



HAL
open science

Renforcement des effets immunomodulateurs d'un anticorps monoclonal anti-tumoral : étude des effets potentialisateurs de thérapies combinées et analyse des mécanismes impliqués

Laetitia They

► **To cite this version:**

Laetitia They. Renforcement des effets immunomodulateurs d'un anticorps monoclonal anti-tumoral : étude des effets potentialisateurs de thérapies combinées et analyse des mécanismes impliqués. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTT076 . tel-02045505

HAL Id: tel-02045505

<https://theses.hal.science/tel-02045505>

Submitted on 22 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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé - CBS2

Unité de recherche : Inserm U1194 – Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM)

**RENFORCEMENT DES EFFETS IMMUNOMODULATEURS
D'UN ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-TUMORAL: ETUDE
DES EFFETS POTENTIALISATEURS DE THERAPIES
COMBINEES ET ANALYSE DES MECANISMES IMPLIQUES.**

Présentée par Laetitia THEY
Le 19 Novembre 2018

Sous la direction de Laurent GROS du Directeur de thèse

Devant le jury composé de

Prof. Bernard GUILLOT, PU/PH, CHU Montpellier, Département dermatologie
Dr. Maha AYYOUB, PU/PH, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT)
Dr. Christophe CAUX, DR, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL)
Dr. Nathalie ANDRIEU-ABADIE, DR, Centre de recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT)
Dr. Valérie DARDALHON, CR, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM)
Dr. Laurent GROS, CR, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM)

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

« La persévérance et la ténacité viennent à bout de tout »

A ma Maman,

Remerciements

Rédiger un manuscrit de thèse c'est déjà une épreuve, mais rédiger des remerciements ... La thèse ? C'est des manips, des résultats, des présentations, beaucoup beaucoup de travail c'est indéniable. Mais ce qui rend cette aventure vraiment spéciale, ce sont les gens qui partagent ce quotidien avec vous. Toutes ces rencontres qui sont scientifiquement et humainement capitales. Durant la thèse on grandit, on mûrit, on s'améliore, du moins je l'espère...

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Je remercie le Pr Bernard Guillot d'avoir accepté de présider ce jury. Je remercie le Dr Maha Ayyoub et le Dr Christophe Caux d'avoir bien voulu prendre le temps de lire mon manuscrit et d'avoir eu un esprit critique sur mes travaux. Je remercie également les membres de mon comité de thèse Dr Nathalie Andrieu et le Dr Valérie Dardalhon d'avoir suivi mon travail scientifique jusqu'ici et d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Valérie, j'ai aussi eu la chance de te connaître en dehors du contexte de ma thèse, et je te remercie pour tes conseils tant personnels que professionnels qui m'ont permis d'avancer durant ces trois années. J'en profite dans ce contexte pour également remercier l'Association Femme et Science ainsi que May Morris pour ces rencontres justement, ces expériences autour du mentorat si enrichissantes et inspirantes.

Nathalie, merci de m'avoir accueillie dans ~~votre~~ ton équipe. Chacune de nos interactions m'a fait avancer et mûrir scientifiquement mais également personnellement. Le chemin sera encore long, mais je te suis très reconnaissante de toute l'aide et le soutien que tu m'as apportés, le regard critique que tu as posé sur mes travaux pour toujours me faire avancer et évoluer vers l'étape suivante.

Laurent, tu m'as accordé ta confiance alors que je venais d'un autre monde scientifique et tu as toujours fait preuve de beaucoup de patience pour m'enseigner les techniques et me mettre le pied à l'étrier les premiers mois. Je te remercie pour ta compréhension, ainsi que pour l'autonomie que tu m'as donnée dans ce projet par la suite.

Quand on parle de Laurent, on pense forcément à Halex, et vice versa. Les « tic et tac » de l'institut. Combien de séances de coaching où tu me faisais changer TOUTES mes diapos la veille de l'oral ! Qu'est-ce que c'était stressant, mais oh combien travailler à tes côtés a été enrichissant et m'a permis de m'améliorer ! Un grand merci Halex, et bonne continuation avec la plateforme, une jolie aventure qui commence !

Virginie, ton franc parlé et ton dynamisme ne nous empêche pas de te qualifier, nous, les *petits*, de « Maman de laboratoire », car comme une maman tu es une oreille toujours attentive, vigilante, tu cherches une solution à chaque situation. Il est facile de discuter avec toi, tant scientifiquement que personnellement, ce qui a été, particulièrement ces derniers mois, d'un grand soutien pour moi, et je t'en remercie énormément.

Et forcément, j'en arrive à toi, Clément, notre Parisien désormais Belge. Je pense qu'on peut maintenant le dire, nos caractères sont diamétralement opposés, toi le calme et la sérénité, moi la folie et le dynamisme et pourtant... Arrivés presque ensemble au sein de l'équipe, c'est avec toi que ça a matché en premier! Probablement que les longues soirées de manip où tu lançais des stim de 4 heures à 17h et où je finissais mes marquages y ont contribué... Ton départ n'a vraiment pas été simple, j'espère que cette expérience en Belgique t'ouvrira de nombreuses portes!

Frisette, toi aussi tu m'as abandonnée durant ma thèse, et je suis ravie pour toi de l'opportunité que tu as su saisir en Suisse. Néanmoins, je ne te remercie pas pour tous ces surnoms affectueux dont on m'a affublée très rapidement grâce à toi: Microbe, Chipounette... Et puis ces jupes... Toujours trop courtes je maintiens ;)

Juju... je pense que les mots vont me manquer... Je ne doute pas que ton esprit scientifique et ta curiosité te mèneront loin dans la vie, accroche toi dans cette nouvelle aventure à LA. Tu es une belle personne avec des valeurs qui sont rares. Je n'oublie pas tous ces *services rendus*, que peu de personnes auraient consentis. A bientôt mon Juju !

J'en arrive à la team « BDB », les survivants de cette équipe. . .

Cécile, il fallait te remercier tout de même, et ce au nom de tous les petitous de cette équipe, pour nous avoir fait partager toutes ces anecdotes de « Mon dinosaure, cet animal de compagnie pas comme les autres »! #lovelovelove

« Anthonyyyyyy », oui parce que finalement, tout a commencé ainsi Djessy Pouëlles... Ces fou rires, tous ces moments de folies gravés dans mon téléphone... Y'a pas à dire, les couloirs du N2F2 auraient été trop calmes sans toi. Je n'oublie pas tous ces moments malgré les circonstances.

Doly, mon petit **chamallow**, la sensibilité incarnée... **Tu te calmes** ! Il n'y a rien de péjoratif ! Malgré tes trente ans passés (cadeau !) ton soutien et tous ces **moments de qualités** passés avec toi ont rendu certains moments délicats supportables. Merci pour ta présence, ces *paroles valorisantes*, et d'être la belle personne que tu es. Je te souhaite beaucoup de réussites dans les projets personnels et professionnels et cette année aura définitivement scellé une amitié robuste (****p < 0.0001 non-parametric Mann-Whitney test for friendship evaluation).

Merci à toute cette dynamique équipe. A Marine pour son implication dans le projet oxaliplatine, à Angéline pour sa douceur, à Maïlys pour son énergie, à Ondine, pour sa zénitude, à Olivier, bon courage pour la dernière ligne droite ;) et Naoïll pour sa gentillesse. Ghita, profite de ces trois années, je ne doute pas de ta réussite.

Merci aux groupes de parole de l'étage sans qui ces midis de l'été 2018 auraient été bien tristes: Laura, Anais, Emilie, Aude, Lindsay et j'en oublie forcément.

Je tiens à souligner que, sans le soutien de mon équipe de stage de master 2 incluant Cyril, Julie, Fanny et bien d'autres de l'IGF, je n'aurais probablement pas réussi à me lancer dans l'aventure de la thèse. Ils représentent encore aujourd'hui un grand soutien. Harun, tu as également été une réelle source d'inspiration. C'est avec toi que j'ai découvert la recherche, c'est toi qui m'as transmis ta passion. Dans un moment délicat de ma vie, tu as su déceler des capacités que je ne soupçonnais pas, qui m'ont permis d'envisager des projets de carrière auxquels je n'osais même pas penser.

Merci à Cyril Rivat, Anne-Sophie Gosselin-Grenet et Nelly Godefroy de m'avoir donné l'opportunité de réaliser des missions d'enseignements qui m'ont permis d'acquérir des capacités complémentaires à celles développées dans mon doctorat. C'était un plaisir de réaliser ces enseignements à vos côtés.

Je tiens à remercier par ces quelques lignes l'ensemble des personnes qui de près ou de loin m'ont permis de réaliser ce projet. Je remercie MRI et plus particulièrement, Myriam pour sa disponibilité permanente. Merci à la plateforme URT et à Florence Boissière qui a su trouver des solutions malgré mon air paniqué la première fois que nous nous sommes rencontrées ! Un grand merci à l'équipe de l'animalerie de l'IRCM, les Lucy, Valérie et Nicolas. Charles, oui, toi aussi je te remercie, car même si je dois avouer que j'ai mis du temps à comprendre ton humour (enfin c'est toi qui qualifie ça d'humour. . .), je vais en surprendre certain(e)s, c'était vraiment agréable d'interagir avec toi. Yoann... Je te dois un petit mot particulier, l'indétrônable ! Quand tu es parti tu as laissé un grand vide à l'animalerie. C'était un bonheur sans nom d'avoir une personne aussi énergique et serviable quotidiennement, quel que soit le temps, quel que soit le jour... Ne change pas !

Mais qu'auraient été toutes ces longues journées sans ces petites habitudes, ces « coucou » à la volée, ces éclats de rires et ces petites routines qu'on adore : Marina, ton accent si chantant qui me fait voyager tous les matins dans l'ascenseur. « DJ Abdel », pas une rencontre dans un couloir sans un de tes sourires qui redonnent le moral. Anaïs, nos irremplaçables discussions au magasin m'ont manqué pendant cette rédaction. Sandrine, 5 minutes de discussion avec toi et on est repartie pour la semaine. Jean-Yves, les prochains doctorants ne savent pas ce qu'ils ratent avec ton départ... Profite bien de ta retraite. Nico, je ne dirais qu'une chose mais qui résume tout « et coucouuuu ». Lisa, cette énergie débordante si inspirante... De manière générale j'aimerais remercier toutes les personnes de l'IRCM avec qui j'ai pu interagir tout au long de ma thèse. J'ai passé des très bonnes années ici et c'est grâce à vous.

Un petit mot particulier, pour tous les doctorants de cet institut, les compagnons de galères : Le gang des Libanais dont la plupart nous ont déjà quittés mais que je n'oublie pas, Amanda, Mouna, Emile, Zahra, Diala, Rita . . . Le club des SMEM (Soutien Mutuel dans l'écriture du Manuscrit) Sarah, Nabyia, Romain. . . Les petitounes à qui l'on souhaite le meilleur après notre départ, Sara (Ciao bella !), ma petite Emilia, femme de ma vie, ces petites pauses potins et coaching tombaient toujours à point nommé !

Je n'oublie pas les membres du Labex MabImprove et ces retraites très enrichissantes scientifiquement mais également humainement avec des coordinateurs au top. Merci Marc et Mélusine !

A ton tour, ma coupine de thèse mais pas que... Je te dois quelques lignes qui ne seront que le pâle reflet de tous ces moments, bons et moins bons, que nous avons partagés durant ces trois ans. Combien de gouters pour tenir ces **hippo-glycémie** pendant la rédaction... Avec la **canne-icule**, il fallait bien un petit **pan-plemousse** pour aider de temps en temps... une amie comme on en découvre peu à nos âges ! Qui aurait cru que nous aurions partagé tant de choses ensemble ? Moi ! J'ai vu tout de suite la belle personne que tu étais bien avant notre première retraite au Mont-Dore qui scella le début de cette belle amitié qui, je n'en doute pas, perdurera au-delà de la thèse.

Cette thèse m'aura fait découvrir des capacités insoupçonnées grâce à l'Asso CBS2. Merci pour tous ces moments partagés et les amitiés qui s'y sont créées Samy, Benoit, Amélie, Camille, Sara, Mathilde... Alex et Jen, l'année 2017 aura été mémorable et sans hésiter j'aurai resigné avec vous pour organiser cette journée malgré les galères, une belle amitié insoupçonnable, qui débuta un mois de Février me semble-t-il... ?

Il est d'usage de remercier la famille à la fin de cette partie. Nous y voilà...

Tom, je t'envie cette confiance que tu as et que Sandrine, Doudou et toi partages si tendrement avec moi... Mon Gillou, combien de fois me suis-je répétée que j'avais de la chance de pouvoir compter parmi mes proches, une personne telle que toi, tu ne mesures pas l'importance de tes messages et de ta présence rassurante particulièrement ces derniers mois... Je me dois aussi de remercier une Personne extraordinaire qui a réussi à me supporter ces derniers mois, merci pour ta présence, ta bonne humeur, Le soutien et la patience (mise à rude épreuve parfois) dont tu as fait preuve durant cette écriture.

Lexou, une petite étoile ! On ne la voit pas toujours mais elle est là quand on en a besoin. Une sorte de discrétion... mais ceux qui te connaissent, s'accorderont à dire que ce n'est peut-être pas le qualificatif qui te convient le mieux... Poupine, ces dix années n'auront pas effacé nos habitudes ni notre belle amitié. Je me rappelle encore en fac de pharma « Maman dit que les amitiés de la fac, sont celles qui perdurent », nous ne ferons donc pas mentir ta Maman ! Ma Gabouche, tout ~~aurait pu~~ vraiment très mal commencé entre nous, et pourtant, l'une des plus fidèles. C'est bien plus que des petites soirées que l'on partage en vrai, c'est des koeurs koeurs paillettes qui nous caractérisent !

Zazou dès notre rencontre tu as pris une place particulière dans ma vie. Les années n'y ont rien changé, et 8 ans plus tard j'ai encore eu la démonstration de la chance que j'avais de t'avoir dans ma vie. Les mots ne seront jamais à la hauteur de tout l'amour que je te porte. Anna, la distance n'a jamais altéré ce soutien sans faille que tu m'apportes, tu es l'amie la sœur que tout le monde devrait avoir. C'est avec beaucoup de pudeur que je résumerais et conclurais avec un « jusqu'à buzz l'éclair et au-delà ».

Merci à vous les copains, ne changez jamais, vous êtes si précieux. Je vais faire ma **romantique** mais... je vous aime fort !

Table des matières

Liste des abréviations	12
Liste des figures	16
Liste des tableaux	18
Introduction.....	19
A. Le microenvironnement tumoral.	21
1. Historique.	21
2. La composition du microenvironnement tumoral.	22
a. La composante moléculaire : la matrice extracellulaire.	22
b. La composante cellulaire.....	23
i. Les cellules tumorales.	23
ii. Les fibroblastes associés aux cancers (CAF).	26
iii. Les cellules endothéliales.	27
iv. Les cellules immunitaires.	28
B. L'évolution du concept d'immunosurveillance.	30
1. La naissance d'un concept.....	30
a. Les observations précliniques.	32
b. Les observations cliniques.....	33
2. De l'immunosurveillance à l'immunoédition.	34
a. La phase d'élimination :.....	37
b. La phase d'équilibre :	38
c. Mécanismes de l'échappement tumoral.....	39
i. Les modifications de la cellule tumorale.....	40
ii. Développement de mécanismes immunosuppresseurs.	42
L'axe CTLA-4/CD80-CD86.	48
L'axe PD-1/PD-L1, impliqué dans la phase effectrice.....	50
Autres exemples de points de contrôles immunitaires.....	53
C. Thérapies anti-cancéreuses.....	55
1. La chimiothérapie.....	55
2. La radiothérapie.	60
3. Les molécules inhibitrices.....	62
4. Les immunothérapies.....	65
a. Les transferts adoptifs de cellules immunitaires.....	65
b. L'immunothérapie par les cytokines.	66
c. Les vaccins anti-cancéreux.	68

d.	Les anticorps Monoclonaux.....	70
i.	Les effets cytotoxiques de l'AcM ciblant la cellule tumorale.....	72
ii.	Les effets immunomodulateurs des AcM ciblant la cellule tumorale.....	73
iii.	Les AcM ciblant le système immunitaire.....	75
	Les α -CTLA-4.....	76
	Les α -PD-1/ α -PD-L1.....	77
	D'autres thérapies visant des points de contrôles immunitaires.....	77
iv.	Les limites de ces thérapies.....	79
5.	Combinaisons thérapeutiques.....	80
a.	Radiothérapie/Immunothérapie.....	82
b.	Chimiothérapie/Immunothérapie.....	84
c.	Combinaisons d'immunothérapies.....	84
d.	Combinaisons molécules inhibitrices spécifiques/Immunothérapie.....	86
	Objectifs des travaux de thèse.....	88
A.	Contexte scientifique.....	89
B.	Résultats antérieurs et bases du projet.....	93
C.	Objectifs du projet de thèse.....	95
	RESULTATS PARTIE 1 :	97
	Le blocage de PD-1 au moment de l'échappement tumoral potentialise les effets anti-tumoraux immunomodulateurs d'un anticorps monoclonal ciblant le mélanome.....	97
A.	Introduction.....	98
B.	Discussion et perspectives.....	117
1.	Les effets de l'AcM TA99 sur la réponse innée.....	117
2.	Les effets tardifs de l'AcM TA99.....	118
3.	La caractérisation de l'échappement au traitement à l'AcM TA99.....	119
	RESULTATS PARTIE 2 :	123
	Combinaison thérapeutique de l'AcM TA99 avec un α -PD-1 et un α -CD73 au moment de l'échappement.....	123
A.	Introduction.....	124
B.	Résultats.....	127
1.	L'expression de CD73.....	127
2.	La combinaison avec l' α -CD73 retarde la croissance tumorale et améliore la survie.....	128
C.	Discussion et perspectives.....	129
	RESULTATS PARTIE 3 :	133
	Combinaison de l'AcM TA99 avec une chimiothérapie immunogénique (l'oxaliplatine).....	133
A.	Introduction.....	134

B. Résultats.....	136
1. Les effets de l'oxaliplatine sur la lignée B16F10.....	136
2. La combinaison induit un délai dans la croissance tumorale et la survie	137
3. La combinaison augmente la réponse humorale.....	138
4. La combinaison diminue l'expression de PD-1, CD39 et Tim-3 dans l'infiltrat tumoral.....	140
5. La combinaison altère la fonctionnalité des LT CD4 et CD8 dans la tumeur.....	140
C. Discussion et perspectives.	141
Matériel et méthodes.....	153
Productions scientifiques parallèles à la réalisation du doctorat.	159
Bibliographie.	200

