilimumab : l'efficacité thérapeutique obtenue chez un nombre limité de patients atteints de mélanome métastatique et la survenue de colites inflammatoires induites par l'anti-CTLA-4.

Nous nous sommes interrogés en premier lieu sur l'existence de mécanismes physiopathologiques communs à ces deux phénomènes. Certaines de nos données du microbiote fécal semblent associées aux 2 effets, alors que les données immunologiques et celles reliées aux métabolites de la flore nous laissent penser qu'il existe des mécanismes dissociés entre réponse clinique et la survenue de colite. Des études cliniques ont cherché des liens entre les deux phénomènes. Une étude a mis en évidence que les patients traités par ipilimumab et présentant des effets indésirables d'origine immunologiques grades III/IV ont une meilleure réponse thérapeutique (158). Cette étude est basée sur un très faible nombre de patients (n=16), ne permet pas de conclure à l'association entre l'efficacité clinique et la toxicité. Une étude rétrospective incluant 498 patients recevant de l'ipilimumab à différentes doses (0,3, 3 et 10mg/kg) montre que des doses élevées sont associées à la fois à une meilleure réponse clinique et à la survenue plus fréquente de toxicités inflammatoires (304). Bien qu'elles soient dose-dépendantes, on ne peut pas exclure que la toxicité et l'efficacité, soient liées à des mécanismes indépendants. Plus récemment, il a été montré que les patients avec des toxicités inflammatoires sévères induites par la combinaison de l'anti-CTLA-4 et de l'anti-PD-1 ont des réponses cliniques durables malgré l'arrêt de ces traitements anti-tumoraux (305). Dans ce travail, les toxicités sont aiguës et réversibles à l'arrêt des immunothérapies, alors que la réponse anti-tumorale est durable. Ces différentes observations cliniques ne permettent pas de conclure sur le lien entre efficacité et toxicité colique. De plus, la réponse anti-cancéreuse semble s'installer progressivement alors que les effets indésirables

d'origine immunologique sont le plus souvent aigus et réversibles sous immunosuppresseurs et à l'arrêt des traitements.

### **Peut-on étudier dans le même temps les mécanismes impliqués dans l'efficacité anti-tumorale et le développement de colites induites par l'anti-CTLA-4 ?**

Comprendre les mécanismes impliqués dans l'efficacité et les toxicités des immunothérapies qu'ils soient associés ou pas, nécessite à la fois des études translationnelles mais également des modèles précliniques. Malheureusement, les modèles murins sauvages ne développent pas d'effet indésirable d'origine immunologique. Une étude a même ciblé 3 axes à la fois : l'apoptose (en engageant le tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL) et 2 axes de co-stimulation (en bloquant à la fois le CD40 et le CD137 ou 4-1BB). Dans ce travail, les souris sauvages ne développent pas de toxicités inflammatoires (306). Dans ce travail, il n'y avait pas de blocage du CTLA-4. Nous en avons fait l'expérience, en supposant que l'association d'un inhibiteur d'immuno-checkpoint (anti-CTLA-4) avec un agoniste d'un co-stimulateur (Inducible CoStimulator, ICOS) connu pour être induit par l'anti-CTLA-4 pourrait de manière synergique entraîner une réponse inflammatoire colique. De fait, l'anti-CTLA-4 associé ou non à un agoniste d'ICOS injecté en intra-péritonéal au long cours (hebdomadaire pendant 3 mois) n'induit pas de toxicité chez les souris (pas de perte de poids, pas de diarrhée, pas de décès) (*données non montrées*). Des stratégies permettant d'étudier ces effets secondaires d'origine immunologique sont utilisées, telles que les modèles avec des susceptibilités génétiques au développement de maladies auto-immunes (NOD, SJL/J) (307). Une étude chez la souris a montré que chez les souris le blocage de CTLA-4 favorisait dans le colon l'expansion de lymphocytes Treg ICOS<sup>+</sup> capables de produire des quantités importantes d'IL-10 (165). Dans ce modèle le blocage de CTLA-4 protégeait même du développement d'une colite induite par le dextran sodium sulfate (DSS) par un mécanisme dépendant de l'IL-10. Ainsi il est très difficile d'utiliser des modèles de souris pour comprendre les mécanismes

chez les patients puisqu'il semblerait que le système immunitaire des souris compense systématiquement le blocage de CTLA-4 par une accumulation importante de Treg ICOS<sup>+</sup> dans la muqueuse colique. Notre étude chez l'homme (Article 1<sup>ier</sup>) semble montrer dans le tissu colique une amplification prépondérante de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels exprimant ICOS<sup>+</sup> par rapport aux Treg ICOS<sup>+</sup>. Ainsi, les Treg ICOS<sup>+</sup> ne permettent pas de contre-réguler les réponses T effectrices induites lors du blocage de CTLA-4. Evidemment, pour affirmer cette hypothèse il aurait fallu analyser le tissu colique de patients traités par ipilimumab et ne développant de colite et observer chez eux une amplification préférentielle de Treg ICOS<sup>+</sup>. Cependant nos expérimentations préliminaires à partir de PBMC confirment une augmentation de la sécrétion d'IL-10 après un co-engagement du TCR et de la molécule de co-stimulation ICOS après un traitement ipilimumab en particulier chez les patients ne développant pas la colite (*données non montrées*). Nous pouvons supposer que la production d'IL-10 dépendante d'ICOS pourrait protéger chez les patients de la colite inflammatoire. Chez l'homme, l'existence d'une maladie auto-immune sous-jacente même en rémission est théoriquement une contre-indication à l'utilisation d'anti-CTLA-4 et autres immunothérapies. L'utilisation d'immunothérapies dans des modèles modifiés génétiquement pour favoriser le développement de maladies auto-immunes ne permet pas d'extrapoler les résultats précliniques à l'homme. D'autres modèles avec déplétion en Treg sont également utilisés pour l'analyse des effets secondaires d'origine immunologique. Le CTLA-4 est connu pour être fortement exprimés sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et particulièrement les Treg (exprimant FoxP3) (61,62). Des travaux suggèrent que l'anti-CTLA-4 induit une déplétion en Treg par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) au niveau des sites tumoraux (308–312). Des modèles précliniques plus récents ont été élaborés pour dépléter de manière conditionnelle et transitoire les Treg au niveau de la tumeur (FoxP3-DTR) et en périphérie via de la toxine diphtérique (313). Dans ce travail, la survenue d'effets indésirables d'origine immunologiques (colique, hépatique, oculaire et pulmonaire) nécessite à la fois une

déplétion en Treg et un blocage du CTLA-4 et du PD-1. Chez l'homme, nous avons constaté dans ce travail de suivi des paramètres immunologiques dans le sang périphérique, que les patients traités par ipilimumab n'ont pas de déplétion significative en Treg (*données non montrées*). Dans une autre étude, une augmentation des Treg et des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs systémiques sous ipilimumab est également observée (151). Ces données suggèrent l'absence de déplétion des Treg au niveau périphérique, et une efficacité thérapeutique préférentiellement liée à une balance effecteur/régulateur en faveur de l'activation lymphocytaire et d'une inhibition des fonctions suppressives des Treg. De plus, dans l'analyse de l'infiltrat lymphocytaire dans les biopsies de colites induites à l'anti-CTLA-4 (article 1<sup>ier</sup>), nous n'observons pas de déplétion en Treg par rapport aux colites à l'anti-PD-1 ni aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). La proportion et le nombre de Treg sont similaires dans les 3 types de colites. Pour des raisons éthiques, je n'ai pas pu démontrer formellement l'absence de déplétion des Treg. En effet, la comparaison des Treg dans les colites à l'anti-CTLA-4 aurait nécessité un groupe contrôle de patients traités par anti-CTLA-4 ne développant pas de colite. Toutefois, l'absence de déplétion en Treg au niveau colique a également été observé dans un autre travail comparant des patients traités par ipilimumab présentant une diarrhée vs un transit conservé (166). Les données tissulaires concernant les Treg peuvent suggérer que la réponse anti-tumorale et les toxicités coliques induites par l'anti-CTLA-4 ne font pas intervenir les mêmes mécanismes. La déplétion des Treg intra-tumoraux décrit dans la littérature fait probablement partie d'un des mécanismes d'efficacité anti-tumorale. L'absence de déplétion en Treg dans le tissu inflammatoire en phase aiguë ainsi qu'en périphérie fait plutôt suspecter une rupture de l'homéostasie lymphocytaire T entre effecteurs et régulateurs. Au total, les modèles précliniques qui déplètent en Treg au niveau périphérique présentent des biais majeurs qui rendent délicat l'interprétation de certaines réponses immunologiques induites par l'anti-CTLA-4. De plus, les modèles précliniques de colites induites chimiquement par le DSS ou par transfert de lymphocytes T

sur des souris immunodéficientes ne permettent pas non plus de comprendre les mécanismes immunologiques impliqués dans l'induction ou l'entretien de l'inflammation colique induite par l'anti-CTLA-4. Contrairement à l'homme, dans ces protocoles chez la souris l'induction de colite n'est pas déclenchée par l'anti-CTLA-4, ce qui représente une limitation importante. Pour toutes ces raisons, nous n'avons pas étudié la potentielle association entre le développement de colite et l'efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA-4 chez la souris. Je me suis donc concentrée sur le suivi des données immunologiques, de la flore intestinale et de ces métabolites dans une cohorte de patients traités par ipilimumab. Ce travail translationnel permet de décrire ces paramètres en fonction des données cliniques, recherchant d'éventuels similitudes ou distinction entre efficacité et toxicité colique de l'ipilimumab.

### **Existe-t-il des paramètres immunologiques ou du microbiote intestinal communs à l'efficacité anti-tumorale et à la colite induite par l'anti-CTLA-4 ?**

En pré-thérapeutique, l'étude des phénotypes lymphocytaires T dans le sang périphérique et de la composition du microbiote fécal, a permis de mettre en évidence des marqueurs immunologiques et des composants de la flore intestinale associés à la fois à la réponse anti-tumorale et à la colite induite par l'ipilimumab. Ainsi, un nombre absolu de LT CD4<sup>+</sup> totaux élevé et une proportion basse de Treg (parmi les LT CD4<sup>+</sup> totaux) sont associés à la fois à la réponse clinique et à la survenue de colite. Les résultats concernant les LT CD4<sup>+</sup> semblent cohérents avec ceux de la littérature (314,315). En d'autres termes, un nombre et une proportion élevée de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels (FoxP3<sup>-</sup>) en pré-thérapeutique est en faveur de ces 2 phénomènes. Comme évoqué précédemment, cela suggère que le blocage du CTLA-4 rompt la balance entre effecteurs et régulateurs en faveur de réponse immunologique pro-inflammatoires. Des travaux semblent montrer qu'un nombre élevé de Treg dans le sang périphérique en pré-thérapeutique ainsi que leur baisse au cours du traitement par ipilimumab, sont de bon pronostic (141,316,317). Dans notre étude, il n'y a pas de différence significative



entre le nombre de Treg en pré-thérapeutique chez les patients répondeurs vs non répondeurs ni chez ceux développant une colite vs le groupe contrôle. Ces données s'expliquent très probablement par la lymphopénie dans les patients des groupes non-répondeurs et ne développant pas de colite.