Liste des abréviations

5-FU: **5-Fluorouracil**

Ac: **Anticorps**

AcM: **Anticorps monoclonal/monoclonaux**

ADCC: **Antibody-dependent cell cytotoxicity**

ADCP: **Antibody-dependent cellular phagocytosis**

ADN: **Acide désoxyribonucléique**

Ado: **Adénosine**

Ag(s): **Antigène(s)**

AKT: *Protein kinase B*

AMP: **Adenosine monophosphate**

APCP: **Adenosine 5'-(α,β -methylene) diphosphate**

APEC: **Association pour l'emploi des cadres**

AR/A2AR: *Adenosine receptor*

ATP: **Adenosine triphosphate**

BCG: **Bacillus Calmette-Guérin**

Bcl-xl: *B cell lymphoma-extra large*

BiTEs: *Bispecific T-cell Engager*

BRAF: *V-raf murine sarcomaviral oncogene homolog B1*

CAF(s): **Cancer-associated fibroblast(s)**

CAR: *Chimeric antigen receptors*

CBS2: **Sciences chimiques et biologiques pour la santé**

CCR: **Cancer Colorectal**

CD: *Cluster of differentiation*

CDC: *Complement-dependent cytotoxicity*

CDK4: *Cyclin-dependent kinase 4*

CMH: **Complexe majeur d'histocompatibilité**

CPA: **Cellule présentatrice d'antigènes**

CTL: *Cytotoxicity T lymphocytes*

CTLA-4: *Cytotoxique-T-lymphocyte-associated protein 4*

CXCL: *C-X-C motif chemokine*

CyTOF®: *Cytometer time-of-flight mass spectrometer*

DAMPs: **Damaged-associated molecular pattern**

DC: **Dendritic cell**

ED: **Ecole doctorale**

EGF: **Epidermal growth factor**

EGFR: **Epidermal growth factor receptor**

ELISA: **Enzyme-linked immunosorbent assay**

EMA: **European medicines agency**

ERK: **Extracellular signal-regulated kinases**

Fab: **Fragment antigen-binding**

Fas: **First apoptosis signal**

FasL: **Fas ligand**

Fc: **Fragment crystallizable**

Fc γ R: **Fc gamma receptor**

FDA: **Food and drug administration**

FGF: **Fibroblast growth factor**

FGFR: **Fibroblast growth factor receptor**

FLICE: **FADD [Fas-associated death domain]-like IL-1 β -converting enzyme)**

FLIP: **Cellular FLICE-inhibitory protein**

FoxP3: **Forkhead box P3**

GM-CSF: **Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor**

gp100: **glycoprotein 100**

gp75: **Glycoprotein 75**

GSO: **Cancéropôle grand sud-ouest**

HER2/ErbB2: **Human epidermal growth factor receptor-2**

HIF-1 α : **Hypoxia inducible factor 1 alpha**

HLA: **Human leucocyte antigen**

HMGB1: **High-mobility-group box 1**

HPV: **Human Papillomavirus**

IC: **Isotype control**

ICD: **Immunologic cell death**

ICMs: **International cancer microenvironment society**

IDO: **Indoleamine 2, 3-dioxygenase**

IFN: **Interferon**

IFN- γ : **interferon gamma**

Ig: **Immunoglobuline**

IHC: *Immunochimistry*

IL: **Interleukine**

iNOS: *Inductible nitric oxide synthase*

IP: *Intraperitoneal*

IRCM: **Institut de recherche en cancérologie de Montpellier**

ITIM: *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*

IV: *Intravenous*

JET: **Journée des étudiants en thèse**

KIR: *Killer-cell immunoglobuline-like*

KIR2DL: *Killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL*

KO: *Knock-out*

LAG-3: *Lymphocyte-activation gene 3*

LMC: **Leucémie myéloïde chronique**

LT: **Lymphocyte T**

M1/2: **Macrophage de type 1 ou 2**

MAGE-1: *Melanoma-associated antigen 1*

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

MART-1: *Melanoma-associated antigen recognized by T cells 1*

MCA: **Méthylcholanthrène**

MDSC: *Myeloid-derived suppressor cells*

MEC: **Matrice extracellulaire**

MEK: *MAPK/ERK Kinase*

MET: **Microenvironnement tumoral**

MITs: *Macrophages infiltrating tumor*

NK: *Natural Killer*

NKT: *Natural killer T*

NO: *Nitric oxide*

NSCLC: *Non-small cell lung cancer*

NSG: **NOD-scid IL2Rgamma^{null}**

OMS: **Organisation mondiale de la santé**

Oxa: **Oxaliplatine**

PBMC: *Peripheral blood mononuclear cells*

PBS: *Phosphate buffered saline solution*

PD-1: *Programmed cell death 1*

PD-L1/2: *Programmed cell death ligand 1 or 2*

PEGHP20: *Pegylated hyaluronidase*

PGE1/2: *Prostaglandine E1 ou E2*

PI: *Iodure de propidium*

PI3K: *Phosphatidylinositol 3-kinase*

RAF: *Rapidly accelerated fibrosarcoma*

Rag: *Recombination activating gene*

ROR: *RAR-related orphan receptor*

ROS: *Reactive oxygen species*

SC: *Subcutaneous*

SCID: *Severe combined immunodeficiency disorders*

SI: *Système immunitaire*

SILAB: *Shopping innovation Lab*

SPECT-CT: *Single photon emission computed tomography*

TAM: *Tumor-associated macrophage*

TCR: *T cell receptor*

TCR: *T cell receptor*

Th T: *Lymphocyte T helper*

TIL(s): *Tumor-infiltrating lymphocyte(s)*

Tim-3: *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*

TNF: *Tumor necrosis factor*

T_{reg}: *Lymphocyte T régulateur*

TRP-2: *Tyrosinase related protein-2*

TYRP-1/TRP-1: *Tyrosinase-related protein 1*

Tγδ: *Lymphocytes T gamma delta*

UFR: *Unité de formation de recherche*

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR: *Vascular endothelial growth factor receptor*

WT: *Wild type*

Liste des figures

Figure 1 La tumeur : un tissu complexe adapté de (D. Hanahan et Weinberg 2000).	20
Figure 2 Les propriétés spécifiques à la cellule tumorale.....	24
Figure 3 Evolution historique des idées et des connaissances sur l'implication du SI en oncologie.....	31
Figure 4 La théorie des 3 E issue du concept d'immunoediting.....	35
Figure 5 Mécanisme d'élimination de la tumeur (D. S. Chen et Mellman 2013).	36
Figure 6 La phase d'équilibre.....	38
Figure 7 Les mécanismes d'échappement mis en place par la cellule tumorale.	41
Figure 8 Le développement de mécanismes immunosuppresseurs.....	42
Figure 9 Voie de l'adénosine impliquant les ectonucleotidases CD39 et CD73. (Inspiré de Zhang 2010).....	44
Figure 10 L'axe CTLA-4/CD80-CD86.	47
Figure 11 L'axe PD-1/PD-L1.....	49
Figure 12 Représentation des principaux points de contrôles immunitaires (adapté de Pardoll 2012).....	52
Figure 13 L'ICD induite par les chimiothérapies et les radiothérapies (adapté de Kroemer et al. 2013).	57
Figure 14 Les effets indirects d'un traitement par radiothérapie (Van Limbergen et al.).....	59
Figure 15 Schéma de la voie RAS/BRAF/MEK/ERK.....	61
Figure 16 Le transfert de cellules T.....	64
Figure 17 Schématisation des différentes stratégies d'immunothérapies.	65
Figure 18 Structure schématique d'un Ac.	69
Figure 19 Indication thérapeutique des Ac commercialisés en France, Mars 2016.	71
Figure 20 Les effets immunomodulateurs des AcM (adapté Michaud et al. 2014).	73
Figure 21 Les mécanismes des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires.....	76

Figure 22 Représentation de l'augmentation des essais de combinaisons thérapeutiques associant un α -PD-1 ou α -PD-L1 à d'autres thérapies anti-cancéreuses.	80
Figure 23 L'AcM TA99 cible la protéine TYRP-1/gp75 in vivo.	92
Figure 24 Protocole de traitement.	92
Figure 25 Schéma de la mélanogenèse.	94
Figure 26 L'AcM ralentit la croissance tumorale et prolonge la survie in vivo.	95
Figure 27 Expression de CD73 dans les populations immunitaires de souris porteuses de tumeurs de mélanome B16F10.	126
Figure 28 Les effets in vivo de la combinaison de l'AcM TA99 + α -PD-1 + α -CD73.	128
Figure 29 Etude des effets de l'oxaliplatine sur la lignée B16F10.	135
Figure 30 La combinaison avec l'oxaliplatine ralentit la croissance tumorale et améliore transitoirement la survie.	137
Figure 31 L'oxaliplatine associée à l'AcM TA99 potentialise la réponse humorale.	138
Figure 32 La combinaison de l'AcM TA99 et de l'oxaliplatine diminue le pourcentage de T CD4 et T CD8 exprimant CD39, PD-1 et Tim-3 dans la tumeur.	139
Figure 33 Diminution de l'immunogénicité et des fonctions effectrices des lymphocytes T CD4 et T CD8 dans les souris traitées avec la combinaison TA99 et oxaliplatine.	141

Liste des tableaux

Tableau 1 Les cellules immunitaires du microenvironnement et leur rôle dans la progression tumorale.	29
Tableau 2 Les différentes classes d'agents chimio-thérapeutiques.....	56
Tableau 3 Les molécules induisant une ICD.	58
Tableau 4 Les thérapies ciblées acceptées par la FDA.....	63
Tableau 5 Les classes d'AcM ciblant la cellule tumorale.	72
Tableau 6 Essais cliniques d'inhibiteurs de points de contrôles immunitaires en association avec la radiothérapie.	81
Tableau 7 Essais cliniques terminés et en cours évaluant la chimiothérapie en association avec des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires.	83
Tableau 8 Essais cliniques du blocage des points de contrôles immunitaires associés à d'autres stratégies immunomodulatrices du mélanome.	86
Tableau 9 Essais cliniques terminés et en cours évaluant la combinaison des molécules inhibitrices et d'inhibiteurs de points de contrôles immunitaires.	86

Introduction.

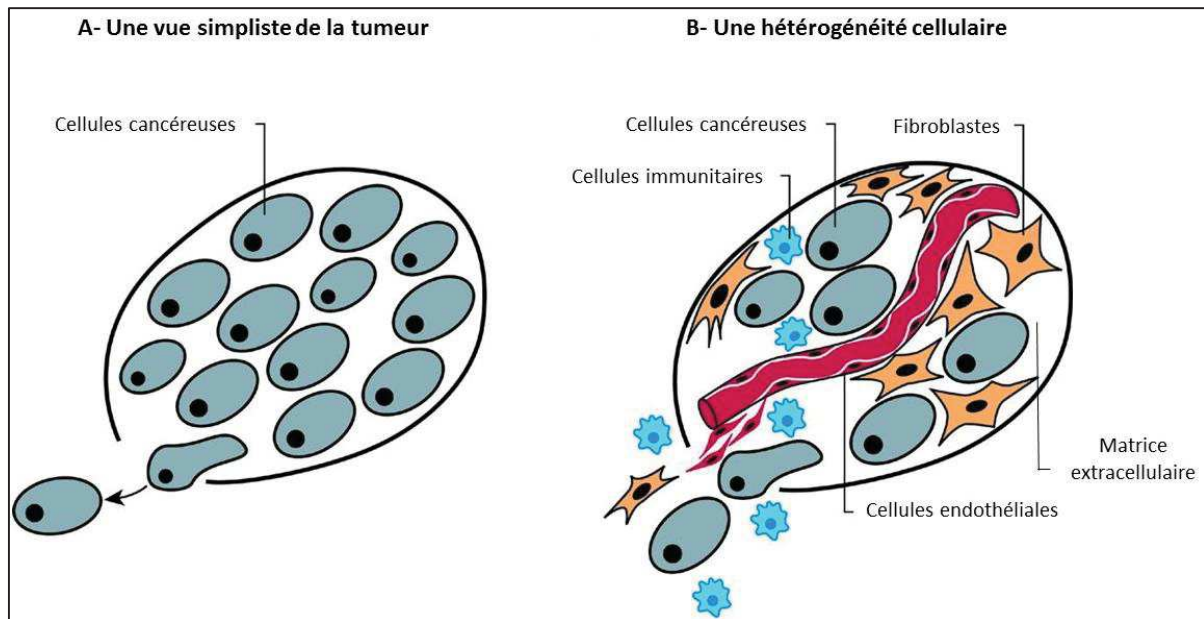


Figure 1 La tumeur : un tissu complexe adapté de (D. Hanahan et Weinberg 2000).

(A) La tumeur a longtemps été considérée comme une masse tissulaire homogène de clones tumoraux. (B) Il est désormais admis qu'il s'agit d'un pseudo organe complexe. Ce microenvironnement est composé de différents types cellulaires qui interagissent ensemble de façon dynamique tout au long de la croissance tumorale. La tumeur est bien sûr composée de cellules tumorales mais aussi d'une matrice extracellulaire, de fibroblastes associés au cancer (CAF), de cellules endothéliales et de cellules immunitaires qui forment le microenvironnement tumoral (MET).

A. Le microenvironnement tumoral.

1. Historique.

Le cancer est le résultat d'un processus cellulaire appelé oncogenèse, qui conduit à la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse. Le processus de transformation dépend de facteurs endogènes comme la prédisposition génétique et/ou exogènes comme les facteurs environnementaux (tabac, radiations, ultraviolets, virus ...). Les mutations du génome (translocations, délétions...) entraînent la perte ou le gain de certaines fonctions de la cellule favorisant l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, des systèmes de réparation de l'ADN, de l'apoptose ou bien stimulant l'activation d'oncogènes et l'acquisition du caractère d'immortalité (Vogelstein B trends genet 1993). De cette façon, durant l'oncogenèse, les cellules tumorales acquièrent des propriétés anormales de prolifération, de migration et d'invasion. Elles deviennent aussi plus résistantes à la mort cellulaire et adaptent leur métabolisme pour pouvoir échapper aux régulations des signaux de prolifération. Au début du XX^{ème} siècle et grâce à l'évolution des connaissances en biologie cellulaire et moléculaire ainsi qu'au développement des technologies de laboratoire, la vision simpliste d'une masse tissulaire homogène constituée de cellules tumorales identiques les unes aux autres a évoluée (**Figure 1**). Il devient alors clair que chaque cellule tumorale a des capacités mutationnelles qui lui sont propres, à l'origine d'une évolution continue et d'une grande hétérogénéité au sein d'une même tumeur (Nowell, 1976). La découverte des Ags spécifiques de la cellule tumorale au début des années 90 est venue asseoir cette théorie (Bruggen et al. 1991). Par la suite, la notion de tumeur s'est encore complexifiée. Le concept de microenvironnement tumoral, introduit par la théorie graine-sol (seed and soil) proposée par le chirurgien anglais, Stephen Paget, suggère l'importance du microenvironnement (le sol) dans lequel se trouve la cellule cancéreuse (la graine) (Paget, 1889). La masse tumorale est alors considérée comme un pseudo-organe au sein duquel le « tissu tumoral » interagit avec un ensemble de cellules saines (D. Hanahan et Weinberg 2000). L'évolution remarquable des connaissances dans les 10 années qui vont suivre a permis de dessiner une cartographie plus

complète (**Figure 1**) des facteurs qui participent au développement d'une tumeur (Douglas Hanahan et Weinberg 2011). Les cellules tumorales se développent dans un contexte d'inflammation chronique, et évoluent, selon une théorie Darwinienne de pression sélective permanente, qui contrôle les propriétés de prolifération, de migration et d'invasion.

Dès lors, la compréhension du rôle des différents acteurs du microenvironnement tumoral ainsi que des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'évolution d'une tumeur au sein de ce microenvironnement devient un enjeu majeur de la recherche en oncologie, avec pour objectif de développer des approches thérapeutiques efficaces et durables.

2. La composition du microenvironnement tumoral.

Le microenvironnement tumoral (MET) est constitué d'une composante moléculaire comprenant la matrice extracellulaire, et d'une composante cellulaire variée et hétérogène (Swartz et al. 2012). Outre le comportement anormal des cellules tumorales, les cellules non-tumorales avoisinantes subissent des modifications structurales et fonctionnelles. L'ensemble de ces acteurs cellulaires évoluent de façon dynamique, interagissent entre eux et avec les molécules qu'ils sécrètent ou qu'ils expriment (cytokines, chimiokines, petites molécules, facteurs de croissances, protéines membranaires...). L'ensemble de ces acteurs du MET sont autant de cibles potentielles à exploiter dans les stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses.

a. La composante moléculaire : la matrice extracellulaire.

La matrice extracellulaire (MEC), est un réseau tridimensionnel de macromolécules, présent dans tous les tissus de façon constitutionnelle. Elle est composée de protéines, de glycoprotéines (fibronectine, laminine), de glycosaminoglycanes et de fibres de collagène et d'élastine. Physiologiquement, le remodelage constant et dynamique, contrôlé par un équilibre délicat entre synthèse et dégradation des composants de la MEC, joue un rôle essentiel dans l'intégrité tissulaire et la régulation des fonctions cellulaires. Dans un contexte pathologique, tel que le développement d'une tumeur, la MEC subit une réorganisation biochimique et biomécanique. Ces réarrangements physiques peuvent réguler l'infiltration des cellules

immunitaires au sein de la tumeur ou bien faciliter la migration des cellules tumorales et les mécanismes de métastases (Malik, Lelkes, et Cukierman 2015). Ainsi il apparaît évident que la MEC puisse être la cible de traitements thérapeutiques notamment en association à d'autres thérapies usuelles. En effet, un essai clinique de phase II HALO202 (NCT 01839487) combinant le PEGHP20 (pegylated hyaluronidase), une molécule dégradant l'acide hyaluronique qui compose la MEC, avec une chimiothérapie de type paclitaxel et/ou gemcitabine dans le cancer pancréatique de stade IV a rapporté des résultats encourageants. Cette étude montre une augmentation significative de la survie sans progression par rapport aux chimiothérapies seules (Hingorani et al. 2018) soulignant l'intérêt cibler la MEC dans les combinaisons thérapeutiques.

b. La composante cellulaire.

i. Les cellules tumorales.

Au cours de la tumorigenèse, les cellules tumorales acquièrent de nouvelles caractéristiques phénotypiques. Des modifications génétiques (insertion, délétion, substitution) peuvent survenir lors d'une défaillance des systèmes de réparation du génome suite entre autre à l'exposition à des facteurs de risques (le tabac, l'exposition au soleil ou à des radiations...). Des changements phénotypiques peuvent être occasionnés par des agents pathogènes lors d'infection chronique par des virus (HPV : papillomavirus Humain, impliqué dans le cancer du col de l'utérus, cancer tête et cou ...), des bactéries (*Helicobacter pylori*, impliquée dans le développement de cancers gastriques) ou des parasites (bilharziose, impliqué dans les cancers de la vessie) (Guillebon et Tartour 2015). Ces modifications peuvent être à l'origine d'une modification de l'expression d'antigènes (Ags) ou encore de l'expression d'Ags spécifiques (néo-antigènes) par la cellule tumorale. C'est dans un modèle de mélanome que les premiers Ags tumoraux tels que MAGE-1 puis la tyrosinase, TRP-2, GP-100, ou encore MART-1 ont été découverts (Bruggen et al. 1991; Brichard et al. 1993; P. P. Lee et al. 1999).

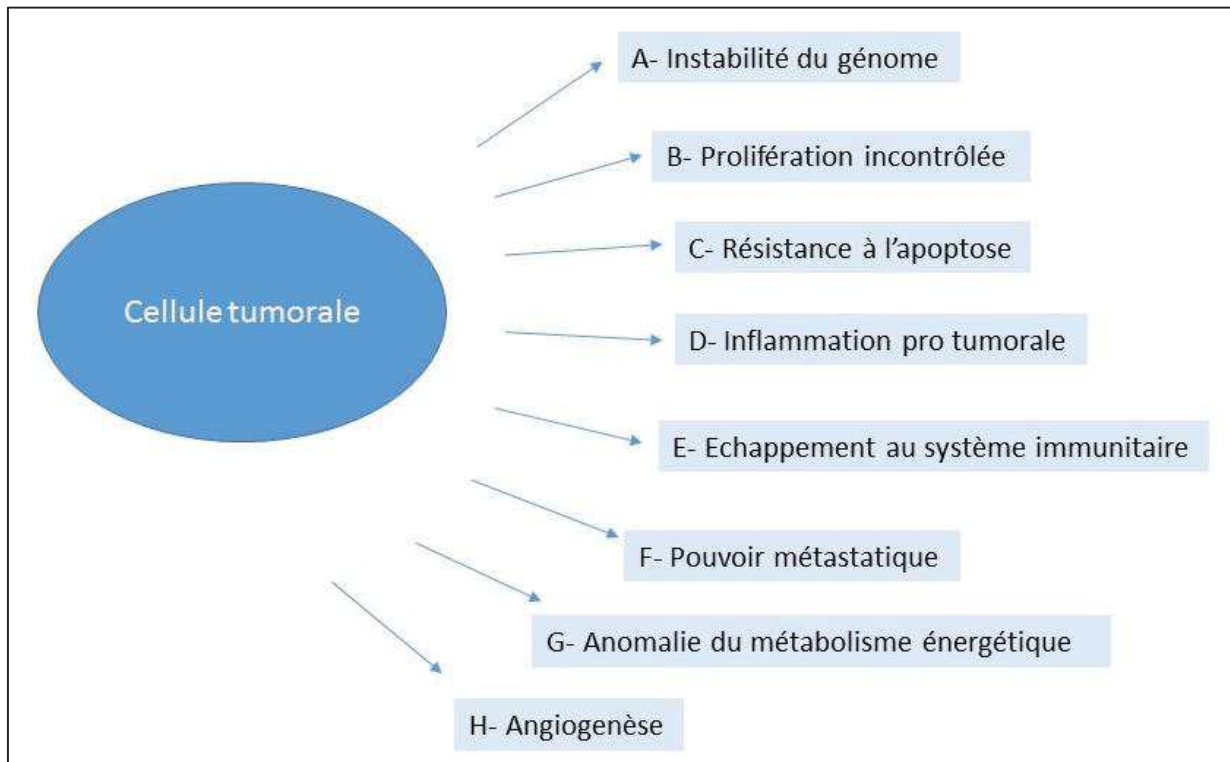


Figure 2 Les propriétés spécifiques à la cellule tumorale.

Les cellules tumorales acquièrent lors de l'oncogenèse des propriétés favorisant leur développement par le biais de diverses stratégies illustrées dans ce schéma.

Ces Ags tumoraux sont surexprimés spécifiquement par les cellules tumorales ce qui en fait des cibles de choix pour déclencher une réponse immune spécifique (Yarchoan et al. 2017). Ces modifications phénotypiques se traduisent également par de nombreuses fonctions ou propriétés des cellules tumorales, résumées dans la **Figure 2 A** (Zimmerman et al. 2017; Satoshi et al. 2018).

Les cellules tumorales sont capables de proliférer de façon anarchique et incontrôlée suite à l'activation des télomérases mais aussi en échappant aux signaux inhibiteurs antiprolifératifs (Shay et al. 2001; D. Hanahan et Weinberg 2000) (**Figure 2 B**). Elles résistent à la mort cellulaire via des protéines régulatrices inhibitrices, tels que Bcl-2 et Bcl-xl, agissant en grande partie en se liant à deux protéines déclenchant l'apoptose (Bax et Bak) (Adams et Cory 2007) (**Figure 2 C**). Les cellules tumorales ont aussi la capacité de promouvoir l'inflammation dans le microenvironnement tumoral via la production de cytokines pro-inflammatoires (**Figure 2 D**). Elles peuvent ainsi moduler la réponse immunitaire en faveur du développement de la tumeur comme nous le verrons en détail dans la suite de cette introduction (Coussens et Werb 2002; Cavallo et al. 2011) (**Figure 2 E**). La capacité des cellules tumorales à envahir les tissus environnants de par leur grande mobilité (**Figure 2 F**), passe par la perturbation des mécanismes d'adhésion. Par exemple, les cellules tumorales d'origine épithéliale peuvent subir une transition épithélio-mésenchymateuse leur permettant d'acquérir un phénotype métastatique (Micalizzi, Farabaugh, et Ford 2010). D'autre part le métabolisme des cellules tumorales est différent. Contrairement aux cellules normales qui dégradent le glucose en présence d'oxygène pour leur activité, les cellules tumorales utilisent la glycolyse aérobie (**Figure 2 G**) en métabolisant préférentiellement le glucose en lactate, indépendamment de la disponibilité en oxygène (effet Warburg) (Puyraimond-Zemmour et Vignot 2013). Les cellules tumorales sont également capables de promouvoir l'angiogenèse (**Figure 2 H**) afin de générer une irrigation suffisante pour apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires au développement de la tumeur (D. Ribatti, Crivellato, et Vacca 2012). La lymphangiogenèse peut aussi être médiée par les cellules tumorales et permet principalement le drainage des liquides depuis la zone tumorale en éliminant certains déchets et métabolites (Ji 2014). Ces réseaux

de capillaires sanguins et lymphatiques offrent aux cellules tumorales de nouvelles voies de communication avec l'ensemble de l'organisme de l'hôte et participent ainsi aux mécanismes de prolifération et d'invasion.

ii. Les fibroblastes associés aux cancers (CAF).

Les fibroblastes participent au processus de réparation tissulaire, à l'inflammation et contribuent à la formation de la MEC (Tomasek et al. 2002). Les CAF sont des fibroblastes détournés des tissus alentours par les cellules tumorales. Ils présentent un phénotype et des fonctions différentes des fibroblastes « normaux » (Tao et al. 2017). Au sein de la tumeur, ils prolifèrent de façon plus rapide et présentent une motilité accrue. Les CAF, principale source de VEGF et de galectine-1, participent également aux mécanismes d'angiogenèse et de lymphangiogenèse (Shibuya et Claesson-Welsh 2006; Gomes et al. 2013; D. Tang et al. 2016). Ils sont aussi associés aux mécanismes de métastases. A l'aide d'un remodelage de la MEC par les protéases, les CAF créent des « traces » dans la MEC, caractérisées par des faisceaux de collagène épais sur les bords et une absence de matrice en leur centre, que les cellules tumorales suivent favorisant ainsi l'évasion tumorale (Gaggioli et al. 2007). La détection de CAF lors du diagnostic des cancers du poumon, de la tête et du cou, est ainsi associée à un pronostic défavorable (Albregues, Meneguzzi, et Gaggioli 2014). Les CAFs sécrètent aussi des molécules incriminées dans le développement de résistances aux traitements telle que la neuréguline 1 (NRG1) (Kawakami et al. 2014), un facteur de croissance de la famille des protéines EGF liant les récepteurs HER3 et HER 4. La NRG1 contribue au développement et à la progression de différents types de tumeurs comme le cancer du sein, de la prostate et du pancréas (Qian et al. 2015; Kolb et al. 2007; Tsai et al. 2003) soulignant l'intérêt de bloquer cette cible. En effet, l'inhibition de la voie NRG1/HER3 inhibe la croissance tumorale dans un modèle préclinique de cancer pancréatique (Ogier et al. 2018). Les CAF ont par ailleurs, une signature pro-inflammatoire en sécrétant des cytokines et des chimiokines (IL-1- β , IL-6, CXCL1, CXCL3...) favorisant la croissance tumorale et le recrutement des macrophages, des neutrophiles et des lymphocytes (Wilson et al. 2012). Par exemple, la

production par les CAF de PGE2 peut moduler l'expression de FoxP3, un marqueur des lymphocytes T régulateurs (T_{reg}), et la fonction de ces cellules (Baratelli et al. 2005).

Les CAF semblent donc promouvoir le développement tumoral et interagir avec le système immunitaire (SI), soulignant leur intérêt en tant que cible thérapeutique. Des expériences précliniques consistant à inhiber leurs fonctions ou à diminuer leur nombre au sein de la tumeur ont été réalisées. Cependant, une étude utilisant un modèle d'adénocarcinome pancréatique murin a montré qu'une déplétion en CAF est corrélée à une réduction de la survie (Özdemir et al. 2014). Cet effet a été associé à une altération de l'organisation de la MEC (par inhibition de composants tel que le collagène de type I) et à une diminution de l'infiltrat immunitaire. Les auteurs soulignent cependant une augmentation de la fréquence des T_{reg} . Plutôt que de s'orienter vers une déplétion, reprogrammer les CAF en ciblant spécifiquement des molécules pro-tumorales qu'ils sécrètent (par exemple la galectine 1 ou NRG1), ou en favorisant des associations thérapeutiques avec des molécules ciblant d'autres acteurs du MET, représente des stratégies anti-cancéreuses intéressantes (Slany et al. 2015; Y. Xu et al. 2017).

iii. Les cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales prolifèrent, migrent et interagissent avec l'ensemble des cellules environnantes afin de participer à la formation et au maintien des réseaux vasculaire et lymphatiques qui régulent les échanges dans l'organisme (Tammela et Alitalo 2010). Lors du développement d'une tumeur, ces propriétés sont exploitées par les cellules tumorales afin de créer une vascularisation favorisant leur développement (Dimova, Popivanov, et Djonov 2014). Les vaisseaux sanguins sont composés de deux types de cellules. Les cellules endothéliales qui forment la paroi vasculaire interne, et les cellules péri-vasculaires, appelées péricytes, des cellules musculaires lisses, qui enveloppent la surface du tube vasculaire (Bergers et Song 2005). Les cellules endothéliales sont impliquées dans la croissance tumorale en raison de facteurs variés qu'elles sécrètent tels que l'EGF, l'œstrogène, le FGF, l'IL-8, les PGE1 et PGE2, le TNF- α et le VEGF. Ces facteurs peuvent favoriser leur motilité et la perméabilité vasculaire favorisant les métastases. Le ciblage des mécanismes de

l'angiogenèse est donc apparue comme une évidence dans de nombreux cancers. Dans le cancer colorectal métastatique, l'utilisation d'un anticorps monoclonal (AcM) anti-angiogénique (le Bevacizumab, Avastin®, α -VEGF), en association à une chimiothérapie cytotoxique (le 5-Fluorouracil (5-FU)) améliore la médiane de survie (plus de 24 mois) (Hurwitz et al. 2005; J. Robert 2016).

L'intérêt d'inhiber l'angiogenèse dans le cancer est de bloquer la formation de nouveaux vaisseaux sanguins afin de diminuer les apports en nutriments et oxygène à la tumeur. Cependant, les thérapies anti-angiogéniques utilisées en monothérapie n'ont pas démontré de résultats satisfaisants et nécessitent d'être utilisées en combinaison pour obtenir des effets. De façon intéressante, d'autres travaux ont montré que réduire la vascularisation diminue l'efficacité de certaines thérapies qui ne peuvent être délivrées à la tumeur que par voie sanguine (Fukumura et Jain 2008; Sia et al. 2014; Rajabi et Mousa 2017). Ainsi, de nombreuses stratégies thérapeutiques consisteraient désormais à promouvoir l'angiogenèse dans des stratégies de thérapies combinées pour favoriser l'accès des traitements au cœur de la tumeur (Rajabi et Mousa 2017).

iv. Les cellules immunitaires.

De par leur capacité d'infiltration et leur implication dans l'immunosurveillance, les cellules immunitaires sont des acteurs majeurs du microenvironnement tumoral. La texture immunitaire (type cellulaire, densité cellulaire, localisation dans la tumeur et orientation fonctionnelle de la réponse immunitaire) évolue tout au long de l'oncogenèse et représente une valeur pronostique et/ou diagnostique dans de nombreux cancers (Galon et al. 2006, s. d.). Les cellules impliquées dans l'immunité innée telles que les macrophages, les cellules NK et les polynucléaires, constituent une première barrière pour éliminer les cellules anormales dont les cellules tumorales. Au cours de la réponse immunitaire adaptative spécifique, les lymphocytes T CD4 et T CD8 vont participer à l'élimination tumorale et à la mise en place d'une réponse mémoire. L'infiltrat immunitaire va évoluer sous l'influence du développement

Type cellulaire	Population cellulaire	Activité	Principales caractéristiques
Macrophages	M1	anti-tumorale	Activation de la réponse immunitaire
	M2	pro-tumorale	Promotion de l'angiogenèse – Suppression des fonctions CTL – Recrutement des T _{reg}
Lymphocytes T	CTL	anti-tumorale	Elimination spécifique des cellules tumorales
	T _{reg}	pro-tumorale	Suppression des fonctions des CTL, DC, cellules NK et macrophages
	T $\gamma\delta$	anti-tumorale pro-tumorale	Activité cytotoxique et production d'IFN- γ Inhibition de l'activité des cellules CTL et NK – Promotion de l'angiogenèse
Lymphocytes B		anti-tumorale	Sécrétion d'anticorps anti-tumeur
	B _{reg}	pro-tumorale	Production IL-10 et TGF- β
DC		anti-tumorale	Traitement et présentation des Ags associés aux tumeurs
		pro-tumorale	Suppression des réponses immunitaires innées dépendantes de HMGB1
Cellules NK		anti-tumorale	Elimination spécifique des cellules tumorales par sécrétion de granules contenant de la perforine et de la granzyme B – Activation des DC
Cellules NKT		anti-tumorale	Production d'IFN- γ – Activation des cellules présentatrices d'Ags
		pro-tumorale	Production de cytokines favorisant le développement tumoral
MDSCs		pro-tumorale	Inhibition des fonctions effectrices des lymphocytes T et des cellules NK – Très présentes au dernier stade de progression tumorale – Promotion et maintien de l'angiogenèse

Tableau 1 Les cellules immunitaires du microenvironnement et leur rôle dans la progression tumorale (adapté de Schiavoni, Gabriele, et Mattei 2013).

Les cellules immunitaires peuvent être classées selon leurs propriétés anti-tumorales (les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques), ou leurs propriétés pro-tumorales (les Treg et les MDSCs). Cependant, certaines populations, comme les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules NKT, selon le contexte tumoral, peuvent modifier leur phénotype afin de favoriser ou d'inhiber la croissance tumorale. Les principales cellules impliquées dans la réponse immunitaire anti-tumorale et leurs propriétés sont résumées dans ce tableau.

de la tumeur et de son microenvironnement. Ainsi, des populations suppressives entrent aussi en jeu telles que les T_{reg} ou les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) impliqués dans l'inhibition de la réponse anti-tumorale. Ces mécanismes complexes (évolution des populations présentes au sein du MET, modification ou blocage de la réponse anti-tumorale) seront développés dans le chapitre suivant. L'ensemble des populations immunitaires anti- et pro-tumorales présentes dans l'infiltrat tumoral ainsi que leurs propriétés sont récapitulées dans le **Tableau 1**.

B. L'évolution du concept d'immunosurveillance.

En 1909, William B Coley et Paul Ehrlich observent que des patients atteints de sarcomes osseux présentent des régressions spontanées lorsqu'ils sont atteints d'érysipèles streptococciques. Lorsqu'ils expérimentent d'inoculer des lysats bactériens à des patients atteints de sarcomes osseux, ils observent des cas de régressions tumorales (Coley 1910). C'est la première démonstration de l'implication du système immunitaire (SI) dans une réponse anti-cancéreuse, indiquant que la réponse inflammatoire au site local est corrélée à une réponse secondaire anti-tumorale. Le manque de connaissances et les limitations techniques de l'époque n'ont pas permis d'investiguer davantage ces mécanismes.

1. La naissance d'un concept.

Ce n'est qu'en 1950, sur la base de ces observations, que Thomas et Burnett introduisent la théorie de l'immunosurveillance en définissant les lymphocytes T comme des cellules sentinelles capables de reconnaître les Ags tumoraux spécifiques et ainsi, d'éliminer les cellules tumorales (Burnet 1957) (**Figure 3**). Durant de nombreuses années, la théorie d'une immunosurveillance anti-tumorale reste controversée. En effet, des expérimentations démontrent que la croissance tumorale ne semble pas modifiée dans des modèles de souris Nude par rapport à des souris immunocompétentes (Stutman 1974, 1979). Rétrospectivement, il est admis que l'utilisation de souris Nude présentait un biais important. En effet, ces souris sont des modèles imparfaits de déficience immunitaire produisant parfois des quantités faibles

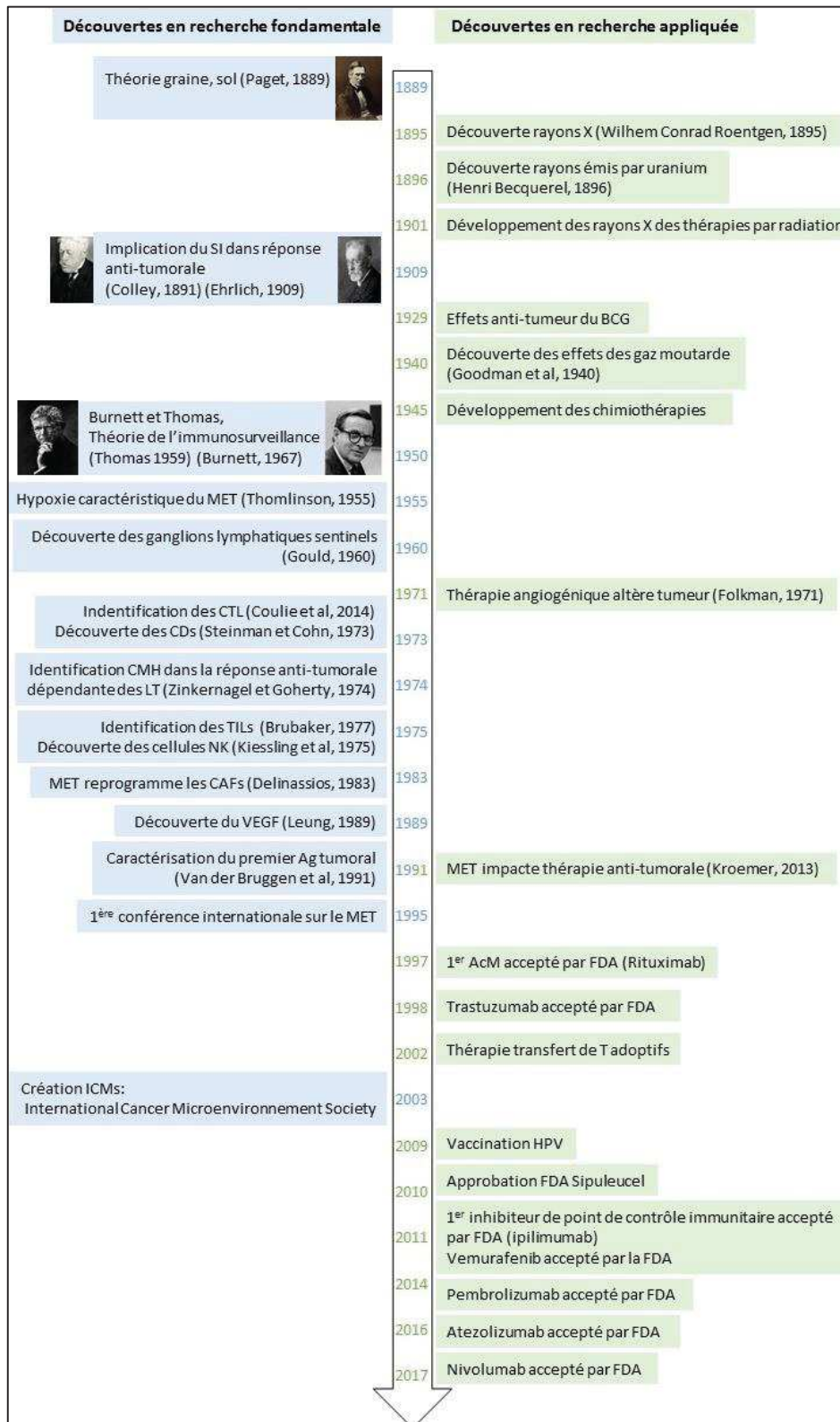


Figure 3 Evolution historique des idées et des connaissances sur l'implication du SI en cancérologie.