Nous nous sommes également intéressés à la composition du microbiote intestinal et son influence sur l'efficacité et la tolérance à l'ipilimumab. Notre travail a été réalisé en parallèle d'autres études publiées dans l'intervalle (302,303,318) et ayant la même hypothèse concernant le rôle de la flore intestinale sur l'immunité anti-tumorale et/ou l'inflammation colique induite par les immunothérapies et plus particulièrement l'anti-CTLA-4. Nous avons montré chez l'Homme, qu'une flore intestinale enrichie en *Faecalibacterium* et autres *Firmicutes* (en particulier les OTUs (operational taxonomic unit): *Faecalibacterium prausnitzii* L2.6, *Gemmiger formicilis* ATCC 27749 et *Butyrate producing bacterium* SS2-1), est associée à une meilleure survie globale et sans récurrence et à un risque accru de développer des colites induites par l'ipilimumab. Dans notre travail prospectif, il n'y a pas de modification significative de la composition du microbiote intestinal sous ipilimumab. Cela suggère qu'une certaine composition du microbiote fécal en pré-thérapeutique semble favoriser un statut immunologique qui, lors du blocage du CTLA-4 permet une réponse anti-tumorale et inflammatoire intestinale. Chez la souris, Vétizou et al. montrent qu'une dysbiose est observée chez la souris 48h après l'injection d'anti-CTLA-4, définie par une majoration des *Bacteroidales*, des *Burkholderiales* et des *Clostridiales* (302). Les données murines sont d'interprétation délicate puisque les auteurs ont montré une différence significative de l'abondance des bactéries (*Bacteroidales*, *Burkholderiales* et *Clostridiales*) entre les souris avant traitement et après une injection d'anti-CTLA-4. Cependant les données publiées montrent l'existence d'un effet de l'isotype de l'anticorps anti-CTLA-4 chez ces animaux qui n'est pas discuté par les auteurs. De plus, il semble que les résultats de cette expérience ne comparent pas les souris avant et après anti-CTLA-4 ou son isotype de manière appariée mais

compare les 3 groupes de manière indépendante. Dans la même étude, les auteurs ont réalisé des expériences de transplantation fécale chez des souris *germ-free*. Pour cela ils ont utilisé des selles de patients atteints d'un mélanome métastatique. Ces selles ont été transplantées par gavage aux souris *germ-free* puis après reconstitution de la flore, les auteurs ont implanté une tumeur au souris et les ont traitées pas anti-CTLA-4. Des Q-PCR réalisées sur les selles des souris en fin de traitement indiquaient qu'une flore enrichie en *Bacteroidetes* (*Bacteroides salyersiae*, *Bacteroides acidifaciens* et *Bacteroides uniformis*) était associée à une réponse anti-tumorale à l'anti-CTLA-4 (302). Cette flore transplantée faciliterait la colonisation du tube digestif par des bactéries spécifiques du genre *Bacteroides* (*Bacteroides fragilis* et *Bacteroides thetaiotaomicron*) à l'origine d'une stimulation de la réponse Th1 IL-12-dépendante (302). Ce résultat est très contradictoire avec les données obtenues chez les patients atteints d'un mélanome métastatique et traités par l'ipilimumab où nous avons observé une proportion augmentée de *Bacteroides* est observée dans le groupe non-répondeur avec des survies globales et sans progression plus courtes. Ces résultats discordants s'expliquent probablement avant tout en raison de différents biais : 1/ liés à la transplantation fécale dans les modèles *germ-free* à partir de selles de patients. La reconstitution de la flore intestinale chez la souris n'aboutit pas à une composition ni à des fonctions identiques à celle issue du patient. Certaines bactéries du microbiote humain ne peuvent pas colonisés le tube digestif murin. De plus, la technique de transplantation fécale chez la souris se fait par gavage en intra-gastrique. Comme nous l'avons décrit précédemment, un grand nombre de bactéries ne survivent pas à de pH acides, ce qui induit une modification de la composition de la flore intestinale initiale ; 2/ l'analyse par Q-PCR des prélèvements iléaux chez la souris n'ont pas pris en compte la composition du microbiote dans son ensemble mais certaines espèces bactériennes telles que *Bacteroides fragilis* et *Bacteroides thetaiotaomicron*. En effet, aucune étude de la composition du microbiote ni aucune autre Q-PCR pour caractériser d'autres bactéries n'ont été réalisées dans ces expériences, les auteurs ne peuvent donc pas

exclure que d'autres bactéries soient associées à cette réponse clinique dans ce modèle de transplantation fécale chez la souris. De grandes différences existent entre une expérience en animal gnotoxénique où une espèce bactérienne peut sembler néfaste voire pathogène alors qu'elle ne l'est pas lorsqu'elle fait partie d'une flore plus complexe ou qu'elle colonise un autre hôte. Tous ces arguments peuvent expliquer les différences observées entre les résultats de cette étude et les nôtres en ce qui concernent la composition du microbiote intestinal et son influence sur la réponse à l'anti-CTLA-4. Enfin ces résultats contradictoires soulignent qu'il est très complexe de transposer des données de microbiote issues de la souris à l'homme comme cela fut discuté précédemment pour la colite induite par un anticorps ciblant et bloquant CTLA-4.

L'impact du microbiote intestinal sur le développement de colite induite par l'ipilimumab a également été analysée sur une cohorte de patients américains traités pour un mélanome métastatique (318). Dans ce travail, les auteurs observent qu'une flore riche en micro-organismes du phylum des *Bacteroidetes* (*Bacteroidaceae*, *Rickenellaceae* et *Barnesiellaceae*) est associée à une résistance à la colite induite par ipilimumab. De la même manière, nous observons que les patients avec un microbiote enrichi en bactéries du phylum des *Bacteroidetes* appartiennent au groupe ne développant pas de colite alors que ceux développant une inflammation colique ont une flore enrichie en *Firmicutes*. Ces résultats sont inattendus, puisque nous avons émis l'hypothèse initiale que les patients avec une colite induite à l'ipilimumab présenteraient un microbiote intestinal pro-inflammatoire et donc riche en *Bacteroidetes* comme décrit dans les MICI (287,288). Au contraire, nous observons une flore enrichie en *Firmicutes*, connus pour leurs fonctions anti-inflammatoires et de renforcement de l'imperméabilité intestinale. Ces données restent concordantes avec les données de la cohorte indépendante américaine même si les mécanismes impliqués restent à clarifier. L'étude des paramètres immunologiques n'a pas été réalisée dans le travail de

Dubin, mais une analyse métagénomique a permis de mettre en évidence des niveaux d'expression relative des gènes impliqués dans le transport en polyamines plus importants dans le groupe de patients ne développant pas d'inflammation colique. Les polyamines sont des amines cationiques produites par les bactéries, transportées via la spermidine et la putrescine vers les cellules épithéliales coliques, et jouant un rôle de renforcement de la barrière intestinale (319). Des travaux montrent qu'en phase de colite, le niveau de polyamine est bas comparativement aux contrôles sains (320). L'expression importante des gènes impliqués dans le transport en polyamines chez les patients ne développant pas de colite sous ipilimumab, suggère qu'une perméabilité intestinale renforcée protège contre de l'inflammation. Ils montrent également chez les patients résistants à la colite, une importante expression des gènes impliqués dans la biosynthèse en vitamines B (riboflavine, biotine, panthothénate et thiamine). Les bactéries commensales sont connues pour intervenir dans la synthèse des vitamines, en particulier les vitamines B (321). Chez les patients avec une maladie de Crohn, les taux de vitamines B1 (thiamine) et B2 (riboflavine) sont abaissés (322). *In vitro*, les sous-populations de cellules CD3<sup>+</sup> à TCR semi-invariant associés à la muqueuse (innate mucosal-associated invariant T cells ou MAIT) peuvent être activées par les métabolites de la riboflavine (323). Ces cellules MAIT s'accroissent en nombre dans la muqueuse inflammatoire des patients atteints de maladie de Crohn (324). Cependant, le profil pro- ou anti-inflammatoire de cette population de cellules immunitaires n'est pas identifié. Ces données suggèrent que la surexpression des vitamines B induit une activation des cellules MAIT. Savoir si la muqueuse intestinale des patients résistants à la colite est enrichie ou pas en cellules MAIT activées, ainsi que leurs fonctions reste à définir dans ce contexte. A noter que les cellules MAIT n'existent pas chez la souris, cela apporte une explication supplémentaire aux discordances entre la souris et l'homme pour l'induction d'une colite inflammatoire sous anti-CTLA-4. L'étude de Dubin et al. apporte donc une explication intéressante; dans leur hypothèse les cellules MAIT auraient un rôle protecteur de la colite à ipilimumab dès lors que

CTLA-4 serait inhibé. La plupart des équipes travaillant sur les cellules MAIT semblent les associer plutôt à l'inflammation (325), il reste donc important de caractériser la fonctionnalité de ces cellules dans différent contexte, en particulier lors du blocage de CTLA-4. Cette étude descriptive ouvre des perspectives sur le lien entre métagénomique, le microbiote intestinal et le développement de colite sous anti-CTLA-4. Toutefois, ce travail ne fait pas de lien direct avec le système immunitaire.

L'immunomonitoring sur le sang périphérique réalisé en longitudinal a permis de mettre en évidence l'induction de marqueurs immunologiques d'activation lymphocytaire chez les patients présentant un microbiote enrichi en *Faecalibacterium prausnitzii* et autres *Firmicutes*. En effet, l'induction d'Inducible CoStimulator (ICOS) sur les LT CD4<sup>+</sup> en particulier les LT CD4<sup>+</sup> conventionnels (non Treg), est observée chez les patients appartenant au groupe de patients avec une flore riche en *Firmicutes*. Le CTLA-4 inhibe l'activation lymphocytaire et prévient l'expression d'ICOS (326). Ainsi, le blocage du CTLA-4 rompt la l'homéostasie en faveur d'une activation lymphocytaire effectrice chez ces patients qui ont également une meilleure survie et un risque accru de développer des colites. Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature, qui montrent que l'induction d'ICOS sur les CD4<sup>+</sup> au cours d'un traitement par ipilimumab pourrait être un bio-marqueur d'efficacité anti-cancéreuse (145–147). De la même manière, une flore enrichie en *Faecalibacterium prausnitzii* est associée à une augmentation du CD25 soluble (sCD25) dans le sérum des patients traités par ipilimumab. Le sCD25 est un reflet de l'imprégnation en IL-2 (327) puisqu'il s'agit de la forme soluble de la sous-unité alpha du récepteur à l'IL-2 (IL-2R $\alpha$  ou CD25) nécessaire au 3<sup>ème</sup> signal de l'activation lymphocytaire. L'IL-2 est connu pour induire l'expression d'ICOS à la surface des lymphocytes T, en particulier sur les Treg en raison de l'expression constitutionnelle du CD25 (328,329). Ces données suggèrent que la composition du microbiote fécal peut influencer les réponses immunitaires induites par l'anti-CTLA-4 et avoir un impact à la fois sur l'efficacité thérapeutique et la survenue de colite inflammatoire.

## **Peut-on distinguer des paramètres immunologiques ou du microbiote intestinal, propres à l'efficacité anti-tumorale ou à la colite induite par l'anti-CTLA-4 ?**

Ce travail a également pu mettre en évidence que certains paramètres immunologiques et le butyrate peuvent être associés à la réponse clinique à l'ipilimumab mais pas au développement de la colite induite et inversement. Par exemple, nous avons étudié les marqueurs de domiciliation intestinale  $\alpha 4\beta 7$  dans le sang périphérique dans l'hypothèse que leur expression sur les lymphocytes T soit associée au développement de colite. L' $\alpha 4\beta 7$  est une cible thérapeutique dans la rectocolite hémorragique après échec des corticoïdes, des immunosuppresseurs et des anti-TNF $\alpha$ . En condition normale, l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  permet aux lymphocytes d'être dirigés spécifiquement vers l'intestin et permet de se défendre contre des pathogènes. Dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, le recrutement de ces cellules et leur adhésion aux récepteurs endothéliaux (MAdCAM-1) est anormalement élevée (330). Le blocage de l' $\alpha 4\beta 7$  par un le Vedolizumab (anticorps monoclonal IgG1) permet de limiter l'adhésion des lymphocytes exprimant cette intégrine sur leurs récepteurs (MAdCAM-1) dans le tube digestif et ainsi diminuer l'inflammation. Dans notre travail, la proportion et le nombre absolu de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> exprimant l' $\alpha 4\beta 7$  sont plus bas dans le groupe répondeur par rapport aux non-répondeurs et restent similaires entre les patients développant une colite vs les contrôles. L'étude longitudinale de ces marqueurs de domiciliation digestive ne montre pas de variation significative entre les patients développant une colite comparativement aux patients contrôles (*données non montrées*). Dans le travail sur l'infiltrat lymphocytaire au niveau de la muqueuse digestive, nous n'avons pas réalisé d'analyse de ces paramètres que ce soit l'expression d' $\alpha 4\beta 7$  ou de son récepteur MadCAM-1. Cela ne permet pas d'exclure une potentielle implication dans l'induction ou l'entretien de l'inflammation intestinale induite par l'ipilimumab. Récemment, une étude rétrospective sur 6 patients développant une colite induite par ipilimumab réfractaire aux corticoïdes montre que le traitement de 2<sup>ème</sup> ligne par Vedolizumab est efficace et bien tolérée (331). Ce travail ouvre des perspectives sur les

stratégies thérapeutiques des toxicités inflammatoires coliques induites par les immune-checkpoint inhibiteurs. Les données sur ces populations lymphocytaires ainsi que sur leurs récepteurs au niveau de la muqueuse intestinale sont nécessaires pour soutenir l'utilisation du Vedolizumab et des autres anti-intégrines en préventif ou curatif dans des études cliniques de plus grande ampleur. De manière surprenante, c'est dans la réponse clinique que l'expression d' $\alpha 4\beta 7$  sur les LT paraît intervenir au niveau périphérique. Ces marqueurs de domiciliation intestinale sont induits soit par l'acide rétinoïque associé à une stimulation du TCR (332) soit par l'IL-7 (333). L'IL-7 est une cytokine ayant un rôle majeur dans l'homéostasie des LT et particulièrement dans la reconstitution de la réserve de LT lors d'une lymphopénie (333). Nos résultats montrent une proportion de LT exprimant  $\alpha 4\beta 7$  plus élevée et une lymphopénie chez les patients non-répondeurs vs répondeurs. Notre hypothèse serait que dans un contexte de lymphopénie, l'IL-7 disponible est augmentée et induit l'expression d' $\alpha 4\beta 7$  sur les LT. Cette hypothèse suggère que ces résultats ne soient qu'un reflet indirect de la lymphopénie clairement associée à l'absence de réponse clinique à l'ipilimumab. Afin de conforter cette hypothèse, nous avons d'ailleurs observé une corrélation inverse entre le taux de LT exprimant  $\alpha 4\beta 7$  et le nombre de LT circulants (*donnée non montrée*).

Nous avons également observé des différences sur le statut inflammatoire des patients développant ou pas une colite. Des concentrations sériques basses en cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8 et sCD25) sont observées chez les patients développant une colite induite par l'ipilimumab par rapport au groupe contrôle, alors qu'elles restent similaires entre les répondeurs et les non-répondeurs. Le rôle anti-inflammatoire de *Faecalibacterium prausnitzii* qui est enrichie dans le groupe de patients développant une colite à l'anti-CTLA-4 peut expliquer ce résultat (288). Nous n'observons pas de différence significative sur l'inflammation basale entre répondeurs et non répondeurs bien que la composition de la flore des patients répondeurs soit aussi enrichie en *Faecalibacterium prausnitzii*. Cependant, les données sur un nombre plus important de patients (n=33 versus n=18 patients dans nos

travaux publiés), montre que les patients répondeurs présentent un également un profil anti-inflammatoire au niveau périphérique. Il existe des concentrations sériques en IL-6, IL-8 et sCD25 significativement plus faible dans le groupe répondeur vs non répondeur (*données non montrées*). Au final, il semblerait que les patients répondeurs et développant une colite ont un profil immunologique basal en faveur d'un statut anti-inflammatoire, ce qui reste à valider dans d'autres cohortes indépendantes. Des travaux ont décrit des corrélations entre certains composants de la flore intestinale et les concentrations de cytokines inflammatoires systémiques (334). Dans la maladie de Crohn, la relative abondance de *Faecalibacterium prausnitzii* est réduite lors d'une poussée inflammatoire. L'équipe de Sokol et al, a observé que *Faecalibacterium prausnitzii* exerce une action anti-inflammatoire sur les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) qui sécrètent de l'IL-10 de manière significativement plus importante que l'IL-12, connu pour induire des réponses Th1 (288). Cette induction d'IL-10 peut provenir des cellules dendritiques via le TLR2 (335), et/ou des Treg (336,337). Plusieurs études montrent *in vitro* que la production d'IL-8 par des PBMC est diminuée en présence de *Faecalibacterium prausnitzii* dans le surnageant de culture (288,338). Ces études réalisées sur PBMC aident à prédire l'activation des cellules de l'immunité au niveau digestif uniquement, et n'explique pas forcément le lien entre composition du microbiote et inflammation à la périphérie. Cependant la composition du microbiote avec un enrichissement en bactéries « protectrices » pourrait favoriser le renforcement de la barrière intestinale et donc diminuer le passage des bactéries (translocation) décrit comme responsable de l'augmentation du LPS sérique associée à une inflammation comme cela est suggéré dans de nombreuses études. Ainsi une immunorégulation forte au niveau digestif serait associée à une inflammation plus faible en périphérie. Nos données sont donc cohérentes avec la littérature, et suggèrent que la concentration sérique en protéines inflammatoires est un reflet de la composition du microbiote fécal et prédit la survenue d'une colite après le blocage du CTLA-4. Nous pouvons



supposer que le profil sérique anti-inflammatoire de ces patients est également le reflet de leur profil immunitaire dans les muqueuses digestives. Dans notre travail d'analyse des infiltrats lymphocytaires des biopsies de patients avec une colite induite par l'ipilimumab, et comme discuté précédemment, nous observons un infiltrat prédominant en LT CD4<sup>+</sup>. Comme discuté précédemment, les LT CD4<sup>+</sup> conventionnels exprimant ICOS induisent préférentiellement des réponses Th1 avec une sécrétion d'IFN $\gamma$  alors que les Treg exprimant ICOS induisent des réponses immuno-régulatrices médiées par l'IL-10 (145,165). Ainsi, le blocage du CTLA-4 entrainerait une rupture de la tolérance au niveau digestif en faveur de réponses lymphocytaires effectrices et cytotoxiques par rapport aux réponses suppressives induites en particulier par les Treg. Le mécanisme aboutissant à cette observation nécessite des études plus approfondies, mais ces données restent cohérentes avec les données de la littérature. Dans le travail de Vétizou et al, le blocage sur CTLA-4 induit rapidement (24h) une apoptose des cellules épithéliales intestinales au niveau de l'iléon et du colon dépendantes des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>(302). Il existe également un niveau élevé des transcrits d'IL-17A et d'IFN $\gamma$  en faveur de réponses Th1 et Th17 au niveau intestinal sous anti-CTLA-4 (302). Dans notre étude, nous avons stimulée de manière non spécifique les LT de la muqueuse colique inflammatoire par de la PMA-ionomycine. Une analyse en cytométrie de flux n'a pas mis en évidence de différence significative d'IL17A, d'IFN $\gamma$ , d'IL-10 ni de TNF $\alpha$  exprimés par les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> entre les colites induites à l'anti-CTLA-4 vs l'anti-PD-1 ni avec les MICI (*données non montrées*). Préciser le profil de réponses T nécessite à la fois une comparaison avec un groupe contrôle de patients traités par anti-CTLA-4 ne développant de symptomatologie digestive et une stimulation spécifiquement les LT avec des anticorps anti-CD3 $\epsilon$ . Etonnamment, dans l'étude de Vétizou, le niveau de transcrit de d'IL-6 reste similaire entre le groupe traités par anti-CTLA-4 vs l'isotype contrôle. L'IL-6 est bien connu pour être une cytokine influençant la différenciation lymphocytaire T, en Th17 ou en Treg lorsqu'il est associé au TGF- $\beta$  (339). Au contraire, dans les sécrétomes des biopsies de colite à anti-

CTLA-4, il existe une concentration importante concentration en cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IP-10, le GM-CSF et le TNF $\alpha$  (*données non montrées sauf TNF $\alpha$* ) et une absence d'IL-17A. Ces protéines de l'inflammation aigue peuvent être sécrétées par les LT activés mais aussi par les cellules de l'immunité innée (comme les granulocytes ou les macrophages). Dans les MICI, il existe une augmentation des macrophages intra-muqueux produisant les cytokines pro-inflammatoires citées ci-dessus (340). L'analyse des macrophages restent complexe en raison des nombreux marqueurs de surface nécessaires pour les identifiés. Au vu de nos résultats, il serait intéressant d'étudier les populations de macrophages intra-muqueux dans les colites induites par l'anti-CTLA-4 et valider leur profil sécrétoire. Comme nous l'avons déjà évoqué, les souris wild-type ne développent pas de colite symptomatique ce qui explique les résultats discordants avec ceux du modèle préclinique. Les données observées dans le travail de Vétizou et la, sont donc en faveur d'une modification de l'environnement immunologique digestif (lymphocytaire essentiellement) lors du blocage du CTLA-4 mais il y a une absence de colite avérée rendant difficile l'interprétation de ces résultats quant aux mécanismes immunologiques associés au développement d'une colite suite au blocage de CTLA-4. Notre travail montre que la colite induite par l'anti-CTLA-4 chez l'homme semble liée à un recrutement de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels exprimant des marqueurs d'activation tel qu'ICOS, une absence de déplétion des Treg et une inflammation aigue avec un profil sécrétoire IL-6, TNF $\alpha$ , IP-10. Toutes les données immunologiques précédemment discutées semblent suggérer que les mécanismes immunologiques effecteurs terminaux impliqués dans la survenue d'une colite et la réponse clinique à l'ipilimumab pourraient être en partie différents.

Enfin, le travail sur l'influence du butyrate sur l'efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA-4 se base sur le fait que les patients avec une flore fécale enrichie en *Firmcutes* productrices de butyrate ont une meilleure réponse au traitement. Le butyrate est bien connu pour son activité immunomodulatrice et anti-inflammatoire (341,342). Dans le modèle préclinique, les souris

supplémentées en butyrate (dans l'eau d'hydratation) présentent une inefficacité de l'anti-CTLA-4. Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre dédiée au CTLA-4, ce dernier induit une trans-endocytose des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 des cellules présentatrices d'antigène (CPA) (109), ce qui diminue leur expression à la surface des CPA. Le blocage du CTLA-4 entraîne au contraire une surexpression de ces molécules. *In vitro*, le butyrate inhibe la maturation des cellules dendritiques (277,278,343). Nos résultats montrent *in vivo* que le butyrate inhibe la surexpression des molécules CD80 et CD86 induite par le blocage du CTLA-4. Le mécanisme induisant ce phénomène sur les cellules dendritiques pourrait être lié à une action d'inhibition d'histone deacetylase inhibitors (HDAC) du butyrate (343). Dans ce travail, le butyrate inhibe l'induction/amplification de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> Th1 spécifiques d'un antigène (l'ovalbumine). Plusieurs études ont observé que le sodium butyrate entraîne une anergie T(285,286) ou réduisent la capacité d'activation de LT (280). Ainsi en inhibant l'induction *in vivo* de CD80 et CD86 par l'anti-CTLA-4, le butyrate ne favorise pas le rétablissement de l'axe B7/CD28 pour permettre l'expansion de LT spécifiques mémoires anti-tumoraux. Ces résultats rappellent une étude chez la souris montrant qu'une flore riche en *Bifidobacterium* améliore l'efficacité de l'anti-PD-L1 (303). Une augmentation des réponses LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène tumoral est observée dans les tumeurs de souris enrichies en *Bifidobacterium*. Cette réponse T spécifique est liée à une maturation des cellules dendritiques (303). Ces résultats comme les nôtres, montrent un lien entre la maturation des cellules dendritiques, la composition du microbiote intestinal et l'efficacité de l'immunothérapie. Toutefois, l'action directe du *Bifidobacterium* ou indirecte via des métabolites sur les cellules dendritiques n'est pas démontrée dans ce travail. Chez l'Homme, nous observons que les patients présentant une concentration sérique en butyrate faible ont une meilleure survie par rapport à ceux avec de fort taux de butyrate systémique. Ces données sont en accord avec nos résultats précliniques. Cependant, aucun lien n'existe entre le taux de butyrate ou des autres métabolites dosés (acétate, propionate et valérate) et la survenue d'une

colite induite l'ipilimumab. De la même manière, aucune différence n'est observée concernant le profil inflammatoire basal (IL-6, IL-8, IP10, TNF $\alpha$ ) des patients avec des concentrations sériques en butyrate élevée *versus* basses (*données non montrées*). Les données d'immunomonitoring dans le sang périphérique de cette cohorte montrent une expansion significative des LT CD4<sup>+</sup> mémoires dans le groupe avec de faible taux de butyrate sérique. De la même manière, les patients avec des concentrations sériques en butyrate élevées n'ont pas d'induction de sCD25 suggérant une faible restauration de l'axe B7/CD28 après blocage du CTLA-4 (344). Lors des dosages d'acides gras à chaînes courtes (AGCC) dans le sérum des patients de notre cohorte, nous supposons que ceux avec un microbiote enrichi en *Firmicutes* auraient des concentrations en butyrate élevées. Contre toute attente, grâce à une étude en Q-PCR sur les selles avant traitement de nos patients, nous avons observé que les patients présentant une concentration sérique basse en butyrate ont une flore riche en *Faecalibacterium prausnitzii*. Les taux de butyrate dans les selles et en systémique dépendent de nombreux facteurs tels que l'alimentation, le temps de transit, la composition du microbiote, le métabolisme bactérien mais également la consommation du butyrate par les composants de la flore et les colonocytes. Le microbiote intestinal joue un rôle dans l'expression d'enzymes impliqués dans le métabolisme du butyrate. Les bactéries productrices de butyrate augmentent le niveau de l'acyl CoA déshydrogénase impliquée dans la  $\beta$ -oxydation (345), et du 3-hydroxy 3-méthyl glutaryl CoA (mHMGCoA) synthase impliqué dans la synthèse des corps cétoniques (346). En l'absence de bactéries productrices de butyrate, il existe une faible expression de ces enzymes. Au total, nous pouvons supposer que les *Firmicutes* et autres bactéries productrices de butyrate (comme *Faecalibacterium prausnitzii*) vont favoriser le métabolisme intestinal du butyrate, limitant son passage systémique. Dans ce contexte, l'étude enzymatique du métabolisme du butyrate en fonction de la composition du microbiote reste à approfondir pour valider nos hypothèses. Jouer sur le métabolisme des métabolites au niveau colique peut être une perspective thérapeutique pour augmenter

l'efficacité des immunothérapies. Ainsi, ce travail permet d'ouvrir des perspectives sur le lien manquant entre microbiote intestinal et réponse immunitaire anti-tumoral à distance (Figure 17). En revanche, un travail plus approfondi sur les métabolites de la flore et la survenue de colite sous ipilimumab reste à débiter. Nous pourrions imaginer d'analyser plus précisément la flore commensale associée aux muqueuses ainsi qu'une étude métabolomique au niveau du tissu digestif pour rechercher une éventuelle implication locale de ces métabolites sur le développement de colite. Cet axe d'étude reste difficile à mettre en œuvre pour des raisons éthiques chez l'Homme et par l'absence de modèle préclinique adapté d'un point de vue immunologique. Les études sur des cultures 3D ou sur organoïdes restent une alternative à prendre en considération.