L'évolution des techniques et des connaissances fondamentales a permis d'asseoir définitivement le rôle de la réponse immunitaire dans l'élimination des tumeurs.

mais détectables de lymphocytes T et possédant des cellules NK et myéloïdes en quantité normale.

Les avancées technologiques du siècle dernier, une meilleure connaissance de la réponse immunitaire et la compréhension progressive du microenvironnement tumoral ont rendu possible l'étude du rôle du SI dans le développement des cancers (**Figure 3**). Ainsi, de nombreux arguments en faveur du concept participent à renforcer la théorie de l'immunosurveillance dans des modèles précliniques et cliniques.

a. Les observations précliniques.

Les travaux de Schreiber mettent en évidence pour la première fois le rôle de l'IFN- γ , une cytokine anti-tumorale, dans les mécanismes d'immunosurveillance. Comparé aux souris WT, les souris déficientes en IFN- γ développent plus rapidement et plus fréquemment des tumeurs induites par un carcinogène chimique, le méthylcholanthrène (MCA) (Kaplan et al. 1998).

Chez des souris exprimant peu de perforine, une protéine cytolytique sécrétée par les lymphocytes T CD8 et les cellules NK, la fréquence de certains cancers est augmentée soulignant l'implication de cette protéine et de ces cellules dans l'élimination de la tumeur (Smyth et al. 2000).

Par ailleurs, les souris RAG2^{-/-}, déficientes pour le gène RAG, une enzyme indispensable à la recombinaison des gènes d'immunoglobulines (Ig) et des récepteurs aux cellules T (TCR), est un modèle qui a été utilisé pour démontrer l'implication des lymphocytes T dans la réponse anti-tumorale (Shinkai et al. 1992). En effet, les cancers induits par le MCA se développent plus rapidement et avec une fréquence plus élevée chez les souris RAG2^{-/-} que chez les animaux WT démontrant le rôle crucial des lymphocytes T dans la protection anti-tumorale (Shankaran et al. 2001). De plus, le transfert de ces tumeurs dans des souris WT montre que 40% des souris rejettent les tumeurs greffées provenant des souris RAG2^{-/-}, alors que toutes celles provenant des souris WT se développent (Shankaran et al. 2001). Ces résultats suggèrent que les tumeurs qui se développent dans des souris immunocompétentes subissent

une pression immunitaire créant des clones tumoraux moins immunogéniques et plus agressifs pour résister à l'élimination par le SI. Une autre étude s'est intéressée aux souris immunocompétentes exposées au MCA qui ne développent pas de tumeurs. Quelques jours après le traitement avec un AcM déplaçant les lymphocytes T CD4 et T CD8, des tumeurs se développent soulignant l'implication de ces populations immunitaires dans le contrôle de la progression tumorale (Koebel et al. 2007).

Plus récemment, les phénomènes d'effets abscopaux (régressions de métastases non irradiées et éloignées du site primaire tumoral irradié), décrit page 60 (**Figure 14**), traduisent une mobilisation du SI dans les effets anti-tumoraux suite au traitement par radiothérapie. Une démonstration de cet effet a été apportée chez la souris dans un modèle de mélanome murin B16F0 irradiées de façon séquentielle (Lugade et al. 2005).

b. Les observations cliniques.

Les observations pré-cliniques soulignant le concept d'immunosurveillance des tumeurs, sont renforcées par des observations similaires chez les patients atteints de cancer. En effet, la fréquence des cancers chez des patients présentant des déficits immunitaires est supérieure et se manifeste plus précocement (Gatti et Good 1971; Hauck et al. 2018). De plus les patients transplantés, traités par immunosuppresseurs, ont une incidence plus élevée de cancers (Birkeland et al., s. d.; Penn 1995). De façon intéressante, une étude de 2003 de Mackie et al présente le cas de deux patients, ayant reçu une greffe rénale provenant de la même personne, qui ont développés dans les deux ans qui suivent la transplantation, un mélanome. Après des recherches approfondies sur l'origine de ce cancer, il s'avère que le donneur avait été traité pour un mélanome primaire 16 ans plus tôt et était considéré en rémission. Il semble que le donneur ait été en réalité dans une phase de contrôle de la pathologie et que les traitements immunosuppresseurs nécessaires à la transplantation aient favorisés le développement du mélanome chez les receveurs.

Inversement, il est démontré qu'un taux élevé de lymphocytes et de cellules NK infiltrant la tumeur est corrélé à une meilleure survie et un bon pronostic chez des patients atteints de cancers du côlon (Giannakis et al. 2016), de cancers du sein (Acerbi et al. 2015) et de mélanomes (Balatoni et al. 2018).

Soulignant l'importance de l'infiltrat immunitaire, Galon et al établissent un immunoscore corrélé au risque de récurrences des cancers colorectaux (Galon et al. 2006). Cet outil pronostique utilise une quantification, en périphérie et au centre de la tumeur, de la densité des cellules T cytotoxiques mémoires (CD8/CD45RO).

Enfin, comme dans les modèles murins, des patients traités en radiothérapie localement, présentent des cas de régression tumorale des lésions à distance du site de traitement suggérant l'implication du SI dans les effets cliniques de ces thérapies (Postow, Callahan, et Wolchok 2015). En effet, des patients atteints de mélanome, traités par l'ipilimumab et radiothérapie, présentent des modifications des populations immunitaires sur des sites métastatiques non irradiés (Postow et al. 2012).

L'ensemble de ces observations précliniques et cliniques démontrent l'implication du SI dans la réponse anti-tumorale primaire. L'étude approfondie de ces mécanismes a permis de définir plus précisément la contribution des différentes composantes du SI (**Figure 3**).

2. De l'immunosurveillance à l'immunoédition.

La pression sélective du SI génère des clones tumoraux résistants. Ces modifications de l'immunogénicité des cellules tumorales sont la conséquence d'une interaction continue avec les différents acteurs du SI et donne naissance au concept d'immunoediting (Dunn et al. 2002; Dunn, Old, et Schreiber 2004). Ce concept repose sur trois phases (nommées les 3 E) : Elimination, Equilibre et Echappement (**Figure 4**). La phase d'élimination fait intervenir à la fois l'immunité innée et adaptative pour éradiquer les cellules tumorales. Dans la grande majorité des cas, cette phase permet d'éliminer la totalité des cellules tumorales. Toutefois, si toutes les cellules tumorales ne sont pas éliminées et que des clones tumoraux survivent, une

phase d'équilibre dynamique s'engage. La pression immunitaire constante appliquée sur les cellules tumorales sans permettre l'élimination de celles-ci, empêche néanmoins le développement tumoral. Lors de cette phase, des variants tumoraux deviennent résistants et s'affranchissent de la pression immunitaire. Enfin, la phase d'échappement correspond à la phase terminale du processus de tumorigenèse. Les cellules tumorales échappent au contrôle, elles deviennent invisibles ou insensibles au SI. Il s'agit du stade de développement tumoral qui va aboutir à la détection clinique de la tumeur.

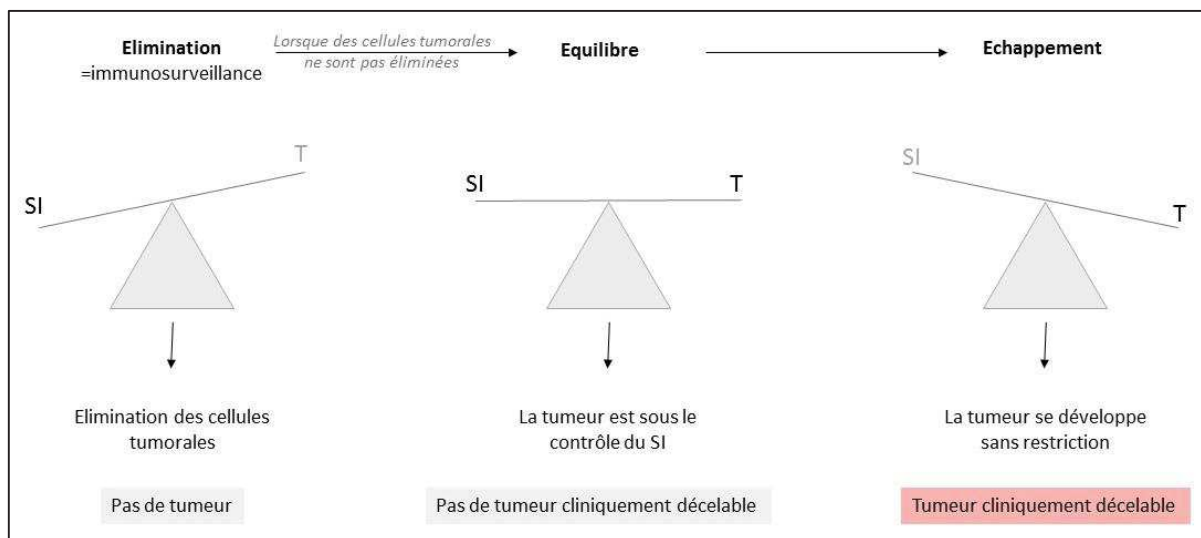


Figure 4 La théorie des 3 E issue du concept d'immunoediting.

La balance entre le SI et la tumeur (T) dans les 3 phases de l'immunoediting : Elimination, Equilibre, Echappement.

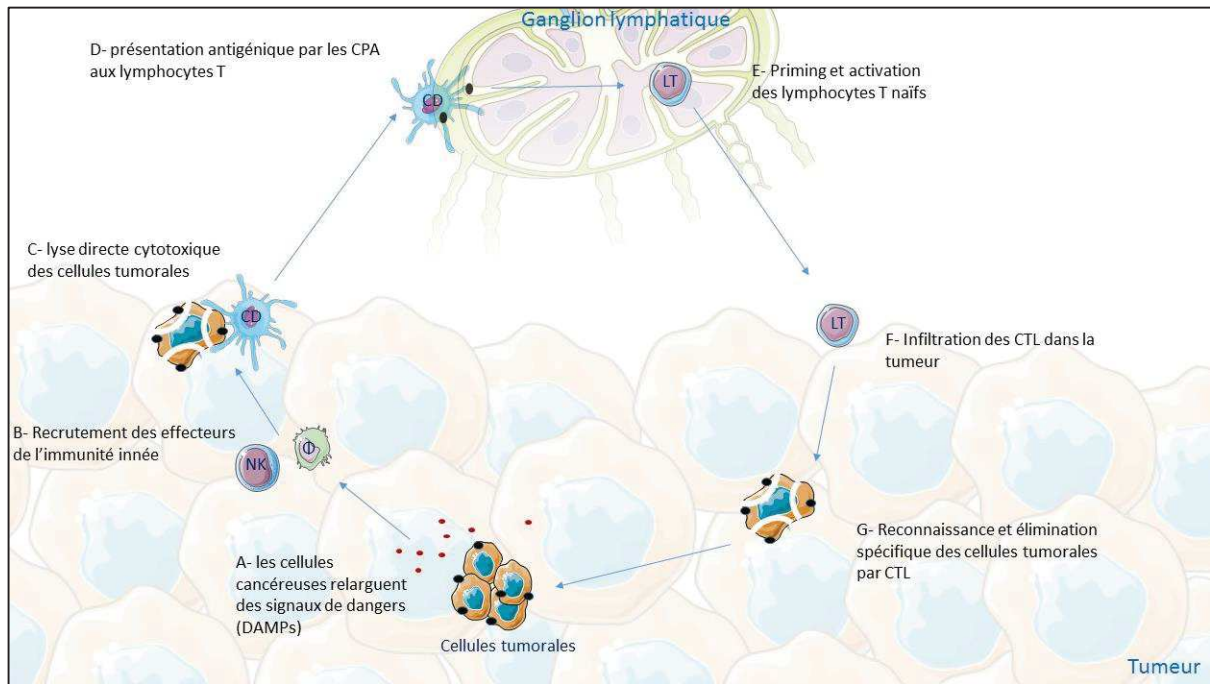


Figure 5 Mécanisme d'élimination de la tumeur (D. S. Chen et Mellman 2013).

CTL, lymphocytes T cytotoxiques ; CPA, cellules présentatrices d'Ag ; DAMPs, Damage Associated Molecular pattern ; Φ , macrophages.

L'élimination est une phase où à la fois l'immunité innée et adaptative vont intervenir pour détruire efficacement les cellules tumorales selon un ensemble d'étapes schématisées dans cette figure.

a. La phase d'élimination :

La phase d'élimination correspond au concept d'immunosurveillance. Elle met en jeu les mécanismes de l'immunité innée et adaptative. Les cellules tumorales relarguent des molécules de stress telles que des molécules pro-inflammatoires, des chimiokines et des molécules de dangers (DAMPs *Damage Associated Molecular Patterns*) (**Figure 5 A**). L'ensemble de ces signaux recrutent au sein de la tumeur les cellules NK, NKT, les cellules T $\gamma\delta$, les macrophages et les cellules dendritiques (DC) responsables de la première étape de l'élimination (Domenico Ribatti 2017; Sims et al. 2010) (**Figure 5 B**). L'élimination par les cellules NK, peut se faire par une réponse de type ADCC (*antibody dependant cellular cytotoxicity*) ou par l'activation de récepteurs responsables de la lyse cellulaire (Dunn, Old, et Schreiber 2004, 2004). Cette lyse va entraîner une boucle d'amplification positive de la réponse innée et permettre de générer une source d'AgS tumoraux associés aux débris cellulaires qui vont être endocytés par les DCs (**Figure 5 C**). Leur maturation, induite par les cellules NK (Gerosa et al. 2002), va permettre aux DCs de modifier leur morphologie (apparition de dendrites) et d'acquérir ainsi des propriétés de migration nécessaires pour activer les lymphocytes T naïfs dans les ganglions lymphatiques (Vesely et al. 2011) (**Figure 5 D et E**). Les lymphocytes T CD4 et T CD8 sont ensuite recrutés au sein de la tumeur, pour reconnaître et éliminer les cellules tumorales (**Figure 5 F**). La reconnaissance spécifique des cellules tumorales par les lymphocytes T (LT) permet l'activation de la réponse cytotoxique et inflammatoire des lymphocytes T conduisant à l'élimination des cellules tumorales (**Figure 5 G**). Cette phase a donc pour but d'éliminer toutes les cellules tumorales en mobilisant la réponse innée et adaptative. C'est aussi lors de cette phase que se développe la réponse mémoire permettant une réponse anti-tumorale plus rapide en cas de récurrence. Cependant, il arrive que certains clones tumoraux échappent à cette surveillance. La phase d'équilibre s'enclenche alors, caractérisée par une balance des mécanismes pro et anti-tumoraux.

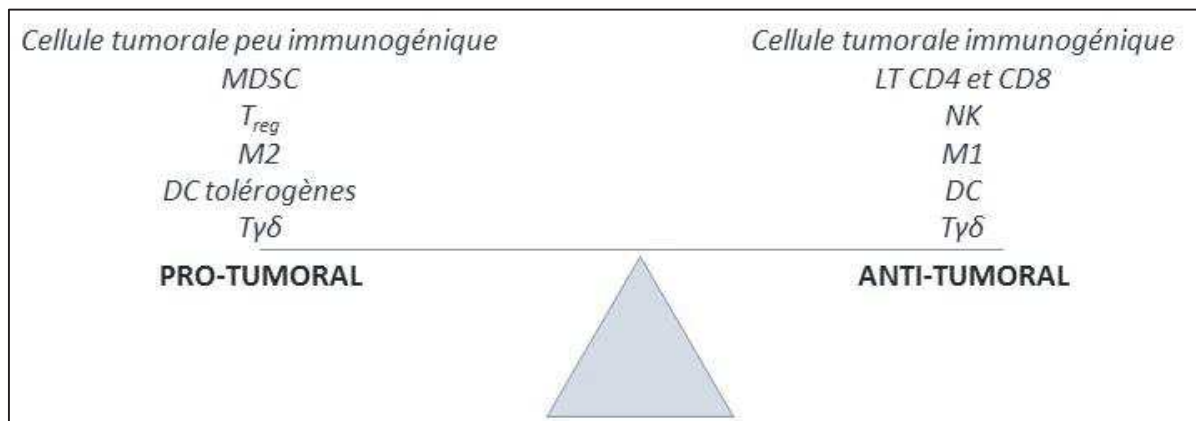


Figure 6 La phase d'équilibre.

La phase d'équilibre se caractérise par une balance entre les populations immunitaire pro- et anti-tumorales représentées sur cette figure.

b. La phase d'équilibre :

Durant la phase d'équilibre, qui est la plus longue des trois phases, la pression immunitaire constante appliquée sur les cellules tumorales contrôle le développement de la tumeur. Cependant, elle ne permet pas son élimination complète favorisant une instabilité génétique et l'émergence de variants tumoraux moins immunogéniques avec un phénotype résistant à l'élimination par le SI (Koebel et al. 2007; Swann et al. 2008).

La phase d'équilibre est l'étape au cours de laquelle les cellules du SI, en interaction avec les cellules tumorales mais aussi l'ensemble du MET, évoluent et leurs fonctions sont détournées au profit de la tumeur (**Tableau 1**). En effet, l'inflammation chronique facilite le recrutement des MDSC au sein de la tumeur (**Figure 6** et **Figure 8 B**), qui vont exprimer des facteurs immunosuppresseurs, favorisant l'inhibition des fonctions effectrices des lymphocytes T et des cellules NK (**Figure 8 H** et **G**) (Fujimura et al. 2012; Passarelli et al. 2017). Ces MDSC stimulent les fonctions des lymphocytes T_{reg} qui vont eux aussi inhiber l'activité des effecteurs de la réponse anti-tumorale. De plus, les DC, dans un contexte d'inflammation chronique, peuvent exprimer IDO, une enzyme impliquée dans la dégradation du tryptophane, et devenir tolérogènes favorisant le développement tumoral (**Figure 6** et **Figure 8 A**) (Bozec et al. 2014; Mellor et Munn 2004). Les macrophages associés à la tumeur (TAM) vont eux aussi sous la

pression du MET se transformer en modifiant leur phénotype et ainsi passer d'un type M1 à un type M2. Un environnement riche en IFN- γ , favorise un phénotype de type M1 anti-tumoral (**Figure 6**), alors qu'un milieu riche en IL-4, IL-10 et IL-13 favorise la perte du CMH et une diminution d'expression d'IL-12 caractéristique des macrophages de type M2, pro-tumoraux (Sica et al. 2006; Aris, Barrio, et Mordoh 2012) (**Figure 6**). Dans des échantillons cliniques de patients atteints de cancer colorectal, il a été démontré qu'une augmentation de l'infiltrat des macrophages avec un phénotype M1 au niveau de la tumeur est corrélé à un meilleur pronostic (Edin et al. 2012). Par ailleurs, le recrutement des macrophages de type M2 favorise l'invasion et la prolifération des cellules tumorales et est associé à un mauvais pronostic chez les patients atteints de mélanome (Sica et al. 2006).

De plus, d'autres mécanismes n'impliquant pas directement les effecteurs de l'immunité peuvent entrer en jeu dans cette phase d'équilibre. L'hypoxie générée par l'absence d'angiogenèse au sein de la tumeur altère le métabolisme du glucose. Associé à l'acidification du milieu, l'IFN- γ est dénaturé et on observe une diminution de la production de TNF (Kareva et Hahnfeldt 2013; Barsoum et al. 2014). Ces mécanismes favorisent la mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur.

Ainsi, la phase d'équilibre est caractérisée par une balance fragile entre acteurs pro et anti-tumoraux et peut rester stable de nombreux mois voire de nombreuses années (**Figure 6**). Lorsque cet équilibre est rompu, la phase d'échappement s'amorce en faveur du développement tumoral.

c. Mécanismes de l'échappement tumoral.

La phase d'échappement correspond donc au développement de la tumeur jusqu'à un stade cliniquement décelable. Les variants tumoraux développés sous la pression du SI de la phase précédente ont réussi à passer les barrières immunitaires. Ils modulent ainsi le microenvironnement en la faveur d'une prolifération des cellules tumorales. Les stratégies mise en œuvre dans la phase d'équilibre vont se renforcer et pérenniser la croissance tumorale.

i. Les modifications de la cellule tumorale.

Une première stratégie développée par les cellules tumorales pour diminuer leur immunogénicité est de modifier l'expression (perte ou diminution) d'Ags tumoraux (**Figure 7 A**). La cellule tumorale peut aussi modifier ou supprimer l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) qu'elle exprime, nécessaires à la présentation antigénique et à l'activation des cellules T (**Figure 7 B**). Ces modifications induisent ainsi une résistance à la lyse par les CTL (del Campo et al. 2012).

Une autre stratégie des cellules tumorales pour échapper au SI consiste à moduler les mécanismes de mort cellulaire en contournant par exemple l'expression d'une protéine cellulaire anti-apoptotique FLIP, un inhibiteur de caspases, surexprimée dans de nombreux cancers dont le mélanome (Tschopp, Irmler, et Thome 1998; Estlack et al. 2014; Zhao et al. 2017). Les cellules tumorales sont aussi capables de résister à la mort médiée par les lymphocytes T cytotoxiques en interférant avec la voie des caspases déclenchée par la production de perforine/granzyme B (**Figure 7 C**). En effet, Medema et al ont démontré que l'expression de l'inhibiteur de sérine protéase Spi-6 chez la souris et Pi-9 chez l'Humain, inactivant la granzyme B, est corrélée à une résistance aux fonctions des cellules T cytotoxiques (Medema et al. 2001). Par ailleurs, la cellule tumorale peut favoriser l'expression de molécules comme par exemple iNos qui inhibe les mécanismes d'apoptose médiés par Fas en régulant les niveaux d'expression de l'oxyde nitrique (Uotila 1996; Somasundaram et al. 2018). L'hypoxie ainsi générée stimule l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales entraînant une inhibition de l'activité des lymphocytes cytotoxiques dans un modèle de leucémie murin (Barsoum et al. 2014). De nombreuses autres molécules modulent les voies d'apoptose et peuvent être modifiées dans les cellules tumorales comme par exemple la régulation positive des membres de la famille des Bcl-2 qui régulent l'apoptose (Delbridge et Strasser 2015).

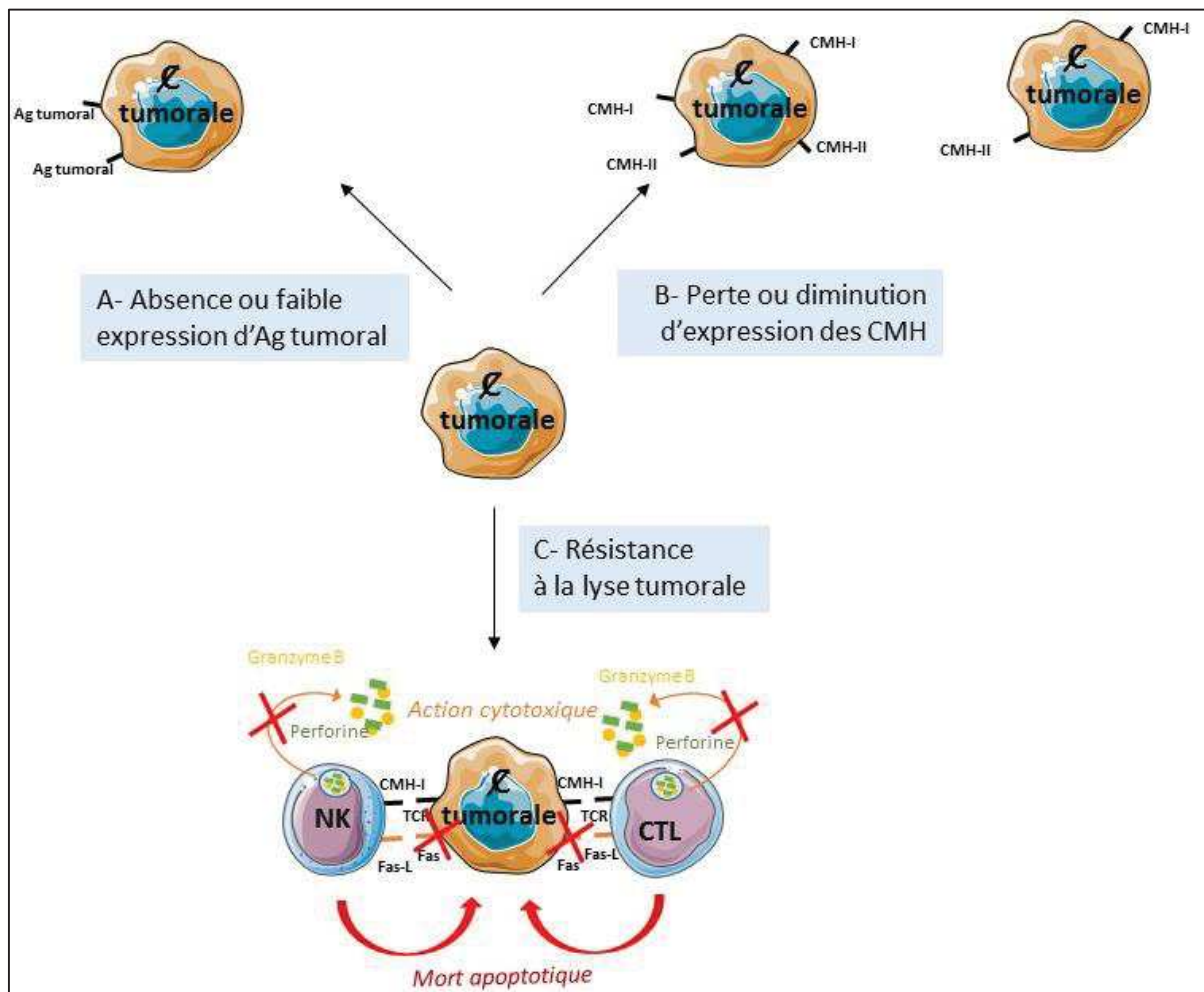


Figure 7 Les mécanismes d'échappement mis en place par la cellule tumorale.

La cellule développe des mécanismes pour échapper à la réponse immunitaire soit en altérant l'antigénicité, en modulant l'expression de ses Ags tumoraux (Ag tumoral) ou les molécules du CMH, soit en échappant à la lyse (inhibition de l'expression de Fas, empêchant l'interaction Fas/FasL, inhibition de la sécrétion de vésicule contenant granzyme B et perforine inhibant l'action cytotoxique).

Par ailleurs, FasL, une protéine transmembranaire appartenant à la superfamille du TNF et à la sous-famille des récepteurs de la mort, peut être régulée positivement à la surface des cellules tumorales. Lorsque FasL interagit avec le récepteur Fas sur les cellules T, il délivre des signaux de mort aux cellules T (Roth et Reed 2004; A. A. Wu et al. 2015).

ii. Développement de mécanismes immunosuppresseurs.

Des modifications de l'équilibre entre les facteurs pro-tumoraux et anti-tumoraux peuvent rendre le microenvironnement plus permissif au développement et à la propagation tumorale.

IDO (*indolamine 2,3-diocycgénase*), une enzyme immunorégulatrice qui catalyse la dégradation du tryptophane en kynurénine, peut être exprimée par les macrophages, les DCs et les cellules tumorales dans un contexte d'inflammation. L'activation des voies des kynurénines favorise

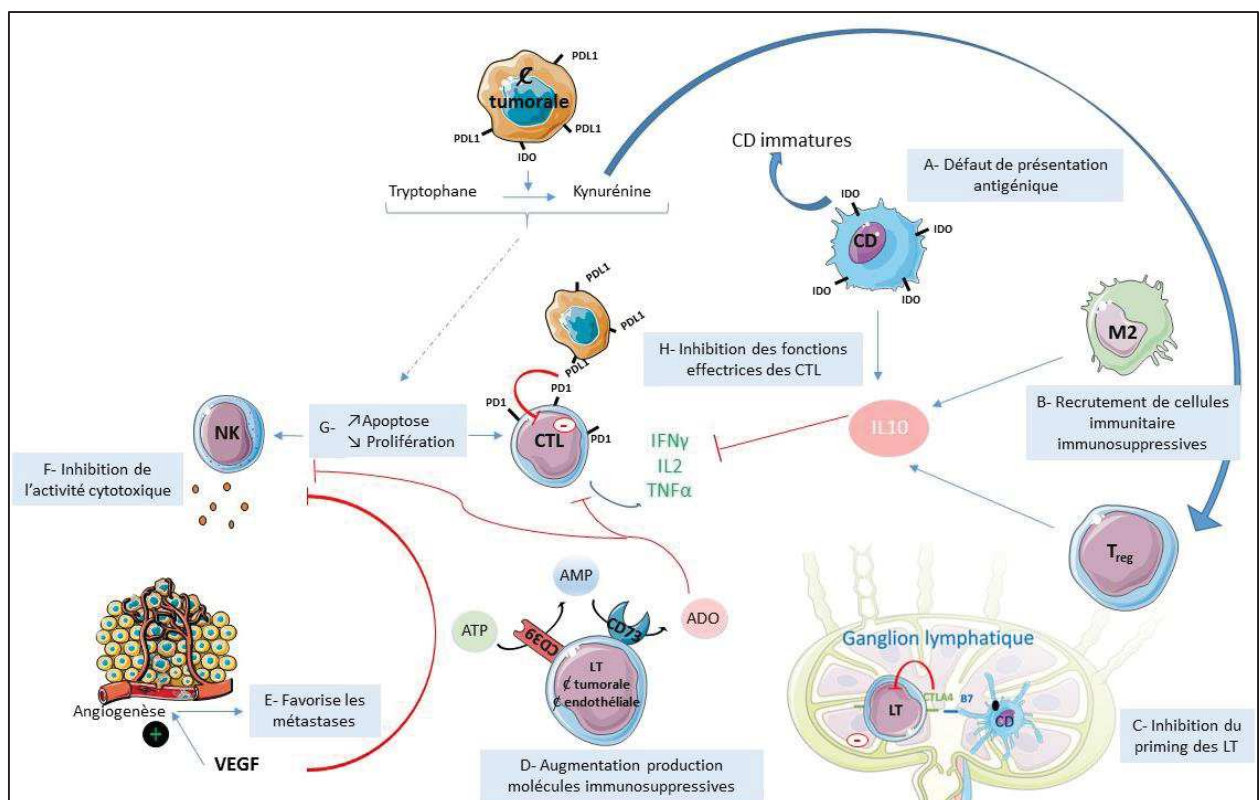


Figure 8 Le développement de mécanismes immunosuppresseurs.

Tout au long de la phase d'échappement se mettent en place des mécanismes immunosuppresseurs non redondants favorisant le développement tumoral.

les mécanismes tolérogènes des cellules immunitaires qui l'expriment, inhibe la prolifération de ces cellules, participe aux mécanismes d'apoptose des lymphocytes T et entraîne l'activation des T_{reg} (Hwu et al. 2000; Frumento et al. 2002; Dunn et al. 2002; Mondanelli et al. 2017; Munn et Mellor 2013) (**Figure 8 A**).

Le TGF- β est un autre exemple de molécule immunosuppressive, principalement exprimé par les cellules tumorales et les DCs tolérogènes exprimant IDO. Il permet d'inhiber l'expression d'ARNm de la voie perforine/granzyme B contrôlant la lyse par les cellules immunitaires cytotoxiques (Holtzhausen et al. 2015; Q. Li et al. 2016). Le TGF- β est aussi responsable de l'inhibition de prolifération des lymphocytes permettant d'augmenter la croissance tumorale et les mécanismes de métastase en stimulant l'angiogenèse (Akhurst et Derynck 2001).

Parmi les cytokines immunosuppressives, l'IL-10, une cytokine qui peut être sécrétée par les macrophages de type M2, les T_{reg}, les B_{reg} et les DCs tolérogènes (**Figure 8 B**). L'IL-10 inhibe les fonctions des effecteurs de l'immunité et diminue ainsi l'expression de cytokines anti-tumorales telles que l'IFN- γ , l'IL-12 et le TNF- α modifiant la balance cytokinique en faveur de la tumeur. Bloquer le récepteur de l'IL-10 augmente la réponse tumorale primaire dépendante des cellules T CD8 associée à une augmentation de l'infiltrat des DCs à la suite de chimiothérapies (paclitaxel et carboplatine) dans des modèles de cancers murins tel que le cancer du sein (Ruffell et Coussens 2015). De plus, l'injection intra-tumorale de shIL-10LVS inhibant l'expression d'IL-10, augmente l'activité des DCs soutenant la réponse anti-tumorale dans des modèles murins de cancers du côlon (Rossowska et al. 2018).

Le facteur de croissance des vaisseaux endothéliaux ou VEGF (vascular endothelial growth factor) est exploité par les cellules tumorales pour permettre l'angiogenèse au sein de la tumeur et faciliter la croissance et les mécanismes de métastases (**Figure 8 E**). Des concentrations élevées de VEGF sont associées à un mauvais pronostic dans les cancers humains tels que les cancers colorectaux, les cancers du pancréas ou les cancers du sein expliqué par un rôle immunosuppresseur inhibant la maturation des cellules dendritiques (Lissoni et al. 2001). Les effets immunomodulateurs de ce facteur comprennent aussi

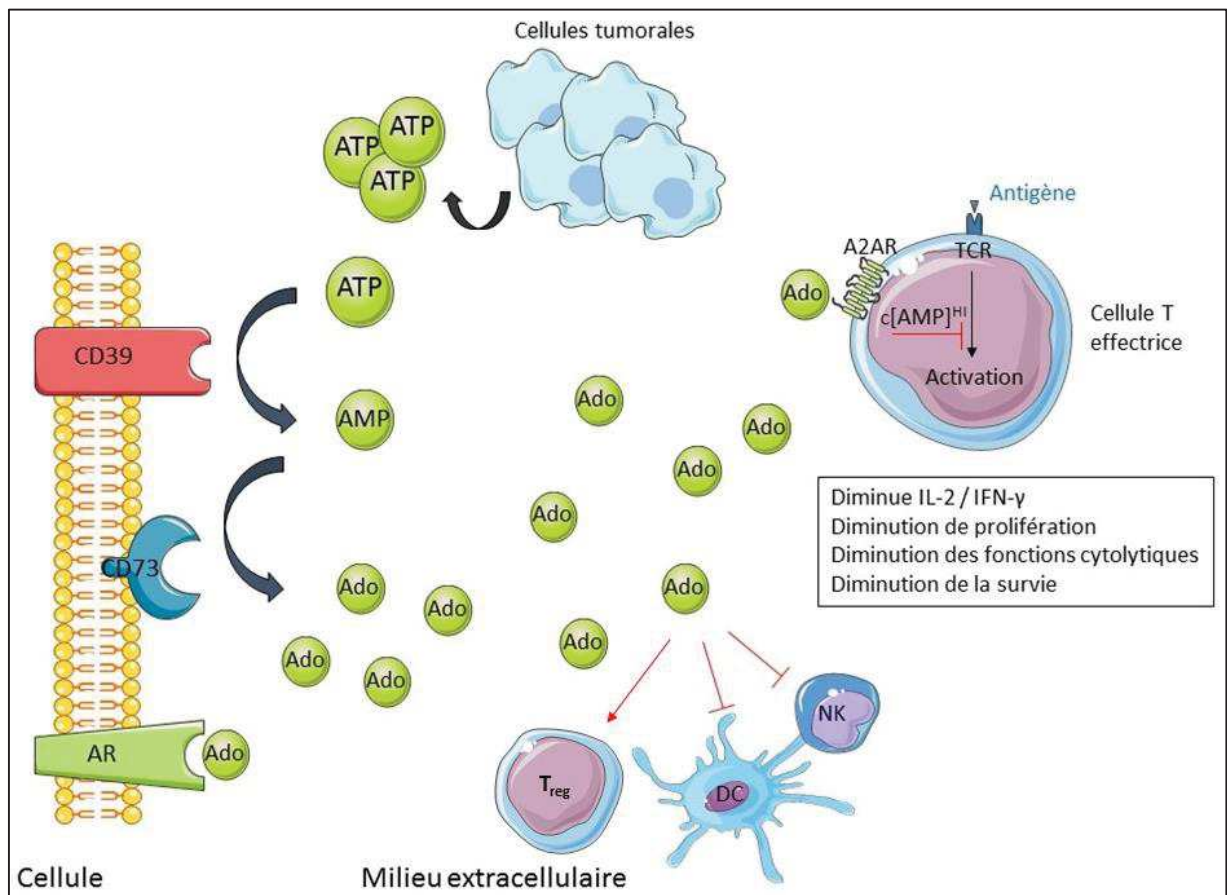


Figure 9 Voie de l'adénosine impliquant les ectonucleotidases CD39 et CD73. (Inspiré de Zhang 2010).

L'ATP extracellulaire, sécrété lors de la mort des cellules tumorales favorise le recrutement et l'activation de la réponse immunitaire anti-tumorale. L'hydrolyse de l'ATP en ADP par CD39, puis la dégradation de l'AMP en adénosine par CD73 (Beavis et al. 2013). L'adénosine est une molécule immunosuppressive nécessaire à la contraction de la réponse immunitaire pour prévenir l'inflammation et les dommages tissulaires (Eltzschig, Sitkovsky, et Robson 2012). Les récepteurs à l'adénosine sont impliqués dans des voies d'action non redondantes d'immunosuppression participants aux mécanismes d'inflammation (Bilzer et Gerbes 2002).

l'accumulation de cellules suppressives dérivées des myéloïdes et la promotion de l'épuisement des lymphocytes T (Lapeyre-Prost et al. 2017).

D'autres voies participent à ce fragile équilibre. La voie de production de l'adénosine utilise CD39 (*ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1* aussi nommé ENTPD1) pour hydrolyser l'ATP extracellulaire (molécule immuno-stimulatrice) en AMP, elle-même dégradée en adénosine (molécule immuno-suppressive) par CD73 (*ecto-5'-nucleotidase*) (Ohta et al. 2006) (**Figure 8 D** et **Figure 9**). Les ectonucleotidases CD39 et CD73 sont des molécules qui ont physiologiquement présentes à la surface des lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs), dans le stroma, les cellules endothéliales et sur les cellules tumorales (Jin et al. 2010; Schuler et al. 2014; Aliagas et al. 2014). Il n'est pas nécessaire que les deux enzymes soient exprimées sur le même type cellulaire pour produire de l'adénosine. Leur expression peut-être augmentée par des conditions hypoxiques et plusieurs médiateurs inflammatoires augmentant les taux d'adénosine extracellulaire (Antonioni et al. 2016). Ainsi, l'adénosine diminue les réponses inflammatoires et immunitaires en modulant l'amplitude des réponses physiologiques (Haskó et al. 2008; Monteiro et al. 2018). L'adénosine, via ses quatre récepteurs transmembranaires (A1, A2a, A2b et A3), favorise ainsi la fonction des cellules T régulatrices, diminue l'activité des cellules T auxiliaires 1, inhibe l'activation des macrophages M1, favorise la différenciation des macrophages M2 et oriente les cellules dendritiques vers un profil cytokinique anti-inflammatoires (Haskó et al. 2008; Ohta et Sitkovsky 2014). Cette molécule est également capable de stimuler la production de facteur de croissance endothélial par les cellules endothéliales et les macrophages, induisant une angiogenèse (Haskó et al. 2008).