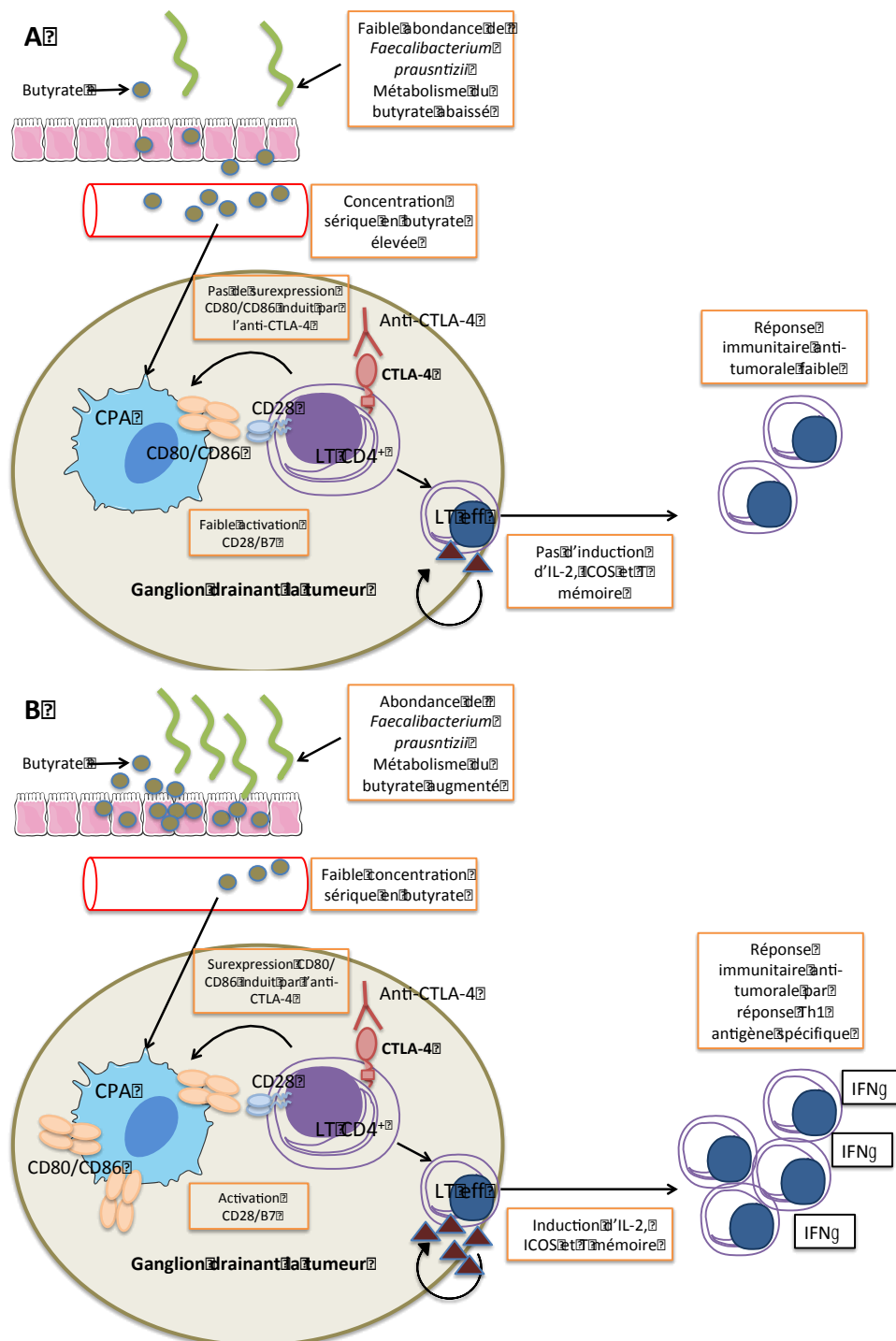
## CONCLUSION GENERALE

A travers ces travaux, nous validons chez l'Homme l'existence d'un lien entre la composition du microbiote intestinal et l'efficacité anti-tumorale de l'ipilimumab ainsi que le développement de la colite induite. La présence d'une flore fécale enrichie en bactéries du phylum des *Firmicutes* est associée à un statut immunologique périphérique spécifique en pré-thérapeutique et dont l'activation lymphocytaire par l'anti-CTLA-4 semble plus efficace. D'un point de vue immunologique, il semble exister quelques différences sont observées entre les patients répondeurs et ceux développant la colite. Ces données suggèrent des mécanismes d'induction et/ou d'entretien distincts impliqués dans l'efficacité ou la toxicité colique à l'ipilimumab.

L'étude du butyrate, principal métabolite produit par les *Firmicutes*, a permis d'établir le lien entre la composition du microbiote intestinale et la réponse anti-tumorale de l'anti-CTLA-4 qui se fait à distance du tube digestif. L'effet anti-inflammatoire du butyrate *via* l'inhibition de la maturation des cellules dendritiques entraîne un défaut de l'activation lymphocytaire dépendante de l'axe CD28/B7 nécessaire à l'efficacité de l'anti-CTLA-4.

Ce travail ouvre des perspectives sur les mécanismes expliquant l'influence du microbiote sur les réponses aux inhibiteurs d'immune-checkpoint. A l'ère des combinaisons thérapeutiques, beaucoup de scientifiques étudient la modulation de la composition de la flore intestinale par des probiotiques, des antibiotiques, voire la transplantation fécale pour renforcer l'efficacité thérapeutique. Il est maintenant nécessaire d'étudier d'autres métabolites de la flore pouvant avoir des activités immunomodulatrices et ainsi modifier l'action des immunothérapies. Enfin les derniers résultats d'essais thérapeutiques montrent une synergie forte entre anti-CTLA-4 et anti-PD1/PD-L1 chez les patients atteints d'un mélanome métastatique. Des études récentes chez la souris montrent que l'engagement de CD28 reste crucial pour reverser l'épuisement lymphocytaire sous anti-PD-1 (347,348). Ainsi ce travail montrant le lien entre butyrate sérique et restauration de l'axe CD28/B7 pourrait aussi avoir un intérêt dans la prédiction de

l'efficacité de la combinaison thérapeutique anti-CTLA-4/anti-PD-1 chez les patients. Renforcer l'axe CD28/molécules B7 chez les patients ne semblant pas répondre précocement à l'anti-CTLA-4, permettrait d'améliorer le taux de réponse thérapeutique.



**Figure 18: Butyrate et efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA-4**

**A.** Une faible abondance en *Faecalibacterium prausnitzii* entraîne une faible production de butyrate. Le métabolisme du butyrate est diminué, augmentant le passage systémique. Le butyrate au niveau des ganglions drainants la tumeur et sous l'influence de l'anti-CTLA-4, ne permet pas de surexpression du CD80 et CD86. L'activation lymphocytaire reste faible avec pour conséquences l'absence d'induction de l'IL-2, d'ICOS et de LT CD4<sup>+</sup> mémoires.

**B.** Une grande abondance en *Faecalibacterium prausnitzii* entraîne une forte production de butyrate. Le métabolisme du butyrate est augmenté, diminuant le passage systémique. En l'absence de butyrate au niveau des ganglions drainants la tumeur, l'anti-CTLA-4 entraîne la surexpression du CD80 et CD86. L'activation lymphocytaire est majeure avec l'induction de l'IL-2, d'ICOS et de LT CD4<sup>+</sup> mémoires.



## BIBLIOGRAPHIE

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57–70.
3. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*. 1970;13:1–27.
4. Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med*. 1982 Aug;55(3–4):329–33.
5. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*. 1994 Sep;1(6):447–56.
6. 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.
7. Engel AM, Svane IM, Mouritsen S, Rygaard J, Clausen J, Werdelin O. Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 1996 Sep;104(9):629–39.
8. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001 Apr 26;410(6832):1107–11.
9. van den Broek ME, Kägi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med*. 1996 Nov 1;184(5):1781–90.
10. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*. 2001 Apr;2(4):293–9.
11. Marrogi AJ, Munshi A, Merogi AJ, Ohadike Y, El-Habashi A, Marrogi OL, et al. Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-beta as prognostic factors in breast carcinoma. *Int J Cancer*. 1997 Oct 21;74(5):492–501.
12. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998 Aug 15;58(16):3491–4.
13. Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, Aizawa M, et al. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res*. 2001 Jul 1;61(13):5132–6.
14. Schumacher K, Haensch W, Röefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res*. 2001 May 15;61(10):3932–6.
15. Goedert JJ, Côté TR, Virgo P, Scoppa SM, Kingma DW, Gail MH, et al. Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. *Lancet Lond Engl*. 1998 Jun 20;351(9119):1833–9.
16. Tenderich G, Deyerling W, Schulz U, Heller R, Hornik L, Schulze B, et al. Malignant neoplastic disorders following long-term immunosuppression after orthotopic heart transplantation. *Transplant Proc*. 2001 Dec;33(7–8):3653–5.
17. Sanchez EQ, Marubashi S, Jung G, Levy MF, Goldstein RM, Molmenti EP, et al. De novo tumors after liver transplantation: a single-institution experience. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2002 Mar;8(3):285–91.
18. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002 Apr;13(2):95–109.

19. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235–71.
20. Willimsky G, Blankenstein T. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature*. 2005 Sep 1;437(7055):141–6.
21. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991 Dec 13;254(5038):1643–7.
22. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol*. 2001 Feb;13(1):114–9.
23. Sharpe AH, Abbas AK. T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges. *N Engl J Med*. 2006 Sep 7;355(10):973–5.
24. Garrido F, Perea F, Bernal M, Sánchez-Palencia A, Aptsiauri N, Ruiz-Cabello F. The Escape of Cancer from T Cell-Mediated Immune Surveillance: HLA Class I Loss and Tumor Tissue Architecture. *Vaccines*. 2017 Feb 27;5(1).
25. Chen Q, Daniel V, Maher DW, Hersey P. Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int J Cancer*. 1994 Mar 1;56(5):755–60.
26. 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.
27. Cannon MJ, Goyne H, Stone PJB, Chiriva-Internati M. Dendritic cell vaccination against ovarian cancer--tipping the Treg/TH17 balance to therapeutic advantage? *Expert Opin Biol Ther*. 2011 Apr;11(4):441–5.
28. Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*. 2013 Oct;14(10):1014–22.
29. Blankenstein T, Coulie PG, Gilboa E, Jaffee EM. The determinants of tumour immunogenicity. *Nat Rev Cancer*. 2012 01;12(4):307–13.
30. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1960–4.
31. Fridman W-H, Dieu-Nosjean M-C, Pagès F, Cremer I, Damotte D, Sautès-Fridman C, et al. The immune microenvironment of human tumors: general significance and clinical impact. *Cancer Microenviron Off J Int Cancer Microenviron Soc*. 2013 Aug;6(2):117–22.
32. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 20;102(51):18538–43.
33. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, et al. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Sci Transl Med*. 2013 Aug 28;5(200):200ra116.
34. Ibrahim EM, Al-Foheidi ME, Al-Mansour MM, Kazkaz GA. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Dec;148(3):467–76.
35. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011 Dec 22;480(7378):480–9.
36. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1999 Jul;17(7):2105–16.
37. Rosenberg SA, Yang JC, White DE, Steinberg SM. Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg*. 1998 Sep;228(3):307–19.
38. Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, et al. Integration

- of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*. 2003 Jul 31;424(6948):516–23.
39. Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Nitti D. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2010 Apr 7;102(7):493–501.
  40. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2002 Jan 1;20(1):289–96.
  41. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med*. 1987 Apr 9;316(15):889–97.
  42. Arienti F, Belli F, Rivoltini L, Gambacorti-Passerini C, Furlan L, Mascheroni L, et al. Adoptive immunotherapy of advanced melanoma patients with interleukin-2 (IL-2) and tumor-infiltrating lymphocytes selected in vitro with low doses of IL-2. *Cancer Immunol Immunother CII*. 1993 May;36(5):315–22.
  43. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011 Jul 1;17(13):4550–7.
  44. Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 Jun;13(6):370–83.
  45. 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.
  46. Weiner GJ. Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2015 Jun;15(6):361–70.
  47. Kantarjian H, Stein A, Gökbüget N, Fielding AK, Schuh AC, Ribera J-M, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2017 02;376(9):836–47.
  48. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 22;12(4):252–64.
  49. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Aug 19;363(8):711–23.
  50. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, M D JW, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2011 Jun 30;364(26):2517–26.
  51. Nalvai AT, Nilsson S, Samuelsson L, Gudjónsdóttir AH, Ascher H, Ek J, et al. The CTLA4/CD28 gene region on chromosome 2q33 confers susceptibility to celiac disease in a way possibly distinct from that of type 1 diabetes and other chronic inflammatory disorders. *Tissue Antigens*. 2000 Oct;56(4):350–5.
  52. Balzano C, Buonavista N, Rouvier E, Golstein P. CTLA-4 and CD28: similar proteins, neighbouring genes. *Int J Cancer Suppl J Int Cancer Suppl*. 1992;7:28–32.
  53. van der Merwe PA, Bodian DL, Daenke S, Linsley P, Davis SJ. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med*. 1997 Feb 3;185(3):393–403.
  54. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 1995 Nov;3(5):541–7.
  55. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4. *Science*. 1995

Nov 10;270(5238):985–8.