Dans de nombreux cancers, dont le mélanome métastatique, l'expression de CD73 est augmentée et corrélée à un mauvais pronostic (Monteiro et al. 2018). Des phénomènes de résistance à certains cancers ont été caractérisés chez des souris KO pour CD39/CD73 (Bastid et al. 2015; Stagg et al. 2011, 2012). De plus, l'accumulation d'adénosine dans le microenvironnement inhibe la prolifération des lymphocytes T CD4, T CD8 (Ohta et al. 2006; Hoskin et al. 2008) et leurs fonctions effectrices (Lokshin et al. 2006; Jin et al. 2010) (**Figure**

8 D et Figure 9). Dans un contexte d'hypoxie ou d'inflammation, les récepteurs de l'adénosine présents à la surface des lymphocytes T et NK lient l'adénosine présente dans le milieu inhibant les fonctions de ces cellules (Sitkovsky et al. 2014; Ohta et al. 2006) (**Figure 12** encadré jaune). Par ailleurs, une surexpression de CD39 a été démontrée comme étant impliquée dans la croissance tumorale et le développement de métastases dans des modèles murins de mélanome ou de cancer du côlon (Künzli et al. 2011; Stagg et al. 2012; Sun et al. 2010). Plus récemment, des études ont révélé la présence de CD73 soluble dans le MET et le sang périphérique. Morello et al (Morello et al. 2017) observent une corrélation positive significative entre l'activité de CD73 soluble dans le sang et les résultats cliniques chez les patients atteints de mélanome métastatique de stade IV, recevant un traitement au nivolumab (α -PD-1). L'ensemble de ces données soutient l'idée que le cycle de l'adénosine peut-être considéré comme un point de contrôle immunitaire métabolique et les stratégies pour interférer avec cette voie semblent prometteuses (Monteiro et al. 2018).

En plus des mécanismes d'immunosuppression médiés par des facteurs solubles, d'autres stratégies d'échappement sont liées à l'exposition de marqueurs membranaires de points de contrôles immunitaires. Les mécanismes d'échappement liés à l'interaction ligand/récepteur nécessitent le contact entre au moins deux types cellulaires.

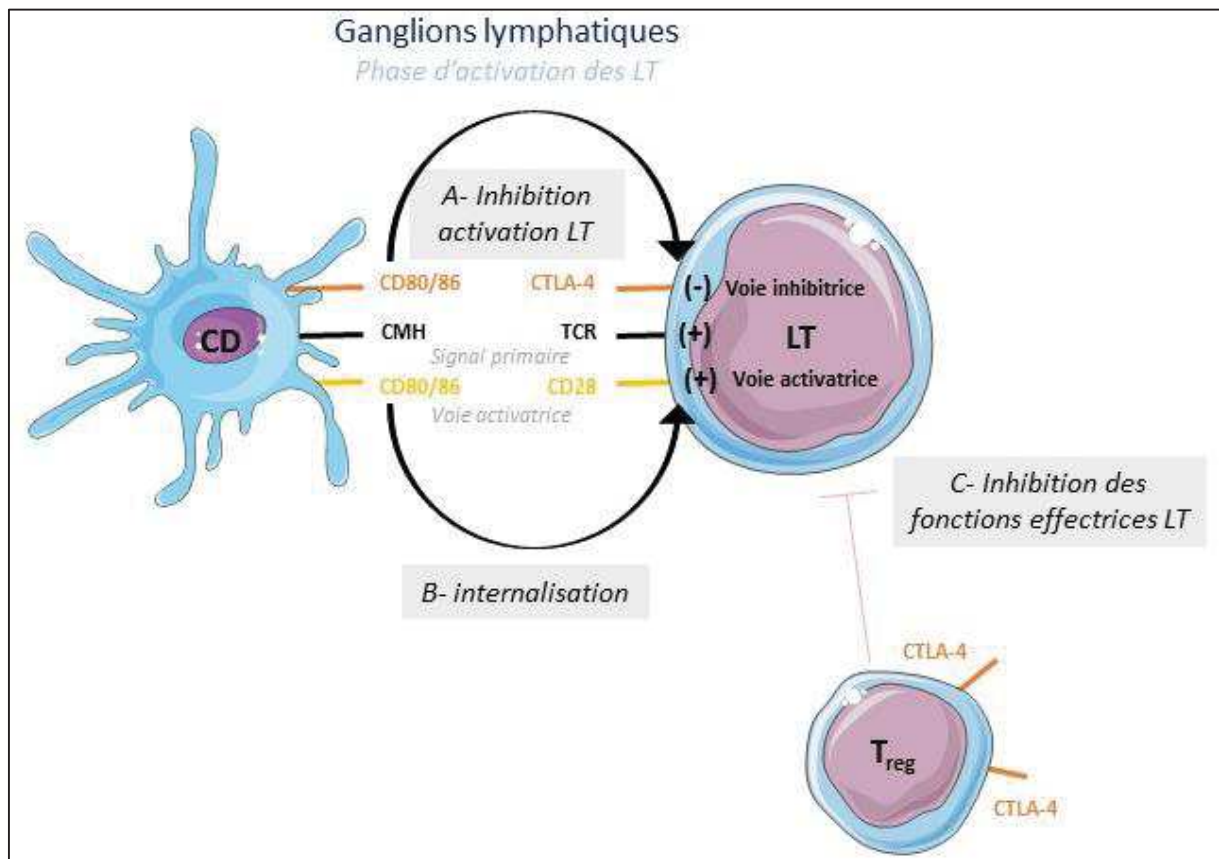


Figure 10 L'axe CTLA-4/CD80-CD86.

(A) CTLA-4 inhibe de façon physiologique l'activation des lymphocytes T au sein du ganglion lymphatique. Dans un contexte tumoral, cette fonction est détournée pour contourner la réponse immunitaire. (B) La liaison de CTLA-4 favorise l'internalisation de CD80/86. (C) Son expression à la membrane des lymphocytes T_{reg} favorise leur activité immunosuppressive inhibant les fonctions effectrices des LT.

L'axe CTLA-4/CD80-CD86.

Identifié en 1987, CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) aussi nommé CD152 (*cluster of differentiation 152*), est une glycoprotéine transmembranaire de la famille des Igs (Brunet et al. 1987). Dans le ganglion lymphatique, l'activation des lymphocytes T par les cellules présentatrices d'Ags (CPA), nécessite la liaison du CD28 au CD80 ou au CD86 présent à la surface des CPA comme signal co-activateur (**Figure 10** et **Figure 12** encadré rouge). CTLA-4, exprimé transitoirement par les lymphocytes T, 2 à 3 jours suivant leur activation (Walunas et al. 1994), est capable de fixer CD80 et CD86 avec une affinité vingt fois plus importante que CD28 (Merwe et al. 1997; Rudd, Taylor, et Schneider 2009). Dans un contexte pathologique, la fixation du CTLA-4 au CD80/86 limite l'activation du TCR et inhibe l'activation des lymphocytes T (Parry et al. 2005; Pardoll 2012) (**Figure 8 C** et **Figure 10 A**). De plus, la liaison de CTL-4 favorise la transcytose du CD80/86 des CPA inhibant ainsi leurs fonctions (Qureshi et al. 2011) (**Figure 10 B**). Le rôle physiologique central de CTLA-4 pour contrôler l'activation des cellules T est démontré de façon spectaculaire par le phénotype létal de souris KO pour CTLA-4 développant des auto-immunités importantes (Waterhouse et al. 1995). Au sein du MET, CTLA-4 est exprimé à la surface des cellules tumorales et des lymphocytes T inhibant les fonctions effectrices de celles-ci. Par ailleurs, CTLA-4 est exprimé de façon constitutive sur les lymphocytes_{T_{reg}}. Un KO spécifique pour l'expression de CTLA-4 sur les lymphocytes Treg (Wing et al. 2008) implique le développement d'une auto-immunité létale chez les souris. Bien que les mécanismes soient encore mal connus, il a été suggéré que l'expression de CTLA-4 fonctionnerait soit de manière autonome, en supprimant directement les fonctions effectrices des lymphocytes T, soit de manière non autonome, par exemple en régulant négativement les molécules co-stimulantes CD80 / 86 sur les cellules présentatrices d'antigène (APC) (Klocke, Holmdahl, et Wing 2017). Ainsi il semble que les Treg utilisent couramment CTLA-4 pour effectuer une immuno-suppression. Toutefois, CTLA-4 peut également fonctionner dans le compartiment non Treg, tandis que Treg peut invoquer des mécanismes de suppression indépendants de CTLA-4 (Walker 2013).

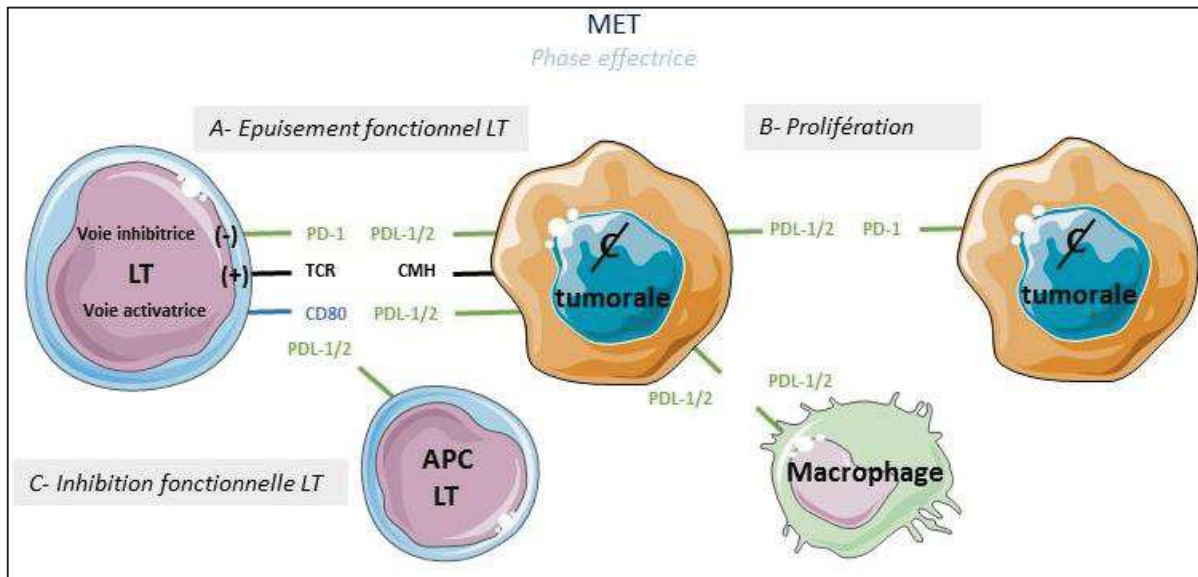


Figure 11 L'axe PD-1/PD-L1.

(A) Lors de la phase effectrice des lymphocytes T, la liaison de PD-1 à son ligand (PD-L1, PDL-2) exprimé sur les cellules tumorales et les cellules présentatrices d'Ags, inhibe les fonctions des lymphocytes T. (B) Les cellules tumorales peuvent exprimer à la fois PD-1 et son ligand, favorisant la prolifération tumorale. (C) L'expression de PD-1 sur les macrophages peut entraîner lors de sa liaison au ligand une inhibition de ses fonctions de phagocytose. (D) L'expression de PD-L1 par les cellules lymphocytaires ou présentatrices d'Ag entraîne également une inhibition fonctionnelle des LT.

L'axe PD-1/PD-L1, impliqué dans la phase effectrice.

PD-1 (*Programmed cell death protein 1*) aussi nommé CD279 (*cluster of differentiation 279*) est un autre récepteur de la superfamille des Igs exprimé sur les lymphocytes T, T_{reg} et les cellules NK de façon physiologique au cours de l'activation et impliqués dans la contraction de la réponse immunitaire. Deux ligands peuvent interagir avec PD-1. D'une part, PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) aussi nommé CD274 (*cluster of differentiation 274*) ou B7H1 (*B7 homolog 1*) et d'autre part, PDL-2 (*programmed death-ligand 2*) aussi nommé CD273 (*cluster of differentiation 273*) tous deux retrouvés exprimés à la surface des cellules présentatrices d'Ag et des cellules tumorales (Nirschl et Drake 2013) (**Figure 8 H** et **Figure 11 A**). L'engagement du récepteur PD-1 à son ligand module l'activation du SI (Zitvogel et Kroemer 2012). L'interaction PD-1/PD-L1 inhibe la prolifération des lymphocytes T, la survie et les fonctions effectrices (cytotoxicité, libération de cytokines) (Tseng et al. 2001), induit l'apoptose des cellules T spécifiques de la tumeur (Dong et al. 2002), favorise la différenciation des cellules T CD4⁺ en cellules T régulatrices FoxP3⁺ (Li Wang et al. 2008), ainsi que la résistance des cellules tumorales à l'attaque des CTL (Tsushima et al. 2007; Pardoll 2012; Mandai et al. 2016) (**Figure 8 H** et **Figure 11 A**). L'axe PD-1/PD-L2 inhibe la prolifération induite par le récepteur des cellules T (TCR) et la production de cytokines (Latchman et al. 2001). Ces marqueurs sont exprimés physiologiquement mais leur expression peut être anormalement soutenue en présence d'IFN- γ , une cytokine anti-tumorale sécrétée lors de la réponse immunitaire, augmentant ainsi l'expression de ces deux marqueurs et favorisant l'interaction de PD-1 avec son ligand.

Récemment, des études ont mis en évidence une expression intrinsèque de PD-1 dans les cellules de mélanome (Kleffel et al. 2015), les cellules cancéreuses du foie (H. Li et al. 2017, 1) ainsi que dans les cellules cancéreuses non à petites cellules du cancer du poumon (Du et al. 2018) (**Figure 11 B**). Cependant, l'expression de PD-1 à la surface des cellules tumorales n'est pas encore clairement établie et il apparaît nécessaire de mieux caractériser l'impact d'une telle expression dans les mécanismes impliquant l'axe de PD-1 et ses ligands. .

De plus, les macrophages infiltrant la tumeur (TAM) expriment PD-1 dans le cancer de côlon chez la souris et chez l'homme. Son expression sur les TAM augmente avec le temps chez des modèles de cancer de souris et est corrélée à l'avancement des cancers primaires humains. Cette expression est associée à une diminution des capacités de phagocytose des macrophages vis-à-vis des cellules tumorales (**Figure 11 C**). Ainsi le blocage de la voie PD-1/PD-L1 *in vivo* augmente la phagocytose des macrophages, réduit la croissance tumorale et prolonge la survie des souris (Gordon et al. 2017).

PD-L1 est aussi capable de lier CD80 inhibant alors les lymphocytes T. En effet, Park et al montrent que le traitement par un AcM α -PD-L1 bloquant l'interaction PD-L1/CD80 mais pas PD-L1/PD-1, augmente la prolifération et restaure les fonctions effectrices des lymphocytes T (J.-J. Park et al. 2010) (**Figure 11 D**). Ces résultats suggèrent l'implication de voies non redondantes inhibant les fonctions effectrices des lymphocytes T. De par son expression dans un grand nombre de cellules, la voie PD-1/PD-L1 est impliquée dans de nombreux mécanismes, certains encore mal identifiés pouvant expliquer les effets thérapeutiques différentiels des médicaments ciblant ce récepteur (Yao et al. 2018). La compréhension fine de ces mécanismes pourrait fournir des informations cruciales lors du développement d'approches combinatoires visant à améliorer l'immunité anti-tumorale.

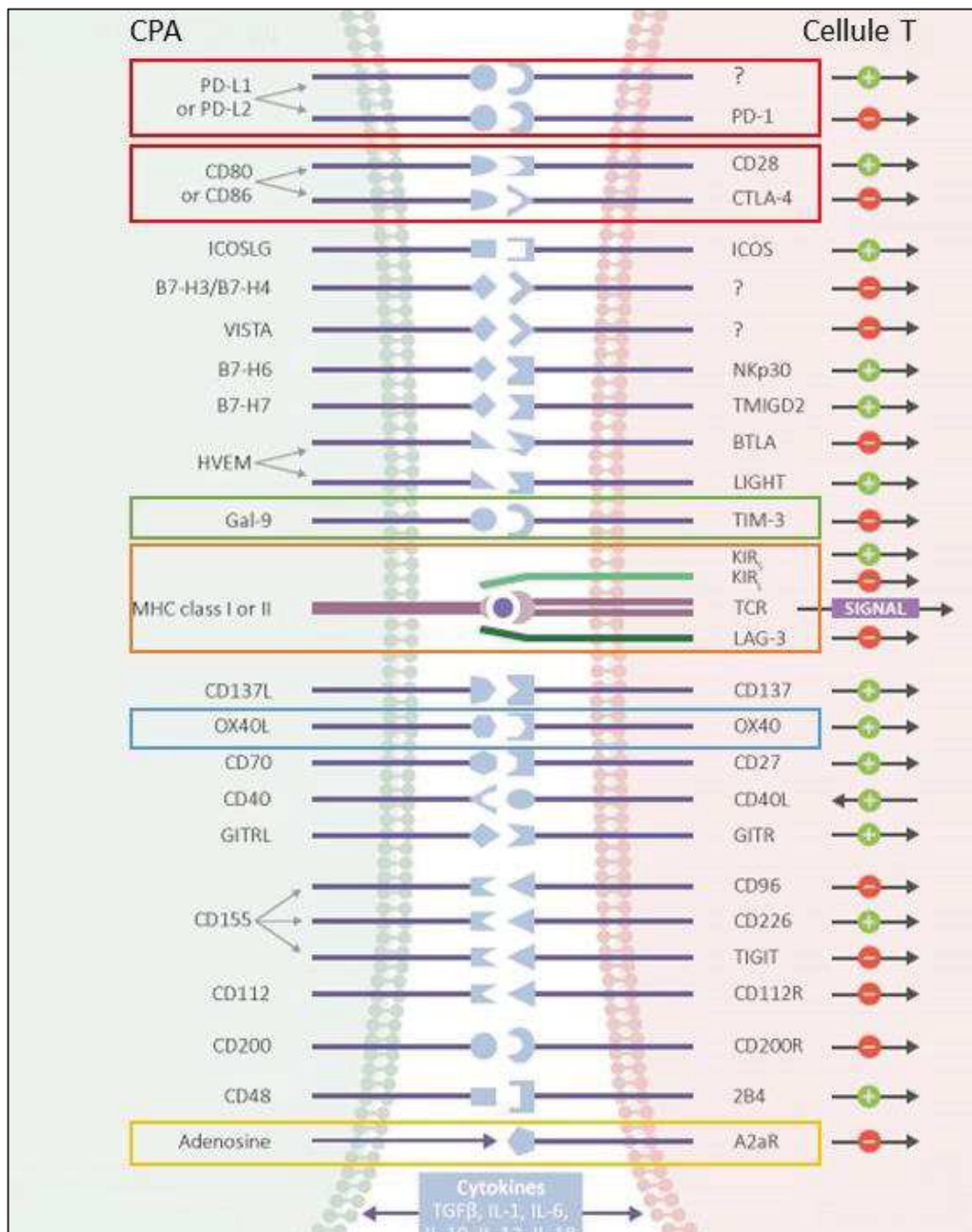


Figure 12 Représentation des principaux points de contrôles immunitaires (adapté de Pardoll 2012).

Les + représentent des points de contrôles immunitaires impliqués dans des voies qui vont stimuler l'activation des cellules T et donc une réponse anti-tumorale. Les - représentent des voies de signalisation freinant la réponse immunitaire et favorisant le développement tumoral.

Autres exemples de points de contrôles immunitaires.

TIM-3 (*T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3*), découvert en 2002 (Monney et al. 2002), est une glycoprotéine qui possède des domaines d'Igs et de mucines extracellulaires. Exprimée sur les cellules T activées, sa liaison à la galectine 9 entraîne une diminution de la production d'IFN- γ et une réduction de la prolifération des cellules T (Rangachari et al. 2012) (**Figure 12** encadré vert). Dans des souris atteintes de leucémie myéloïde aiguë avancée, la double expression de TIM-3 et PD-1 sur les lymphocytes T CD8 caractérise un épuisement des fonctions effectrices de ces cellules (Q. Zhou et al. 2011). Le blocage des deux voies simultanément est nécessaire pour observer une réduction de la charge tumorale et de la létalité suggérant des mécanismes non redondants. Par ailleurs, l'expression de Tim-3 sur les cellules T CD8⁺ PD-1⁺ infiltrant la tumeur est corrélée à un mauvais pronostic clinique dans le carcinome rénal (Granier et al. 2016).

LAG-3 (CD223) est un homologue de CD4 (Triebel et al. 1990) exprimé à la surface des lymphocytes T activés (Huard et al. 1994), des cellules NK (Kisielow et al. 2005), des cellules B, et des DCs (Workman et al. 2009) (**Figure 12** encadré orange). Les chercheurs émettent l'hypothèse que l'interaction entre LAG-3 et son ligand majeur, MHC de classe II, joue un rôle dans la modulation de la fonction des DCs (Andreae et al. 2002). Lorsque LAG-3 est inactivé (Ac α -LAG-3) *in vitro* dans des cellules humaines, les lymphocytes T CD4 prolifèrent davantage (Huard et al. 1995; Maçon-Lemaître et Triebel 2005). De plus, LAG-3 est régulé positivement sur les lymphocytes T CD4 *in vivo* leur permettant d'acquérir un phénotype régulateur (Huang et al. 2004; Grosso et al. 2007). Enfin, des études sur un modèle murin KO pour LAG-3 confirment son rôle dans l'épuisement et la diminution de prolifération des cellules T CD8 (Huang et al. 2004; Blackburn et al. 2009). Ces études ont été confirmées et étendues à des échantillons de carcinome ovarien humain co-exprimant LAG-3 et PD-1 (Matsuzaki et al. 2010).

Les KIR (*Killer immunoglobulin-like receptors*) sont des récepteurs exprimés principalement par les cellules NK mais aussi des cellules T et des CPA reconnaissant les CMH de classe II

(Mingari, Pietra, et Moretta 2005). Certains KIRs contiennent des motifs intracellulaires appelés ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif). Ces ITIM régulent négativement la fonction des cellules NK en développant une tolérance associée à une réduction de la lyse des cellules tumorales (Kim et al. 2016; Lanier 2008). Ces récepteurs sont également exprimés sur les lymphocytes T cytotoxiques associés à la tumeur et les CPA favorisant leur épuisement (Mingari, Pietra, et Moretta 2005).

En plus de bloquer des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires, une autre stratégie de traitement repose sur l'activation de points de contrôles immunitaires activateurs. Par exemple, OX40 (CD134) est régulé positivement dans les lymphocytes T CD4 et T CD8, 12 à 24 heures après activation dans les ganglions lymphatiques, et est régulé négativement à 48 à 96 heures (Redmond, Ruby, et Weinberg 2009). De même le ligand d'OX40 (OX40L) est régulé transitoirement à la hausse par les CPA activées (**Figure 12** encadré bleu). L'administration d'OX40 améliore l'expansion des LT CD4 et CD8 murins (Rogers et al. 2001). La signalisation OX40 favorise également la différenciation des LT. La liaison d'OX40 sur les lymphocytes T CD8 permet une augmentation de l'expression de granzyme B et de l'activité cytolytique favorisant la réponse effectrice (Redmond et al. 2007). Par ailleurs, la liaison d'OX40 sur des T_{reg} infiltrant la tumeur diminue leurs effets immunosuppresseurs dans le MET (Piconese, Valzasina, et Colombo 2008; Vu et al. 2007).

Comme nous avons pu le voir dans cette partie il existe des voies d'échappements très variées, non redondantes et impliquant différents acteurs cellulaires. L'enjeu principal des recherches en oncologie actuellement est de comprendre et de caractériser l'ensemble ces mécanismes d'échappement. L'une des principales difficultés, au-delà de l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques prometteuses, est de déterminer le moment optimal d'administration par rapport à la cinétique d'expression de la cible, son niveau d'expression ainsi que son rôle en fonction des populations qui l'expriment au sein du MET. Ainsi, la caractérisation du phénotype des populations du MET et la compréhension des mécanismes médiés par ces cibles, représentent des axes importants des recherches menées dans ce

domaine. Ces cibles potentielles sont autant de voies à explorer pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques et restaurer une réponse anti-tumorale efficace et durable (Nirschl et Drake 2013).

C. Thérapies anti-cancéreuses.

La chirurgie est longtemps restée la seule option proposée aux patients pour éliminer une tumeur. Bien que l'arsenal thérapeutique se soit notablement enrichi ces 50 dernières années, l'exérèse tumorale reste à l'heure actuelle privilégiée dans le traitement des cancers solides et non métastasés souvent associée à des thérapies anti-cancéreuses. Cependant, l'acte chirurgical seul n'est pas adapté aux cancers développés dans le système lymphatique, sanguin ou les cancers de stades avancés ayant métastasés. Le début du XXème siècle représente un premier tournant marquant pour les thérapies anti-cancéreuses avec la découverte des radiothérapies et des chimiothérapies (**Figure 3**). Les avancées technologiques en biologie cellulaire et moléculaire vont permettre de développer des molécules inhibitrices ciblant la cellule tumorale favorisant l'élimination de la tumeur de façon spécifique (**Figure 3**). Par la suite, la compréhension des mécanismes d'échappement tumoraux et les avancées technologiques favorisent le développement de thérapies modulant la réponse immunitaire anti-tumorale pour la rendre plus efficace et augmenter le taux de réponse aux traitements (**Figure 3**).

1. La chimiothérapie.

Comme nous avons pu le voir précédemment, les cellules tumorales acquièrent lors de l'oncogénèse, des capacités exacerbées de prolifération qui en font des cibles privilégiées des agents chimio-thérapeutiques. Dans les années 1940, lorsque les pharmacologistes Louis Goodman et Alfred Gilman ont réalisé des autopsies sur les soldats exposés au gaz moutarde des champs de batailles, ils ont mis en évidence une hypoplasie lymphoïde associée à une myélosuppression (Goodman et al. 1984). Ces observations amenèrent les chercheurs à étudier l'effet thérapeutique potentiel de ces agents sur la croissance tumorale. Très

rapidement après ces observations et pour la première fois, l'utilisation d'un agent cytotoxique sur un patient souffrant d'un lymphome non-Hodgkinien induit une régression tumorale. Le fait d'utiliser un traitement systémique pour éliminer les cellules cancéreuses, quel que soit leur localisation dans l'organisme, est une révolution thérapeutique. Les années qui suivirent, un nombre important d'agents chimio-thérapeutiques furent développés et leurs mécanismes d'actions variés ont été étudiés (Galluzzi et al. 2015). En ciblant les cellules en division, les agents chimio thérapeutiques, de par leurs mécanismes d'action (**Tableau 2**), peuvent-être classés par famille : les agents alkylants, les antimétabolites, les inhibiteurs de topoisomérases, les poisons microtubulaires et les antibiotiques cytotoxiques.

Type d'agent chimio-thérapeutique	Mécanisme d'action	Exemple de chimiothérapie
Agents alkylants	provoquent des liaisons croisées d'ADN inter ou intra-brin qui déstabilisent l'ADN pendant la réplication	Cyclophosphamide
Antimétabolites	inhibent la synthèse d'ADN, d'ARN ou de leurs blocs de construction	5-fluorouracile [5-FU]
Inhibiteurs de topoisomérases	empêchent le déroulement correct de l'ADN pendant la réplication et la transcription	Irinotécan
Poisons microtubulaires	interfèrent avec la polymérisation ou la dépolymérisation de la tubuline, inhibant ainsi le fuseau mitotique	Paclitaxel
Antibiotiques cytotoxiques	exercent des effets antinéoplasiques par divers mécanismes, comprenant l'intercalation d'ADN et la sur-génération d'espèces réactives de l'oxygène	Bléomycine

Tableau 2 Les différentes classes d'agents chimio-thérapeutiques.

Les agents chimio-thérapeutiques peuvent être classés selon leur mécanisme d'action sur les cellules en division. Ils peuvent altérer la synthèse d'ADN, la réplication et la transcription ou bien interférer dans la polymérisation et la dépolymérisation des brins d'ADN.

Certaines chimiothérapies, en plus de provoquer la mort cellulaire, sont capables de favoriser une réponse immune de l'hôte contre la tumeur (**Figure 13** et **Tableau 3**). En effet, l'équipe du Professeur Kroemer a montré que des lignées tumorales exposées à des doses létales d'anthracycline ou d'oxaliplatine, puis injectées à des souris avant une greffe tumorale, permettaient de vacciner et protéger les souris du développement d'une tumeur (Apetoh et al. 2007). De plus, des souris immunocompétentes répondent plus efficacement que des souris

immunodéficientes à ces chimiothérapies (Casares et al. 2005; Apetoh et al. 2007). En effet, l'efficacité de certains agents chimio thérapeutiques repose sur leur capacité d'induire une mort cellulaire immunogénique (ICD) caractérisée par le relargage de signaux de dangers appelés les DAMPs (*Damaged-Associated Molecular Patterns*) qui stimulent la réponse immunitaire anti-tumorale de l'hôte comme détaillé dans la figure 13 (Kroemer et al. 2013) (**Figure 13**).

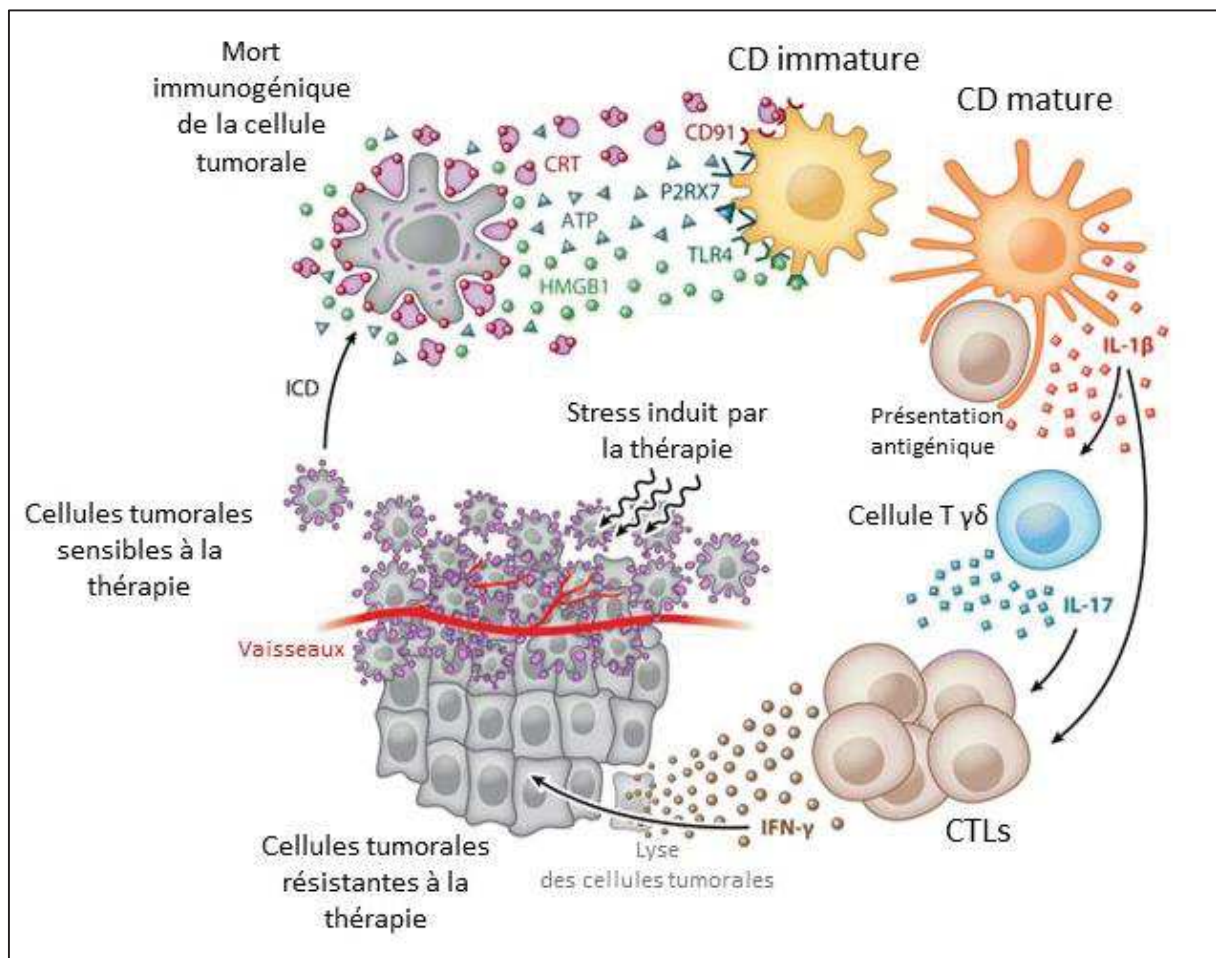


Figure 13 L'ICD induite par les chimiothérapies et les radiothérapies (adapté de Kroemer et al. 2013).

L'ICD favorise l'exposition membranaire précoce de la calréticuline (Obeid et al. 2007), le relargage d'ATP (Krysko et al. 2012), le relargage tardif de la protéine HMGB1 (Apetoh et al. 2007) et la sécrétion d'IFN- α ainsi que la chimiokine CXCL10 (Sistigu et al. 2014). Ces signaux impactent le SI en recrutant et stimulant les cellules présentatrices d'Ag qui vont phagocyter les débris cellulaires tumoraux, présenter les Ags tumoraux aux lymphocytes T et les activer dans les organes lymphoïdes.

En parallèle, des études cliniques montrent que l'efficacité de l'antracycline et de l'oxaliplatine respectivement utilisées chez des patientes atteintes de cancer du sein (West et al. 2011) ou des patients atteints de cancer colorectal (Halama et al. 2011) est corrélée à une augmentation de l'infiltrat en lymphocytes T au sein de la tumeur, infiltrat qui semble donc un facteur prédictif d'une meilleure réponse thérapeutique.

Bien que les chimiothérapies aient permis des avancées notables dans le traitement de nombreux cancers, certaines tumeurs comme le mélanome ne répondent que faiblement à ces thérapies ou développent des résistances (Amable 2016). Les chimiothérapies ne ciblent pas spécifiquement la cellule tumorale mais toutes les cellules en division ou avec un métabolisme très actif, et cette toxicité vis-à-vis des cellules non cancéreuses provoque de nombreux effets secondaires poussant parfois à l'arrêt du traitement (neutropénies, stomatites, mucites, diarrhées, vomissements ou encore perte des phanères...) (Coates et al. 1983; Pearce et al. 2017). Cependant, on assiste ces dernières années à un regain d'intérêt pour les chimiothérapies principalement en tant que thérapies adjuvantes comme nous le développerons dans la dernière partie de ce chapitre (p84).

Les inducteurs de morts immunogéniques	Bléomycine	De nombreuses tumeurs hématologiques et solides
	Bortezomib	Myélome multiple et lymphomes
	Cyclophosphamide	De nombreuses tumeurs hématologiques et solides
	Doxorubicine	De nombreuses tumeurs hématologiques et solides
	Epirubicine	Cancer du sein
	Mitoxanthrone	Leucémie myéloïde aigüe et cancer de la prostate
	Oxaliplatine	Cancer colorectal
	Thérapie photodynamique	De nombreuses tumeurs hématologiques et solides
	Radiothérapie	De nombreuses tumeurs hématologiques et solides

Tableau 3 Les molécules induisant une ICD.

Certaines chimiothérapies et les radiothérapies induisent une ICD dont les molécules utilisées en cliniques sont récapitulées dans ce tableau

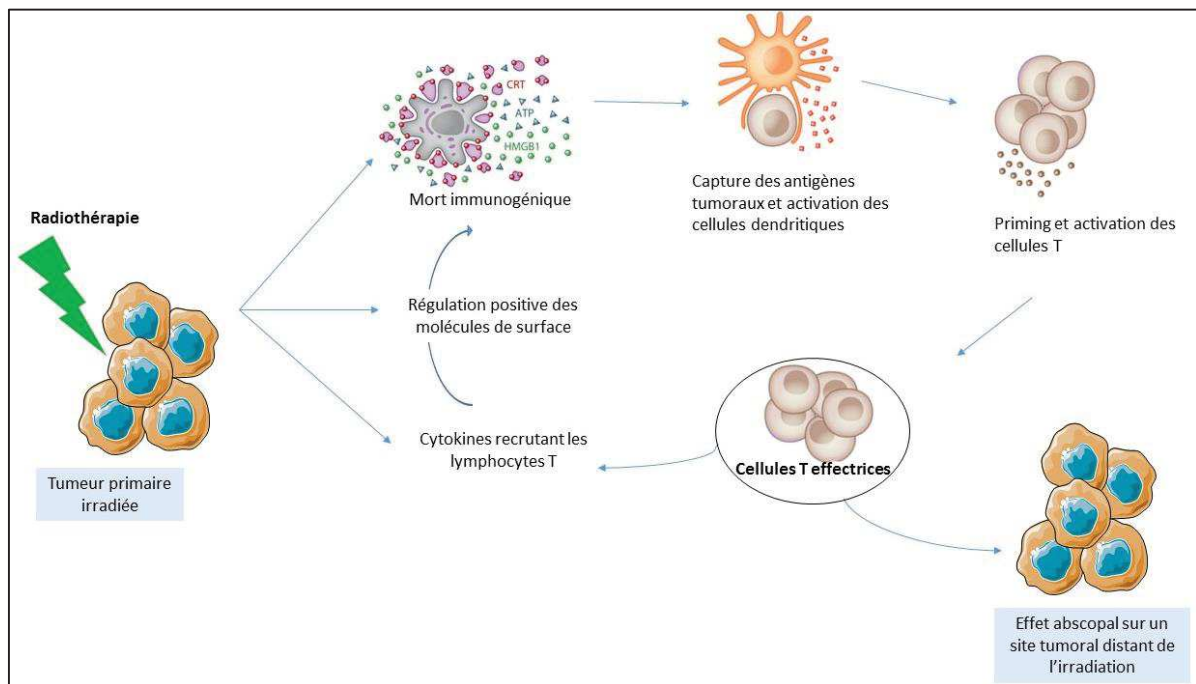


Figure 14 Les effets indirects d'un traitement par radiothérapie (Van Limbergen et al. s. d.).

La radiothérapie affecte la réponse immunitaire en induisant la mort cellulaire immunogène libérant de nouveaux Ags. Ceci conduit ensuite à une amélioration de l'amorçage et de l'activation des cellules T effectrices. La radiothérapie conduit en outre à une expression accrue des molécules de surface sur les cellules cancéreuses irradiées, les rendant plus vulnérables à la destruction des cellules cytotoxiques induites par les lymphocytes T. Enfin, la radiothérapie conduit à la libération de cytokines attirant les cellules T vers la tumeur irradiée. L'augmentation du recrutement de cellules T effectrices et l'élimination efficace des cellules cancéreuses par les lymphocytes T peut entraîner la présentation de nouveaux Ags.