56. Tivol EA, Boyd SD, McKeon S, Borriello F, Nickerson P, Strom TB, et al. CTLA4Ig prevents lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction in CTLA-4-deficient mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1997 Jun 1;158(11):5091–4.
57. Fagnoni FF, Vescovini R, Mazzola M, Bologna G, Nigro E, Lavagetto G, et al. Expansion of cytotoxic CD8+ CD28- T cells in healthy ageing people, including centenarians. *Immunology*. 1996 Aug;88(4):501–7.
58. Vallejo AN, Nestel AR, Schirmer M, Weyand CM, Goronzy JJ. Aging-related deficiency of CD28 expression in CD4+ T cells is associated with the loss of gene-specific nuclear factor binding activity. *J Biol Chem*. 1998 Apr 3;273(14):8119–29.
59. Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, et al. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med*. 1992 Dec 1;176(6):1595–604.
60. Metzler B, Burkhart C, Wraith DC. Phenotypic analysis of CTLA-4 and CD28 expression during transient peptide-induced T cell activation in vivo. *Int Immunol*. 1999 May;11(5):667–75.
61. Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2000 Jul 17;192(2):295–302.
62. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000 Jul 17;192(2):303–10.
63. Leung HT, Bradshaw J, Cleaveland JS, Linsley PS. Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4, a high-avidity receptor for CD80 and CD86, contains an intracellular localization motif in its cytoplasmic tail. *J Biol Chem*. 1995 Oct 20;270(42):25107–14.
64. Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, Mittler RS. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity*. 1996 Jun;4(6):535–43.
65. Iida T, Ohno H, Nakaseko C, Sakuma M, Takeda-Ezaki M, Arase H, et al. Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 Nov 1;165(9):5062–8.
66. Schneider H, Martin M, Agarraberes FA, Yin L, Rapoport I, Kirchhausen T, et al. Cytolytic T lymphocyte-associated antigen-4 and the TCR zeta/CD3 complex, but not CD28, interact with clathrin adaptor complexes AP-1 and AP-2. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Aug 15;163(4):1868–79.
67. Valk E, Leung R, Kang H, Kaneko K, Rudd CE, Schneider H. T cell receptor-interacting molecule acts as a chaperone to modulate surface expression of the CTLA-4 coreceptor. *Immunity*. 2006 Nov;25(5):807–21.
68. Béraud-Dufour S, Balch W. A journey through the exocytic pathway. *J Cell Sci*. 2002 May 1;115(Pt 9):1779–80.
69. Mead KI, Zheng Y, Manzotti CN, Perry LCA, Liu MKP, Burke F, et al. Exocytosis of CTLA-4 is dependent on phospholipase D and ADP ribosylation factor-1 and stimulated during activation of regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 Apr 15;174(8):4803–11.
70. Bonifacino JS, Dell'Angelica EC. Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol*. 1999 May 31;145(5):923–6.
71. Shiratori T, Miyatake S, Ohno H, Nakaseko C, Isono K, Bonifacino JS, et al. Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity*. 1997 May;6(5):583–9.
72. Zhang Y, Allison JP. Interaction of CTLA-4 with AP50, a clathrin-coated pit adaptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Aug 19;94(17):9273–8.

73. Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJC, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B, et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity*. 2002 Aug;17(2):201–10.
74. Peach RJ, Bajorath J, Brady W, Leytze G, Greene J, Naemura J, et al. Complementarity determining region 1 (CDR1)- and CDR3-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1. *J Exp Med*. 1994 Dec 1;180(6):2049–58.
75. Morton PA, Fu XT, Stewart JA, Giacoletto KS, White SL, Leysath CE, et al. Differential effects of CTLA-4 substitutions on the binding of human CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2). *J Immunol Baltim Md 1950*. 1996 Feb 1;156(3):1047–54.
76. Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev*. 2009 May;229(1):12–26.
77. Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K, Allison JP. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity*. 2004 Sep;21(3):401–13.
78. Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogawa K, Zeng H, Hashimoto-Tane A, et al. Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity*. 2010 Sep 24;33(3):326–39.
79. Schneider H, Smith X, Liu H, Bismuth G, Rudd CE. CTLA-4 disrupts ZAP70 microcluster formation with reduced T cell/APC dwell times and calcium mobilization. *Eur J Immunol*. 2008 Jan;38(1):40–7.
80. Martin M, Schneider H, Azouz A, Rudd CE. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function. *J Exp Med*. 2001 Dec 3;194(11):1675–81.
81. Chikuma S, Imboden JB, Bluestone JA. Negative regulation of T cell receptor-lipid raft interaction by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2003 Jan 6;197(1):129–35.
82. Schneider H, Valk E, Leung R, Rudd CE. CTLA-4 activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) and protein kinase B (PKB/AKT) sustains T-cell anergy without cell death. *PloS One*. 2008;3(12):e3842.
83. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*. 1996 Nov 15;87(4):619–28.
84. Schneider H, Mandelbrot DA, Greenwald RJ, Ng F, Lechler R, Sharpe AH, et al. Cutting Edge: CTLA-4 (CD152) Differentially Regulates Mitogen-Activated Protein Kinases (Extracellular Signal-Regulated Kinase and c-Jun N-Terminal Kinase) in CD4<sup>+</sup> T Cells from Receptor/Ligand-Deficient Mice. *J Immunol*. 2002 Oct 1;169(7):3475–9.
85. Araki M, Chung D, Liu S, Rainbow DB, Chamberlain G, Garner V, et al. Genetic evidence that the differential expression of the ligand-independent isoform of CTLA-4 is the molecular basis of the Idd5.1 type 1 diabetes region in nonobese diabetic mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Oct 15;183(8):5146–57.
86. Vijaykrishnan L, Slavik JM, Illés Z, Greenwald RJ, Rainbow D, Greve B, et al. An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells. *Immunity*. 2004 May;20(5):563–75.
87. Schneider H, Valk E, da Rocha Dias S, Wei B, Rudd CE. CTLA-4 up-regulation of lymphocyte function-associated antigen 1 adhesion and clustering as an alternate basis for coreceptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 6;102(36):12861–6.
88. Schneider H, Downey J, Smith A, Zinselmeyer BH, Rush C, Brewer JM, et al. Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1972–5.
89. Downey J, Smith A, Schneider H, Hogg N, Rudd CE. TCR/CD3 mediated stop-signal is decoupled in T-cells from Ctla4 deficient mice. *Immunol Lett*. 2008 Jan 15;115(1):70–2.
90. Bachmann MF, Köhler G, Ecabert B, Mak TW, Kopf M. Cutting Edge: Lymphoproliferative Disease in the Absence of CTLA-4 Is Not T Cell Autonomous. *J Immunol*. 1999 Aug 1;163(3):1128–31.

91. Homann D, Dummer W, Wolfe T, Rodrigo E, Theofilopoulos AN, Oldstone MBA, et al. Lack of intrinsic CTLA-4 expression has minimal effect on regulation of antiviral T-cell immunity. *J Virol*. 2006 Jan;80(1):270–80.
92. Friedline RH, Brown DS, Nguyen H, Kornfeld H, Lee J, Zhang Y, et al. CD4+ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *J Exp Med*. 2009 Feb 16;206(2):421–34.
93. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 2000 Apr;12(4):431–40.
94. Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ, Bour-Jordan H, Bi M, Bluestone JA. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol*. 2004 Nov;34(11):2996–3005.
95. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*. 2001 Jun 4;193(11):1285–94.
96. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998 Jul 20;188(2):287–96.
97. Read S, Greenwald R, Izcue A, Robinson N, Mandelbrot D, Francisco L, et al. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Oct 1;177(7):4376–83.
98. Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, Allison JP. 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*. 2009 Aug 3;206(8):1717–25.
99. Schmidt EM, Wang CJ, Ryan GA, Clough LE, Qureshi OS, Goodall M, et al. Ctla-4 controls regulatory T cell peripheral homeostasis and is required for suppression of pancreatic islet autoimmunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Jan 1;182(1):274–82.
100. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 2008 Oct 10;322(5899):271–5.
101. Crellin NK, Garcia RV, Levings MK. Altered activation of AKT is required for the suppressive function of human CD4+CD25+ T regulatory cells. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):2014–22.
102. Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 22;105(29):10113–8.
103. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*. 2006 Jun;118(2):240–9.
104. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*. 1999 May 3;189(9):1363–72.
105. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):1097–101.
106. Mellor AL, Chandler P, Baban B, Hansen AM, Marshall B, Pihkala J, et al. Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Int Immunol*. 2004 Oct;16(10):1391–401.
107. Manches O, Munn D, Fallahi A, Lifson J, Chaperot L, Plumas J, et al. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J Clin Invest*. 2008 Oct;118(10):3431–9.
108. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge:

- human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Apr 15;172(8):4676–80.
109. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*. 2011 Apr 29;332(6029):600–3.
110. Magistrelli G, Jeannin P, Herbault N, Benoit De Coignac A, Gauchat JF, Bonnefoy JY, et al. A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *Eur J Immunol*. 1999 Nov;29(11):3596–602.
111. Oaks MK, Hallett KM. Cutting edge: a soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 May 15;164(10):5015–8.
112. Toussirot E, Saas P, Deschamps M, Pouthier F, Perrot L, Perruche S, et al. Increased production of soluble CTLA-4 in patients with spondylarthropathies correlates with disease activity. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(4):R101.
113. Ueda H, Howson JMM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003 May 29;423(6939):506–11.
114. Krummel MF, Allison JP. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med*. 1996 Jun 1;183(6):2533–40.
115. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*. 1996 Mar 22;271(5256):1734–6.
116. Mokyr MB, Kalinichenko T, Gorelik L, Bluestone JA. Realization of the therapeutic potential of CTLA-4 blockade in low-dose chemotherapy-treated tumor-bearing mice. *Cancer Res*. 1998 Dec 1;58(23):5301–4.
117. van Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med*. 1999 Aug 2;190(3):355–66.
118. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S-J, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Dec 20;27(36):6199–206.
119. Eggermont AMM, Chiarion-Sileni V, Grob J-J, Dummer R, Wolchok JD, Schmidt H, et al. Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015 May;16(5):522–30.
120. Eggermont AMM, Chiarion-Sileni V, Grob J-J, Dummer R, Wolchok JD, Schmidt H, et al. Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy. *N Engl J Med*. 2016 10;375(19):1845–55.
121. Ribas A, Kefford R, Marshall MA, Punt CJA, Haanen JB, Marmol M, et al. Phase III randomized clinical trial comparing tremelimumab with standard-of-care chemotherapy in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Feb 10;31(5):616–22.
122. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*. 2015 Jan 22;372(4):320–30.
123. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2015 Jun 25;372(26):2521–32.
124. Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, Baron A, Necchi A, Bedke J, et al. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Mar;18(3):312–22.
125. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee J-L, Fong L, et al. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*. 2017

16;376(11):1015–26.

126. Ferris RL, Blumenschein GJ, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2016 Oct 8;0(0):null.

127. Seiwert TY, Burtness B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder JP, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol*. 2016 Jul;17(7):956–65.

128. 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.

129. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2015 Nov 5;373(19):1803–13.

130. 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.

131. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016 10;375(19):1823–33.

132. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015 Jun 25;372(26):2509–20.

133. 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.

134. Hodi FS, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann KF, McDermott DF, et al. Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016 Nov;17(11):1558–68.

135. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2013 Jul 11;369(2):122–33.

136. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Aug 19;363(8):711–23.

137. Maio M, Grob J-J, Aamdal S, Bondarenko I, Robert C, Thomas L, et al. Five-year survival rates for treatment-naïve patients with advanced melanoma who received ipilimumab plus dacarbazine in a phase III trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015 Apr 1;33(10):1191–6.

138. Callahan MK, Wolchok JD, Allison JP. Anti-CTLA-4 antibody therapy: immune monitoring during clinical development of a novel immunotherapy. *Semin Oncol*. 2010 Oct;37(5):473–84.

139. Ku GY, Yuan J, Page DB, Schroeder SEA, Panageas KS, Carvajal RD, et al. Single-institution experience with ipilimumab in advanced melanoma patients in the compassionate use setting: lymphocyte count after 2 doses correlates with survival. *Cancer*. 2010 Apr 1;116(7):1767–75.

140. Ferrucci PF, Gandini S, Battaglia A, Alfieri S, Di Giacomo AM, Giannarelli D, et al. Baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with outcome of ipilimumab-treated metastatic melanoma patients. *Br J Cancer*. 2015 Jun 9;112(12):1904–10.

141. Simeone E, Gentilcore G, Giannarelli D, Grimaldi AM, Caracò C, Curvietto M, et al. Immunological and biological changes during ipilimumab treatment and their potential



- correlation with clinical response and survival in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunol Immunother* CII. 2014 Apr 3;
142. Lesokhin AM, Hohl TM, Kitano S, Cortez C, Hirschhorn-Cymerman D, Avogadri F, et al. Monocytic CCR2(+) myeloid-derived suppressor cells promote immune escape by limiting activated CD8 T-cell infiltration into the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2012 Feb 15;72(4):876–86.
143. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009 Mar;9(3):162–74.
144. Huang B, Pan P-Y, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res*. 2006 Jan 15;66(2):1123–31.
145. Fu T, He Q, Sharma P. The ICOS/ICOSL pathway is required for optimal antitumor responses mediated by anti-CTLA-4 therapy. *Cancer Res*. 2011 Aug 15;71(16):5445–54.
146. Liakou CI, Kamat A, Tang DN, Chen H, Sun J, Troncso P, et al. CTLA-4 blockade increases IFN $\gamma$ -producing CD4+ICOS $^+$  cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 30;105(39):14987–92.
147. Chen H, Liakou CI, Kamat A, Pettaway C, Ward JF, Tang DN, et al. Anti-CTLA-4 therapy results in higher CD4+ICOS $^+$  T cell frequency and IFN- $\gamma$  levels in both nonmalignant and malignant prostate tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 24;106(8):2729–34.
148. Yuan J, Adamow M, Ginsberg BA, Rasalan TS, Ritter E, Gallardo HF, et al. Integrated NY-ESO-1 antibody and CD8 $^+$  T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 4;108(40):16723–8.
149. Hegel JK, Knieke K, Kolar P, Reiner SL, Brunner-Weinzierl MC. CD152 (CTLA-4) regulates effector functions of CD8 $^+$  T lymphocytes by repressing Eomesodermin. *Eur J Immunol*. 2009 Mar;39(3):883–93.
150. Wang W, Yu D, Sarnaik AA, Yu B, Hall M, Morelli D, et al. Biomarkers on melanoma patient T cells associated with ipilimumab treatment. *J Transl Med*. 2012;10:146.
151. Kavanagh B, O'Brien S, Lee D, Hou Y, Weinberg V, Rini B, et al. CTLA4 blockade expands FoxP3 $^+$  regulatory and activated effector CD4 $^+$  T cells in a dose-dependent fashion. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1175–83.
152. Nancey S, Boschetti G, Cotte E, Ruel K, Almeras T, Chauvenet M, et al. Blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 by ipilimumab is associated with a profound long-lasting depletion of Foxp3 $^+$  regulatory T cells: a mechanistic explanation for ipilimumab-induced severe enterocolitis? *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Aug;18(8):E1598-1600.
153. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*. 2014 Dec 4;371(23):2189–99.
154. van Rooij N, van Buuren MM, Philips D, Velds A, Toebes M, Heemskerk B, et al. Tumor Exome Analysis Reveals Neoantigen-Specific T-Cell Reactivity in an Ipilimumab-Responsive Melanoma. *J Clin Oncol*. 2013 Nov 10;31(32):e439–42.
155. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science*. 2015 Oct 9;350(6257):207–11.
156. Weber JS, Kähler KC, Hauschild A. Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012 Jul 20;30(21):2691–7.
157. Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, Haluska FG, Butler M, Seiden MV, et al. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 15;100(8):4712–7.

158. Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8372–7.
159. Bouwhuis MG, Ten Hagen TLM, Suciú S, Eggermont AM. Autoimmunity and treatment outcome in melanoma. *Curr Opin Oncol*. 2011 Mar;23(2):170–6.
160. Attia P, Phan GQ, Maker AV, Robinson MR, Quezado MM, Yang JC, et al. Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005 Sep 1;23(25):6043–53.
161. Boutros C, Tarhini A, Routier E, Lambotte O, Ladurie FL, Carbonnel F, et al. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 Aug;13(8):473–86.
162. Beck KE, Blansfield JA, Tran KQ, Feldman AL, Hughes MS, Royal RE, et al. Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 May 20;24(15):2283–9.
163. Marthey L, Mateus C, Mussini C, Nachury M, Nancey S, Grange F, et al. Cancer Immunotherapy with Anti-CTLA-4 Monoclonal Antibodies Induces an Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*. 2016 Apr;10(4):395–401.
164. Barnes MJ, Griseri T, Johnson AMF, Young W, Powrie F, Izcue A. CTLA-4 promotes Foxp3 induction and regulatory T cell accumulation in the intestinal lamina propria. *Mucosal Immunol*. 2013 Mar;6(2):324–34.
165. Coquerelle C, Oldenhove G, Acolty V, Denoëud J, Vansanten G, Verdebout J-M, et al. Anti-CTLA-4 treatment induces IL-10-producing ICOS<sup>+</sup> regulatory T cells displaying IDO-dependent anti-inflammatory properties in a mouse model of colitis. *Gut*. 2009 Oct;58(10):1363–73.
166. Lord JD, Hackman RC, Moglebust A, Thompson JA, Higano CS, Chielens D, et al. Refractory colitis following anti-CTLA4 antibody therapy: analysis of mucosal FOXP3<sup>+</sup> T cells. *Dig Dis Sci*. 2010 May;55(5):1396–405.
167. Schubert D, Bode C, Kenefeck R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A, et al. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med*. 2014 Dec;20(12):1410–6.
168. Zeissig S, Petersen B-S, Tomczak M, Melum E, Huc-Claustre E, Dougan SK, et al. Early-onset Crohn's disease and autoimmunity associated with a variant in CTLA-4. *Gut*. 2015 Dec;64(12):1889–97.
169. Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, Deenick EK, Niemela JE, Avery DT, et al. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science*. 2014 Sep 26;345(6204):1623–7.
170. Shahabi V, Berman D, Chasalow SD, Wang L, Tsuchihashi Z, Hu B, et al. Gene expression profiling of whole blood in ipilimumab-treated patients for identification of potential biomarkers of immune-related gastrointestinal adverse events. *J Transl Med*. 2013 Mar 22;11(1):75.
171. Berman D, Parker SM, Siegel J, Chasalow SD, Weber J, Galbraith S, et al. Blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 by ipilimumab results in dysregulation of gastrointestinal immunity in patients with advanced melanoma. *Cancer Immun*. 2010;10:11.
172. Quinton JF, Sendid B, Reumaux D, Duthilleul P, Cortot A, Grandbastien B, et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut*. 1998 Jun;42(6):788–91.
173. Pei Z, Bini EJ, Yang L, Zhou M, Francois F, Blaser MJ. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 23;101(12):4250–5.
174. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, et al. Molecular

- analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 17;103(3):732–7.
175. Hayashi H, Takahashi R, Nishi T, Sakamoto M, Benno Y. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol*. 2005 Nov;54(Pt 11):1093–101.
176. Marteau P, Pochart P, Doré J, Béra-Maillet C, Bernalier A, Corthier G. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Oct;67(10):4939–42.
177. Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans ADL, de Vos WM. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Jul;68(7):3401–7.
178. Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, Lobley GE. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Feb;73(4):1073–8.
179. Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, Turnbaugh PJ, Fulton RS, Wollam A, et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 7;106(14):5859–64.
180. Zocco MA, Ainora ME, Gasbarrini G, Gasbarrini A. *Bacteroides thetaiotaomicron* in the gut: molecular aspects of their interaction. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver*. 2007 Aug;39(8):707–12.
181. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*. 2014 May 21;6(237):237ra65.
182. DiGiulio DB, Romero R, Kusanovic JP, Gómez R, Kim CJ, Seok KS, et al. Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol N Y N 1989*. 2010 Jul 1;64(1):38–57.
183. Moles L, Gómez M, Heilig H, Bustos G, Fuentes S, de Vos W, et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PloS One*. 2013;8(6):e66986.
184. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe*. 2015 Jun 10;17(6):852.
185. Cheng J, Ringel-Kulka T, Heikamp-de Jong I, Ringel Y, Carroll I, de Vos WM, et al. Discordant temporal development of bacterial phyla and the emergence of core in the fecal microbiota of young children. *ISME J*. 2016 Apr;10(4):1002–14.
186. Hollister EB, Riehle K, Luna RA, Weidler EM, Rubio-Gonzales M, Mistretta T-A, et al. Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome*. 2015 Aug 26;3:36.
187. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012 May 9;486(7402):222–7.
188. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012 Jun 13;486(7402):207–14.
189. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*. 2012 Aug 9;488(7410):178–84.
190. Dicksved J, Halfvarson J, Rosenquist M, Järnerot G, Tysk C, Apajalahti J, et al. Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *ISME J*. 2008 Jul;2(7):716–27.

191. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009 Jan 22;457(7228):480–4.
192. Campeotto F, Waligora-Dupriet A-J, Doucet-Populaire F, Kalach N, Dupont C, Butel M-J. [Establishment of the intestinal microflora in neonates]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2007 May;31(5):533–42.
193. Le Huërou-Luron I, Blat S, Boudry G. Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutr Res Rev*. 2010 Jun;23(1):23–36.
194. Bezirtzoglou E, Tsiotsias A, Welling GW. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe*. 2011 Dec;17(6):478–82.
195. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989 Nov 18;299(6710):1259–60.
196. Gupta VK, Paul S, Dutta C. Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity. *Front Microbiol*. 2017;8:1162.
197. Bonnemaïson E, Lanotte P, Cantagrel S, Thionois S, Quentin R, Chamboux C, et al. Comparison of fecal flora following administration of two antibiotic protocols for suspected maternofetal infection. *Biol Neonate*. 2003;84(4):304–10.
198. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol*. 2008 Nov 18;6(11):e280.
199. Antonopoulos DA, Huse SM, Morrison HG, Schmidt TM, Sogin ML, Young VB. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. *Infect Immun*. 2009 Jun;77(6):2367–75.
200. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011 Oct 7;334(6052):105–8.
201. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poulet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 17;107(33):14691–6.
202. Alam M, Midtvedt T, Uribe A. Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. *Scand J Gastroenterol*. 1994 May;29(5):445–51.
203. Husebye E, Hellström PM, Midtvedt T. Intestinal microflora stimulates myoelectric activity of rat small intestine by promoting cyclic initiation and aboral propagation of migrating myoelectric complex. *Dig Dis Sci*. 1994 May;39(5):946–56.
204. Husebye E, Hellström PM, Sundler F, Chen J, Midtvedt T. Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001 Mar;280(3):G368-380.
205. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15451–5.
206. Schirbel A, Kessler S, Rieder F, West G, Rebert N, Asosingh K, et al. Pro-Angiogenic Activity of TLRs and NLRs: A Novel Link Between Gut Microbiota and Intestinal Angiogenesis. *Gastroenterology*. 2013 Mar 1;144(3):613–623.e9.
207. Srikanth CV, McCormick BA. Interactions of the intestinal epithelium with the pathogen and the indigenous microbiota: a three-way crosstalk. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2008;2008:626827.
208. Gallo RL, Hooper LV. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol*. 2012 Jun 25;12(7):503–16.
209. Peng L, He Z, Chen W, Holzman IR, Lin J. Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. *Pediatr Res*. 2007 Jan;61(1):37–41.

210. Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, Saeedi B, Scholz CC, Bayless AJ, et al. Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell Host Microbe*. 2015 May 13;17(5):662–71.
211. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, Engelhardt H, Bengmark S, Koch S, et al. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut*. 2007 Mar;56(3):343–50.
212. Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr*. 2001 Jun;73(6):1131S–1141S.
213. Macfarlane GT, Gibson GR, Cummings JH. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *J Appl Bacteriol*. 1992 Jan;72(1):57–64.
214. Duncan SH, Holtrop G, Lobley GE, Calder AG, Stewart CS, Flint HJ. Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Br J Nutr*. 2004 Jun;91(6):915–23.
215. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoun C, Duchamp A, et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell*. 2014 Jan 16;156(1–2):84–96.
216. Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol*. 2014 Oct;12(10):661–72.
217. Burger-van Paassen N, Vincent A, Puiman PJ, van der Sluis M, Bouma J, Boehm G, et al. The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem J*. 2009 May 13;420(2):211–9.
218. O’Keefe SJD. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016 Dec;13(12):691–706.
219. Hu S, Liu L, Chang EB, Wang J-Y, Raufman J-P. Butyrate inhibits pro-proliferative miR-92a by diminishing c-Myc-induced miR-17-92a cluster transcription in human colon cancer cells. *Mol Cancer*. 2015 Oct 13;14:180.
220. Chen H-M, Yu Y-N, Wang J-L, Lin Y-W, Kong X, Yang C-Q, et al. Decreased dietary fiber intake and structural alteration of gut microbiota in patients with advanced colorectal adenoma. *Am J Clin Nutr*. 2013 May;97(5):1044–52.
221. Comalada M, Bailón E, de Haro O, Lara-Villoslada F, Xaus J, Zarzuelo A, et al. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006 Aug;132(8):487–97.
222. Singh B, Halestrap AP, Paraskeva C. Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources. *Carcinogenesis*. 1997 Jun;18(6):1265–70.
223. Emenaker NJ, Basson MD. Short chain fatty acids differentially modulate cellular phenotype and c-myc protein levels in primary human nonmalignant and malignant colonocytes. *Dig Dis Sci*. 2001 Jan;46(1):96–105.
224. Murakami T, Sato A, Chun NAL, Hara M, Naito Y, Kobayashi Y, et al. Transcriptional modulation using HDACi depsipeptide promotes immune cell-mediated tumor destruction of murine B16 melanoma. *J Invest Dermatol*. 2008 Jun;128(6):1506–16.
225. Khan ANH, Gregorie CJ, Tomasi TB. Histone deacetylase inhibitors induce TAP, LMP, Tapasin genes and MHC class I antigen presentation by melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother CII*. 2008 May;57(5):647–54.
226. Marcobal A, Sonnenburg JL. Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Jul;18 Suppl 4:12–5.
227. Macpherson AJ. IgA adaptation to the presence of commensal bacteria in the intestine. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;308:117–36.
228. Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science*. 2000 Jun 23;288(5474):2222–6.
229. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells

- carrying commensal bacteria. *Science*. 2004 Mar 12;303(5664):1662–5.
230. Macpherson AJ, Hunziker L, McCoy K, Lamarre A. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect*. 2001 Oct;3(12):1021–35.
231. PrabhuDas M, Adkins B, Gans H, King C, Levy O, Ramilo O, et al. Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines. *Nat Immunol*. 2011 Mar;12(3):189–94.
232. Kollmann TR, Levy O, Montgomery RR, Goriely S. Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. *Immunity*. 2012 Nov 16;37(5):771–83.
233. Chassin C, Kocur M, Pott J, Duerr CU, Gütle D, Lotz M, et al. miR-146a mediates protective innate immune tolerance in the neonate intestine. *Cell Host Microbe*. 2010 Oct 21;8(4):358–68.
234. Lotz M, Gütle D, Walther S, Ménard S, Bogdan C, Hornef MW. Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *J Exp Med*. 2006 Apr 17;203(4):973–84.
235. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*. 2005 Jul 15;122(1):107–18.
236. Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol*. 2007 Apr;19(2):59–69.
237. Glaister JR. Factors affecting the lymphoid cells in the small intestinal epithelium of the mouse. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1973;45(5):719–30.
238. Williams AM, Probert CSJ, Stepankova R, Tlaskalova-Hogenova H, Phillips A, Bland PW. Effects of microflora on the neonatal development of gut mucosal T cells and myeloid cells in the mouse. *Immunology*. 2006 Dec;119(4):470–8.
239. Walton KLW, He J, Kelsall BL, Sartor RB, Fisher NC. Dendritic cells in germ-free and specific pathogen-free mice have similar phenotypes and in vitro antigen presenting function. *Immunol Lett*. 2006 Jan 15;102(1):16–24.
240. Uematsu S, Jang MH, Chevrier N, Guo Z, Kumagai Y, Yamamoto M, et al. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c<sup>+</sup> lamina propria cells. *Nat Immunol*. 2006 Aug;7(8):868–74.
241. Sanos SL, Bui VL, Mortha A, Oberle K, Heners C, Johner C, et al. ROR $\gamma$  and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46<sup>+</sup> cells. *Nat Immunol*. 2009 Jan;10(1):83–91.
242. Satoh-Takayama N, Vosshenrich CAJ, Lesjean-Pottier S, Sawa S, Lochner M, Rattis F, et al. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46<sup>+</sup> cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity*. 2008 Dec 19;29(6):958–70.
243. Sawa S, Lochner M, Satoh-Takayama N, Dulauroy S, Bérard M, Kleinschek M, et al. ROR $\gamma$ <sup>+</sup> innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat Immunol*. 2011 Apr;12(4):320–6.
244. Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*. 2015 Jan 15;517(7534):293–301.
245. Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, Fung TC, Hutnick NA, Kunisawa J, et al. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science*. 2012 Jun 8;336(6086):1321–5.
246. Hepworth MR, Monticelli LA, Fung TC, Ziegler CGK, Grunberg S, Sinha R, et al. Innate lymphoid cells regulate CD4<sup>+</sup> T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature*. 2013 Jun 6;498(7452):113–7.
247. Kinnebrew MA, Buffie CG, Diehl GE, Zenewicz LA, Leiner I, Hohl TM, et al. Interleukin 23 production by intestinal CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity*. 2012 Feb

24;36(2):276–87.

248. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485–517.
249. Weaver CT, Elson CO, Fouser LA, Kolls JK. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annu Rev Pathol.* 2013 Jan 24;8:477–512.
250. Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science.* 2011 Apr 1;332(6025):65–8.
251. Okada S, Markle JG, Deenick EK, Mele F, Averbuch D, Lagos M, et al. IMMUNODEFICIENCIES. Impairment of immunity to *Candida* and *Mycobacterium* in humans with bi-allelic RORC mutations. *Science.* 2015 Aug 7;349(6248):606–13.
252. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol.* 2009 Mar;10(3):314–24.
253. Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol.* 2011 Mar;12(3):255–63.
254. El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, et al. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol.* 2011 Jun;12(6):568–75.
255. Harbour SN, Maynard CL, Zindl CL, Schoeb TR, Weaver CT. Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Jun 2;112(22):7061–6.
256. Stockinger B, Omenetti S. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat Rev Immunol.* 2017 Sep;17(9):535–44.
257. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, et al. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature.* 2008 Oct 9;455(7214):808–12.
258. Atarashi K, Tanoue T, Ando M, Kamada N, Nagano Y, Narushima S, et al. Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell.* 2015 Oct 8;163(2):367–80.
259. Sano T, Huang W, Hall JA, Yang Y, Chen A, Gavzy SJ, et al. An IL-23R/IL-22 Circuit Regulates Epithelial Serum Amyloid A to Promote Local Effector Th17 Responses. *Cell.* 2015 Oct 8;163(2):381–93.
260. Panea C, Farkas AM, Goto Y, Abdollahi-Roodsaz S, Lee C, Koscsó B, et al. Intestinal Monocyte-Derived Macrophages Control Commensal-Specific Th17 Responses. *Cell Rep.* 2015 Aug 25;12(8):1314–24.
261. Ohnmacht C, Park J-H, Cording S, Wing JB, Atarashi K, Obata Y, et al. MUCOSAL IMMUNOLOGY. The microbiota regulates type 2 immunity through ROR $\gamma$ <sup>+</sup> T cells. *Science.* 2015 Aug 28;349(6251):989–93.
262. Sefik E, Geva-Zatorsky N, Oh S, Konnikova L, Zemmour D, McGuire AM, et al. MUCOSAL IMMUNOLOGY. Individual intestinal symbionts induce a distinct population of ROR $\gamma$ <sup>+</sup> regulatory T cells. *Science.* 2015 Aug 28;349(6251):993–7.
263. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity.* 2008 Apr;28(4):546–58.
264. Huber S, Gagliani N, Esplugues E, O'Connor W, Huber FJ, Chaudhry A, et al. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3<sup>-</sup> and Foxp3<sup>+</sup> regulatory CD4<sup>+</sup> T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity.* 2011 Apr 22;34(4):554–65.
265. Park S-G, Mathur R, Long M, Hosh N, Hao L, Hayden MS, et al. T regulatory cells maintain intestinal homeostasis by suppressing  $\gamma\delta$  T cells. *Immunity.* 2010 Nov 24;33(5):791–803.
266. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science.* 2011 Jan

- 21;331(6015):337–41.
267. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*. 2013 Aug 8;500(7461):232–6.
268. Karimi K, Inman MD, Bienenstock J, Forsythe P. Lactobacillus reuteri-induced regulatory T cells protect against an allergic airway response in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Feb 1;179(3):186–93.
269. Tang C, Kamiya T, Liu Y, Kadoki M, Kakuta S, Oshima K, et al. Inhibition of Dectin-1 Signaling Ameliorates Colitis by Inducing Lactobacillus-Mediated Regulatory T Cell Expansion in the Intestine. *Cell Host Microbe*. 2015 Aug 12;18(2):183–97.
270. Shen Y, Giardino Torchia ML, Lawson GW, Karp CL, Ashwell JD, Mazmanian SK. Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. *Cell Host Microbe*. 2012 Oct 18;12(4):509–20.
271. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem*. 2003 Mar 28;278(13):11312–9.
272. Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael J-Y, Lannoy V, Decobecq M-E, et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem*. 2003 Jul 11;278(28):25481–9.
273. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009 Oct 29;461(7268):1282–6.
274. Thangaraju M, Cresci GA, Liu K, Ananth S, Gnanaprakasam JP, Browning DD, et al. GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer Res*. 2009 Apr 1;69(7):2826–32.
275. Böhmig GA, Krieger PM, Säemann MD, Wenhardt C, Pohanka E, Zlabinger GJ. n-butyrate downregulates the stimulatory function of peripheral blood-derived antigen-presenting cells: a potential mechanism for modulating T-cell responses by short-chain fatty acids. *Immunology*. 1997 Oct;92(2):234–43.
276. Säemann MD, Böhmig GA, Osterreicher CH, Burtscher H, Parolini O, Diakos C, et al. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2000 Dec;14(15):2380–2.
277. Säemann MD, Parolini O, Böhmig GA, Kelemen P, Krieger P-M, Neumüller J, et al. Bacterial metabolite interference with maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2002 Feb;71(2):238–46.
278. Liu L, Li L, Min J, Wang J, Wu H, Zeng Y, et al. Butyrate interferes with the differentiation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Cell Immunol*. 2012 Jun;277(1–2):66–73.
279. Wang B, Morinobu A, Horiuchi M, Liu J, Kumagai S. Butyrate inhibits functional differentiation of human monocyte-derived dendritic cells. *Cell Immunol*. 2008 Jun;253(1–2):54–8.
280. Qiang Y, Xu J, Yan C, Jin H, Xiao T, Yan N, et al. Butyrate and retinoic acid synergistically imprint mucosal-like dendritic cell development from bone marrow cells. *Clin Exp Immunol*. 2017 May 24;
281. Chang PV, Hao L, Offermanns S, Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Feb 11;111(6):2247–52.
282. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 2013 Aug 2;341(6145):569–73.
283. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal



- microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013 Dec 19;504(7480):446–50.
284. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikly S, van der Veeke J, deRoos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. 2013 Dec 19;504(7480):451–5.
285. Jackson SK, DeLoose A, Gilbert KM. The ability of antigen, but not interleukin-2, to promote n-butyrate-induced T helper 1 cell anergy is associated with increased expression and altered association patterns of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Immunology*. 2002 Aug;106(4):486–95.
286. Gilbert KM, Boger SR, Price P, Fifer EK. T cell tolerance induced by histone deacetylase inhibitor is mediated by P21cip1. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2005;27(4):545–64.
287. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn’s disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006 Feb;55(2):205–11.
288. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 28;105(43):16731–6.
289. Halfvarson J, Brislawn CJ, Lamendella R, Vázquez-Baeza Y, Walters WA, Bramer LM, et al. Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol*. 2017 Feb 13;2:17004.
290. Hansen R, Russell RK, Reiff C, Louis P, McIntosh F, Berry SH, et al. Microbiota of de-novo pediatric IBD: increased Faecalibacterium prausnitzii and reduced bacterial diversity in Crohn’s but not in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2012 Dec;107(12):1913–22.
291. Assa A, Butcher J, Li J, Elkadri A, Sherman PM, Muise AM, et al. Mucosa-Associated Ileal Microbiota in New-Onset Pediatric Crohn’s Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2016 Jul;22(7):1533–9.
292. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vázquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, et al. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn’s disease. *Cell Host Microbe*. 2014 Mar 12;15(3):382–92.
293. Lewis JD, Chen EZ, Baldassano RN, Otley AR, Griffiths AM, Lee D, et al. Inflammation, Antibiotics, and Diet as Environmental Stressors of the Gut Microbiome in Pediatric Crohn’s Disease. *Cell Host Microbe*. 2015 Oct 14;18(4):489–500.
294. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, et al. Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn’s disease. *Gastroenterology*. 1998 Dec;115(6):1405–13.
295. Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Invasive ability of an Escherichia coli strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn’s disease. *Infect Immun*. 1999 Sep;67(9):4499–509.
296. Lehoucrist P, Cummins J, Stanton M, Murphy CT, McCarthy FO, Reid G, et al. Local bacteria affect the efficacy of chemotherapeutic drugs. *Sci Rep*. 2015 Sep 29;5:14554.
297. Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, Smith L, Bouladoux N, Weingarten RA, et al. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science*. 2013 Nov 22;342(6161):967–70.
298. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Dec;12(12):860–75.
299. Viaud S, Saccheri F, Mignot G, Yamazaki T, Daillère R, Hannani D, et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science*. 2013 Nov 22;342(6161):971–6.
300. Daillère R, Vétizou M, Waldschmitt N, Yamazaki T, Isnard C, Poirier-Colame V, et

- al. *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* Facilitate Cyclophosphamide-Induced Therapeutic Immunomodulatory Effects. *Immunity*. 2016 Oct 18;45(4):931–43.
301. Ghoreschi K, Laurence A, Yang X-P, 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.
302. Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science*. 2015 Nov 27;350(6264):1079–84.
303. Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*. 2015 Nov 27;350(6264):1084–9.
304. Feng Y, Roy A, Masson E, Chen T-T, Humphrey R, Weber JS. Exposure-response relationships of the efficacy and safety of ipilimumab in patients with advanced melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2013 Jul 15;19(14):3977–86.
305. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med*. 2015 May 21;372(21):2006–17.
306. Uno T, Takeda K, Kojima Y, Yoshizawa H, Akiba H, Mittler RS, et al. Eradication of established tumors in mice by a combination antibody-based therapy. *Nat Med*. 2006 Jun;12(6):693–8.
307. Iwama S, De Remigis A, Callahan MK, Slovin SF, Wolchok JD, Caturegli P. Pituitary expression of CTLA-4 mediates hypophysitis secondary to administration of CTLA-4 blocking antibody. *Sci Transl Med*. 2014 Apr 2;6(230):230ra45.
308. Laurent S, Queirolo P, Boero S, Salvi S, Piccioli P, Boccardo S, et al. The engagement of CTLA-4 on primary melanoma cell lines induces antibody-dependent cellular cytotoxicity and TNF- $\alpha$  production. *J Transl Med*. 2013;11:108.
309. Romano E, Kusio-Kobialka M, Foukas PG, Baumgaertner P, Meyer C, Ballabeni P, et al. Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 May 12;112(19):6140–5.
310. Selby MJ, Engelhardt JJ, Quigley M, Henning KA, Chen T, Srinivasan M, et al. Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol Res*. 2013 Jul;1(1):32–42.
311. Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med*. 2013 Aug 26;210(9):1695–710.
312. Bulliard Y, Jolicoeur R, Windman M, Rue SM, Ettenberg S, Knee DA, et al. Activating Fc  $\gamma$  receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J Exp Med*. 2013 Aug 26;210(9):1685–93.
313. Liu J, Blake SJ, Harjunpää H, Fairfax KA, Yong MCR, Allen S, et al. Assessing Immune-Related Adverse Events of Efficacious Combination Immunotherapies in Preclinical Models of Cancer. *Cancer Res*. 2016 Sep 15;76(18):5288–301.
314. Delyon J, Mateus C, Lefeuvre D, Lanoy E, Zitvogel L, Chaput N, et al. Experience in daily practice with ipilimumab for the treatment of patients with metastatic melanoma: an early increase in lymphocyte and eosinophil counts is associated with improved survival. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2013 Jun;24(6):1697–703.
315. Di Giacomo AM, Danielli R, Calabrò L, Bertocci E, Nannicini C, Giannarelli D, et al. Ipilimumab experience in heavily pretreated patients with melanoma in an expanded access program at the University Hospital of Siena (Italy). *Cancer Immunol Immunother CII*. 2011 Apr;60(4):467–77.
316. Tarhini A. Immune-mediated adverse events associated with ipilimumab ctla-4 blockade therapy: the underlying mechanisms and clinical management. *Scientifica*.

2013;2013:857519.

317. Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Geukes Foppen M, Yuan J, Postow MA, Wong P, et al. Baseline Peripheral Blood Biomarkers Associated with Clinical Outcome of Advanced Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016 Jun 15;22(12):2908–18.
318. Dubin K, Callahan MK, Ren B, Khanin R, Viale A, Ling L, et al. Intestinal microbiome analyses identify melanoma patients at risk for checkpoint-blockade-induced colitis. *Nat Commun*. 2016;7:10391.
319. Furuchi T, Kashiwagi K, Kobayashi H, Igarashi K. Characteristics of the gene for a spermidine and putrescine transport system that maps at 15 min on the Escherichia coli chromosome. *J Biol Chem*. 1991 Nov 5;266(31):20928–33.
320. Weiss TS, Herfarth H, Obermeier F, Quart J, Vogl D, Schölmerich J, et al. Intracellular polyamine levels of intestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004 Sep;10(5):529–35.
321. Hill MJ. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP*. 1997 Mar;6 Suppl 1:S43-45.
322. Kuroki F, Iida M, Tominaga M, Matsumoto T, Hirakawa K, Sugiyama S, et al. Multiple vitamin status in Crohn's disease. Correlation with disease activity. *Dig Dis Sci*. 1993 Sep;38(9):1614–8.
323. Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, Le Nours J, Meehan B, Liu L, et al. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature*. 2012 Nov 29;491(7426):717–23.
324. Serriari N-E, Eoche M, Lamotte L, Lion J, Fumery M, Marcelo P, et al. Innate mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are activated in inflammatory bowel diseases. *Clin Exp Immunol*. 2014 May;176(2):266–74.
325. Hinks TSC. Mucosal-associated invariant T cells in autoimmunity, immune-mediated diseases and airways disease. *Immunology*. 2016 May;148(1):1–12.
326. Riley JL, Blair PJ, Musser JT, Abe R, Tezuka K, Tsuji T, et al. ICOS costimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001 Apr 15;166(8):4943–8.
327. Lotze MT, Custer MC, Sharrow SO, Rubin LA, Nelson DL, Rosenberg SA. In vivo administration of purified human interleukin-2 to patients with cancer: development of interleukin-2 receptor positive cells and circulating soluble interleukin-2 receptors following interleukin-2 administration. *Cancer Res*. 1987 Apr 15;47(8):2188–95.
328. Sim GC, Martin-Orozco N, Jin L, Yang Y, Wu S, Washington E, et al. IL-2 therapy promotes suppressive ICOS+ Treg expansion in melanoma patients. *J Clin Invest*. 2014 Jan;124(1):99–110.
329. Klatzmann D, Abbas AK. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2015 May;15(5):283–94.
330. Binion DG, West GA, Ina K, Ziats NP, Emancipator SN, Fiocchi C. Enhanced leukocyte binding by intestinal microvascular endothelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1997 Jun;112(6):1895–907.
331. Bergqvist V, Hertervig E, Gedeon P, Kopljar M, Griph H, Kinhult S, et al. Vedolizumab treatment for immune checkpoint inhibitor-induced enterocolitis. *Cancer Immunol Immunother CII*. 2017 May;66(5):581–92.
332. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song S-Y. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):527–38.
333. Cimbro R, Vassena L, Arthos J, Cicala C, Kehrl JH, Park C, et al. IL-7 induces expression and activation of integrin  $\alpha 4\beta 7$  promoting naive T-cell homing to the intestinal mucosa. *Blood*. 2012 Sep 27;120(13):2610–9.
334. Guigoz Y, Doré J, Schiffrin EJ. The inflammatory status of old age can be nurtured from the intestinal environment. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008 Jan;11(1):13–20.

335. Rossi O, van Berkel LA, Chain F, Tanweer Khan M, Taverne N, Sokol H, et al. Faecalibacterium prausnitzii A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses. *Sci Rep*. 2016 Jan 4;6:18507.
336. Sarabayrouse G, Bossard C, Chauvin J-M, Jarry A, Meurette G, Quévrain E, et al. CD4CD8 $\alpha\alpha$  lymphocytes, a novel human regulatory T cell subset induced by colonic bacteria and deficient in patients with inflammatory bowel disease. *PLoS Biol*. 2014 Apr;12(4):e1001833.
337. Qiu X, Zhang M, Yang X, Hong N, Yu C. Faecalibacterium prausnitzii upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating TNBS-induced colitis. *J Crohns Colitis*. 2013 Dec;7(11):e558-568.
338. Martín R, Miquel S, Benevides L, Bridonneau C, Robert V, Hudault S, et al. Functional Characterization of Novel Faecalibacterium prausnitzii Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of F. prausnitzii as a Next-Generation Probiotic. *Front Microbiol*. 2017;8:1226.
339. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*. 2010 Jul;40(7):1830–5.
340. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, et al. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- $\gamma$  axis. *J Clin Invest*. 2008 Jun;118(6):2269–80.
341. Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol*. 2010 Oct;10(10):735–44.
342. Blacher E, Levy M, Tatrovsky E, Elinav E. Microbiome-Modulated Metabolites at the Interface of Host Immunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2017 Jan 15;198(2):572–80.
343. Wang B, Morinobu A, Horiuchi M, Liu J, Kumagai S. Butyrate inhibits functional differentiation of human monocyte-derived dendritic cells. *Cell Immunol*. 2008 Jun;253(1–2):54–8.
344. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VA, Lombard LA, et al. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science*. 1993 Nov 5;262(5135):909–11.
345. Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O'Connell TM, Bunger MK, et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab*. 2011 May 4;13(5):517–26.
346. Cherbuy C, Andrieux C, Honvo-Houeto E, Thomas M, Ide C, Druesne N, et al. Expression of mitochondrial HMGCoA synthase and glutaminase in the colonic mucosa is modulated by bacterial species. *Eur J Biochem*. 2004 Jan;271(1):87–95.
347. 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.
348. Kamphorst AO, Wieland A, Nasti T, Yang S, Zhang R, Barber DL, et al. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science*. 2017 Mar 31;355(6332):1423–7.

## RESUME

### **TITRE : Immunomodulation par les anticorps monoclonaux thérapeutiques bloquant CTLA-4 : rôle de la flore intestinale et de ses métabolites**

Au cours des dernières années, l'immunothérapie a révolutionné le paysage en oncologie. L'anti-CTLA-4 a montré son efficacité sur la survie globale des patients atteints de mélanome métastatique. Cependant, ce traitement présente des limites à son utilisation telles que l'efficacité clinique obtenue chez seulement 20% des patients et la survenue fréquente de colites pouvant être sévères. La recherche de biomarqueurs prédictifs de réponse clinique et/ou de développement de toxicité devient maintenant un enjeu majeur pour sélectionner les patients pouvant avoir un bénéfice à l'utilisation de ces traitements. En partant de l'observation que les colites induites par l'anti-CTLA-4 présentent des similitudes avec les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'un microbiote intestinal associé à une dysrégulation du système immunitaire pouvant prédire la réponse clinique et/ou la survenue d'une colite induite par l'anti-CTLA-4.

Nous avons montré dans une cohorte de patients atteints de mélanome métastatique et traités par ipilimumab, qu'un microbiote intestinal enrichi en *Faecalibacterium* et autres *Firmicutes* est associé à une meilleure survie globale et sans progression ainsi qu'un risque accru de développer une colite. Les patients avec une flore enrichie en *Firmicutes* présentent également après traitement par ipilimumab, une activation lymphocytaire plus efficace. Par la suite, nous nous sommes intéressés aux métabolites issus du microbiote fécal et leur implication dans la réponse à l'anti-CTLA-4. Le butyrate est le principal métabolite produit par les *Firmicutes*. Nous avons observé chez la souris, une inhibition de l'efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA-4 lorsqu'elles étaient supplémentées en butyrate. *In vivo*, nous avons montré que le butyrate inhibe la surexpression sur les cellules dendritiques, des molécules CD80 et CD86 (molécules B7) induite par l'anti-CTLA-4. Cette immaturité des cellules dendritiques entraîne un défaut d'activation des lymphocytes T spécifiques d'antigènes dépendant de l'axe CD28/B7 réduisant ainsi l'efficacité anti-tumorale. Chez l'Homme, nous avons validé cette hypothèse en montrant qu'une concentration sérique élevée en butyrate est associée à une diminution de la survie globale et sans progression comparativement aux patients avec un faible niveau de butyrate sérique.

Ces travaux mettent en évidence le lien entre la composition du microbiote et les réponses immunologiques au blocage du CTLA-4. Ils apportent une explication sur un lien indirect *via* le butyrate entre la composition du microbiote intestinal et la réponse anti-tumorale aux immunothérapies.

**Mots clés: colite,CTLA-4,immunothérapie,cancer,Microbiote intestinal, Butyrate**

### **TITLE : Immunomodulation with CTLA-4 blockade monoclonal antibodies: role of gut microbiota and its metabolites.**

In the last years, immunotherapy has revolutionized the landscape in oncology. The efficacy of anti-CTLA-4 has been demonstrated by improving overall survival of patients with metastatic melanoma. However, this treatment has limitations to its use such as the clinical efficacy obtained in only 20% of patients and the high incidence of severe colitis. Predictive biomarkers of clinical response and / or toxicity development are mandatory for a better selection of patients who will benefit from this treatment. Based on the observation that anti-CTLA-4-induced colitis has similarities with inflammatory bowel disease, we hypothesized that the gut microbiota associated with dysregulation of the immune system may predict the clinical response and / or occurrence of anti-CTLA-4-induced colitis.

In a cohort of patients with metastatic melanoma treated with ipilimumab, we have shown that a gut microbiota enriched with *Faecalibacterium* and other *Firmicutes* is associated with a better of overall and progression-free survival as well as an increased risk of developing colitis. *Firmicutes*-driven microbiota is also associated with an improvement in lymphocyte T activation after ipilimumab treatment. Subsequently, we were interested in microbial metabolites and their involvement in the clinical response to anti-CTLA-4. Butyrate is the main metabolite produced by the *Firmicutes*. In mice, we observed an inhibition of anti-tumor effect of anti-CTLA-4 in butyrate-supplemented mice. *In vivo*, we have shown that butyrate inhibits the overexpression on dendritic cells, of CD80 and CD86 molecules (B7 molecules) induced by anti-CTLA-4. This immaturity of the dendritic cells leads to a poor signaling of CD28 / B7 axis and activation of antigen-specific T-cells, thereby reducing anti-tumor efficacy. In humans, we validated this hypothesis by showing that a high serum concentration of butyrate is associated with decreased overall and progression-free survival compared to patients with low serum butyrate levels.

This study highlights the link between the composition of gut microbiota and the immunological responses to CTLA-4 blockade. They provide an explanation of an indirect link *via* butyrate, between the composition of the gut microbiota and the anti-tumor response to immunotherapies.

**Key word: colitis, CTLA-4, immunotherapy, gut microbiota, butyrate**