2. La radiothérapie.

La découverte des rayons X (Wilhem Conrad Roentgen, 1895) et du pouvoir de pénétration des rayons émis par l'Uranium (Henri Becquerel, 1896) motivent les recherches de Pierre et Marie Curie qui démontrent un effet thérapeutique des rayonnements du radium pour éradiquer les cellules tumorales. La radiothérapie expose les cellules cancéreuses à des rayonnements qui altèrent l'ADN et bloquent les mécanismes de multiplication des cellules (**Figure 3**). Les progrès en imagerie profitent à la radiothérapie qui devient une technique de haute précision largement utilisée, avec actuellement près de 70% des patients atteints de cancers qui bénéficient d'un traitement de radiothérapie seul ou en combinaison (Harrington et al. 2011). L'administration des radiothérapies peut se faire par voie externe en délivrant un faisceau de particules au sein de la tumeur (Karzmark et Pering 1973), par voie systémique (radiothérapie métabolique), ou bien par une application locale interne au plus près du site tumoral (curiethérapie). De nombreuses études cliniques et précliniques sont actuellement menées pour affiner les protocoles de radiothérapie afin d'optimiser les effets thérapeutiques tout en diminuant les effets secondaires sur les tissus sains. Ces dix dernières années, les avancées technologiques exploitant notamment les capacités de pénétration au sein de la tumeur des nanoparticules permettent d'augmenter les effets différentiels tumeur/tissu sain en diminuant les effets secondaires (Calugaru et al. 2015). Couplées à des Ac ou des ligands spécifiques de la tumeur, leurs effets peuvent être amplifiés (Torchilin 2010). De la même façon, la radiothérapie hypo-fractionnée est un protocole testé dans de nombreux essais cliniques afin de délivrer une dose plus élevée par séance et de réduire la durée de traitement (Boissier et Gross 2012). Les schémas actuels de radiothérapie clinique impliquent à la fois des traitements hypo et hyper fractionnés (Prasanna et al. 2014).

En plus de son action directe sur les cellules tumorales, comme les chimiothérapies, il est désormais admis que les effets de la radiothérapie peuvent être corrélés à une activation du SI de l'hôte (**Figure 14**). En effet, des cas de régressions de lésions métastatiques, non irradiées et à distance du site tumoral primaire traité par l'irradiation, sont observés chez de

nombreux patients, c'est ce que l'on appelle l'effet abscopal. Par exemple un cas d'effet abscopal a été observé chez un patient atteint de mélanome traité par ipilimumab et radiothérapie (Postow et al. 2012).

Bien que la radiothérapie soit largement utilisée dans les stratégies de thérapies anti-cancéreuses de nombreux cancers, certaines tumeurs ne répondent que faiblement à ces thérapies ou développent des résistances. Cependant, comme pour les chimiothérapies, la radiothérapie est désormais utilisée aussi pour ses capacités à moduler le SI en combinaison d'immunothérapies comme nous le détaillerons dans la dernière partie de ce chapitre (p81).

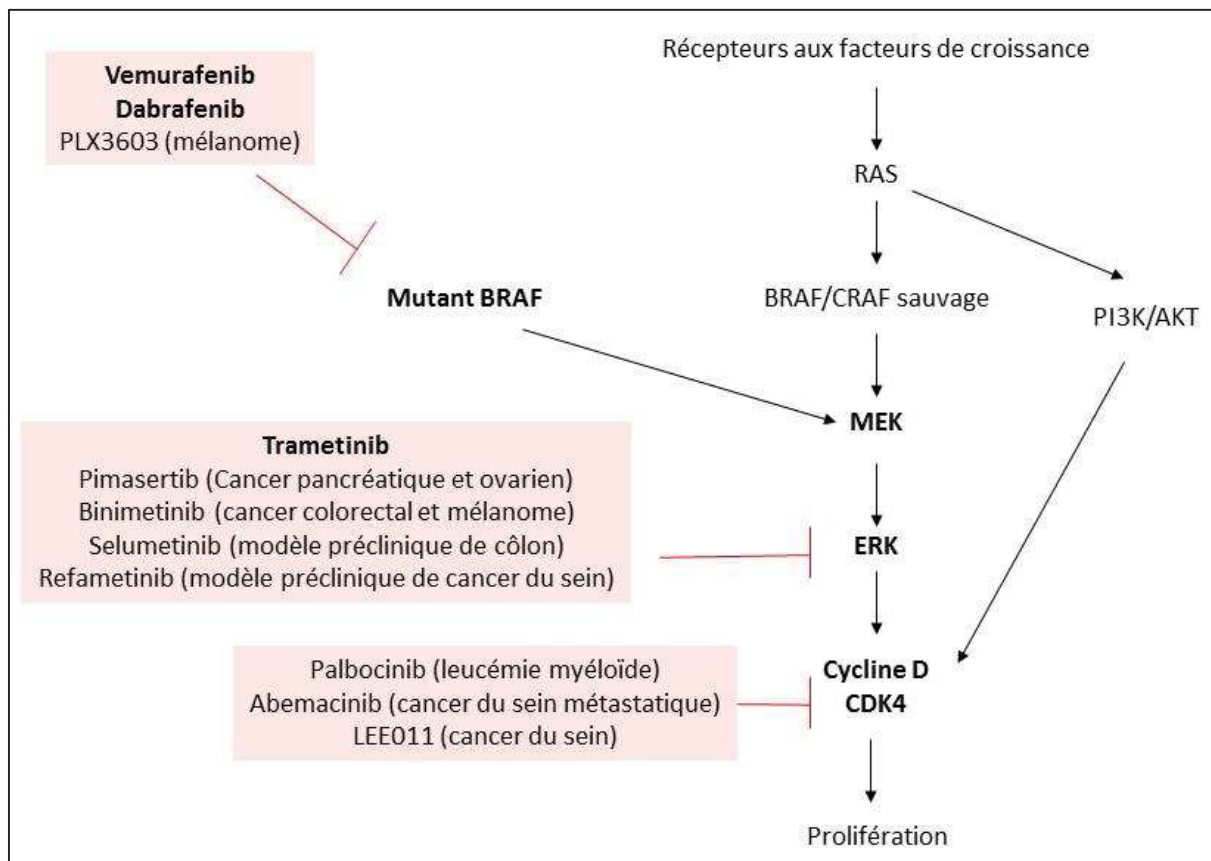


Figure 15 Schéma de la voie RAS/BRAF/MEK/ERK.

Cascade de signalisation RAS/BRAF/MEK/ERK associée aux inhibiteurs de différents niveaux de cette voie dont l'utilisation en clinique est détaillée dans le **Tableau 4** (en gras ceux du schéma) des molécules inhibitrices acceptées par la FDA.

3. Les molécules inhibitrices.

Les thérapies ciblées représentent une nouvelle forme de traitement du cancer qui exploite les différences biologiques existant entre les cellules cancéreuses et les cellules saines (mutations ou modification de l'expression de protéines). Elles visent des messagers (facteurs de croissance), leurs récepteurs ou des éléments intracellulaires responsables du transfert d'information.

A titre d'exemple, nous pouvons citer le Vemurafenib, première thérapie ciblée qui a obtenu une autorisation de mise sur le marché en 2012 en monothérapie pour traiter des cas de mélanomes non résecables ou métastatiques porteurs d'une mutation BRAF V600E. Cette mutation, découverte en 2002, est présente dans 40 à 50% des mélanomes et dans environ 7% des tumeurs de façon générale (Davies et al. 2002). Le gène BRAF code pour une thréonine-kinase de la voie des MAP-kinases en aval de la protéine RAS et en amont de la protéine MEK (**Figure 15**). La mutation V600E (une valine remplacée par un acide glutamique en position 600 du gène BRAF) entraîne une sur-activation de cette protéine responsable d'une prolifération excessive des cellules portant cette mutation. Afin de bloquer l'impact de cette mutation, des inhibiteurs spécifiques sont développés tels que le Vemurafenib puis le Dabrafenib et l'Encorafenib démontrant une efficacité clinique lors des tests de phase I, sur la majorité des patients atteints de mélanomes mutés avec des réponses chez 56% des patients décelables cliniquement dans les premières semaines de traitement (Flaherty KT, N Engl J Med, 2010).

Les résultats spectaculaires obtenus dans le traitement du mélanome métastatique, par rapport à ceux obtenus avec la chimiothérapie, ont entraînés le développement d'autres molécules α -BRAF et de nombreuses thérapies ciblant d'autres voies caractéristiques de la cellule tumorale (**Tableau 4**) sont désormais utilisées dans de nombreux cancers. Néanmoins, chez certains patients l'apparition de résistances et les rechutes rapides, suite à ces traitements, ont été rapportées notamment avec les thérapies α -BRAF (Manzano et al. 2016). De plus, ces thérapies ciblées ne s'adressent qu'à des patients porteurs des mutations

correspondantes ce qui ne représente qu'un certain pourcentage de malades (40 à 60% des mélanomes pour les α -BRAF). Afin de pallier aux limites des thérapies ciblées, il a été nécessaire de développer d'autres stratégies thérapeutiques permettant de moduler la réponse immunitaire elle-même.

Voie/Cible	Approuvé par la FDA	Application
BRAF	Dabrafenib (Tafinlar)	Mélanome non résecable (BRAF V600*) Cancer non à petites cellules (BRAF V600+)
	Vemurafenib (Zelboraf)	Mélanome non résecable (BRAF V600*)
MEK	Trametinib (Mekinist)	Mélanome non résecable (BRAF V600*) Cancer non à petites cellules (BRAF V600+)
mTOR	Everolimus (Afinitor)	Cancer du sein Cancer du sein Cancer du pancréas Cancer de l'intestin Cancer du poumon
	Temsirolimus (Torisel)	Cancer du sein Lymphome des cellules du manteau
PARP	Olaparib (Lynparza)	Cancer épithélial séreux de haut grade de l'ovaire, des trompes de Fallope ou du péritoine (mutation BRCA)
EGFR	Cetuximab (Erbixub)	Cancer colorectal métastatique Cancer épidermoïde de la tête et du cou
	Erlotinib (Tarceva)	Cancer du poumon Cancer du pancréas
	Afatinib (Gilotrif)	Cancer bronchique non à petites cellules
	Panitumumab (Vectibix)	Cancer colorectal métastatique (RAS non muté)
EGFR, RET, VEGFR2	Vandetanib (Caprelsa)	Cancer médullaire de la thyroïde agressif et symptomatique
	Pertuzumab (Perjeta)	Cancer du sein métastatique HER2 ⁺
	Trastuzumab (Herceptin)	Cancer du sein métastatique HER2 ⁺ Cancer du sein précoce HER2 ⁺
HER2 et EGFR	Lapatinib (Tukerb)	Cancer du sein métastatique HER2 ⁺
	Ceritinib (Zykadia)	Cancer du poumon non à petites cellules
	Crizotinib (Xalkori)	Cancer du poumon non à petites cellules
KIT, PDGFR, ABL	Imatinib (Gleevec)	Leucémies Tumeurs gastro-intestinales
	Dasatinib (Sprycel)	Leucémie myéloïde chronique Leucémie aiguë lymphoblastique
	Ponatinib (Iclusig)	Leucémie myéloïde chronique Leucémie aiguë lymphoblastique
KIT, PDGFR β , RAF, RET, VEGFR1/2/3	Regorafenib (Sitvarga)	Carcinome hépatocellulaire Cancer colorectal métastatique Tumeur stromale gastro-intestinale
	Sorafenib (Nexavar)	Carcinome hépatocellulaire Carcinome rénal Carcinome thyroïdien différencié
VEGF Ligand	Bevacizumab (Avastin)	Cancer de l'ovaire
RTK	Sunitinib (Sutent)	Tumeur stromale gastro-intestinale Cancer du rein métastatique Tumeur neuroendocrine du pancréas
VEGF Ligand	Nintedanib (Ofev)	Fibrose pulmonaire idiopathique

Tableau 4 Les thérapies ciblées acceptées par la FDA (adapté de (Tsimberidou 2015)).

Récapitulatif des molécules inhibitrices utilisées en oncologie acceptées par la FDA et utilisées en oncologie.

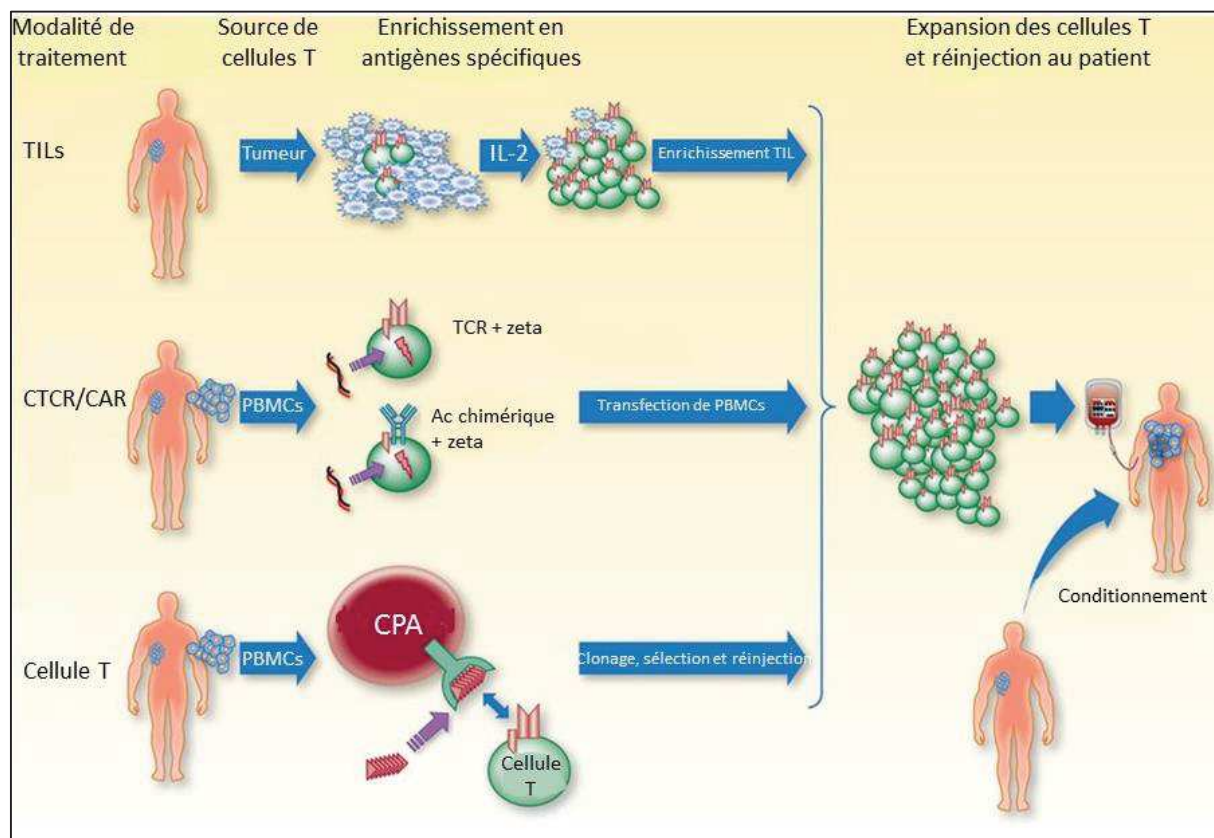


Figure 16 Le transfert de cellules T.

Représentation de la technique de transfert de cellules T avec les différentes modalités de traitements (TILs, CTCR/CAR, Cellule T), issus de la tumeur ou des PBMCs. Une fois enrichies en Ags spécifiques, les cellules sont réinjectées au patient.

4. Les immunothérapies.

L'amélioration des connaissances en immunologie, et la compréhension des mécanismes de la réponse immunitaire anti-tumorale et des mécanismes d'échappement, ont conduit à l'émergence des immunothérapies. Il s'agit d'inoculer chez les patients des effecteurs immunitaires compétents ou de mobiliser la réponse immunitaire du patient contre les cellules tumorales (**Figure 17**).



Figure 17 Schématisation des différentes stratégies d'immunothérapies.

Deux stratégies sont développées dans les immunothérapies anti-cancéreuses qui regroupent différents types de traitements représentés dans cette figure.

a. Les transferts adoptifs de cellules immunitaires

Les thérapies basées sur le transfert adoptif de cellules immunitaires reposent sur le prélèvement de cellules immunitaires, qui sont ensuite manipulées *ex vivo* (modifiées, sélectionnées ou amplifiées) puis réinjectées aux patients en vue d'une action anti-tumorale. Il s'agit soit des cellules immunitaires de l'hôte qui présentent une réactivité anti-tumorale (cellules NK, TILs), soit des cellules hôtes qui ont été modifiées génétiquement avec des récepteurs de cellules T anti-tumoraux (TCR) permettant une reconnaissance classique ou des récepteurs d'Agc chimériques (CAR) dont le motif extra-cellulaire cible la cellule tumorale et le motif intra-cellulaire est similaire à celui d'un TCR (**Figure 16**).

Une étude de 2011, chez 93 patients atteints de mélanomes métastatiques, démontre qu'une thérapie de transfert de lymphocytes T autologues infiltrant la tumeur peut induire une réponse complète durable chez 20 de ces patients (Steven A. Rosenberg et al. 2011). Néanmoins, bien que ce type de thérapies soient utilisées dans de nombreux cancers, elles sont majoritairement

associées à des adjuvants pour favoriser les effets des cellules transférées, tel que dans l'étude de Rosenberg et al. L'injection d'IL-2 pour assurer la prolifération des TILs (S A Rosenberg et al. 1989).

Les premières études de transfert adoptif de NK visent à améliorer les réponses anti-tumorales des cellules NK autologues grâce à l'utilisation de cytokines (IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 et IFN de type I) améliorant les fonctions et la prolifération des cellules NK. Malheureusement, ces thérapies n'ont qu'une efficacité clinique limitée. Cela pourrait être dû, par exemple dans le cadre d'une stimulation IL-2, aux effets de l'IL-2 sur l'activation et l'expansion de lymphocytes T régulateurs qui inhiberaient ainsi les fonctions des cellules NK (Davis et al. 2015).

Les limites des transferts adoptifs sont principalement liées aux difficultés à accéder aux cellules du patient, notamment aux clones T spécifiques de la tumeur, et à les cultiver. De plus, il n'est pas évident d'obtenir une réponse anti-tumorale efficace dans le temps, dans la mesure où le SI du patient n'est pas mobilisé de façon active. Par ailleurs, les cellules transférées, dans le contexte d'un microenvironnement défavorable, peuvent acquérir un phénotype immunosuppresseur limitant ainsi leur action. Même si les effets à long-terme sont limités, le transfert de cellules immunitaires est désormais utilisé en combinaison avec d'autres thérapies adjuvantes.

b. L'immunothérapie par les cytokines.

En raison de leur capacité à réguler diverses réponses cellulaires, les cytokines orchestrent des fonctions variées comme l'hématopoïèse, l'angiogenèse, la cicatrisation, l'inflammation et sont impliquées dans les réponses immunitaires innées et adaptatives (Vacchelli et al. 2015). Actuellement trois cytokines recombinantes sont autorisées par la FDA à savoir l'IFN- α 2a, l'IFN- α 2b et l'IL-2. Ces cytokines sont utilisées afin de stimuler la réponse immunitaire du patient mais de façon non spécifique. L'IFN- α 2a recombinant est utilisé pour le traitement de la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie myéloïde chronique (LMC) à chromosome Philadelphie positive. L'IFN- α 2b recombinant est approuvé chez les patients atteints de lymphome folliculaire, de myélome multiple, de leucémie à tricholeucocytes, de sarcome de

Kaposi lié au SIDA, de mélanome, de verrues génitales (*Condyloma acuminata*) et de néoplasies cervicales intraépithéliales. L'IL-2 recombinante, elle, est utilisée pour le traitement des formes métastatiques du mélanome et le cancer du rein (Steven A. Rosenberg 2014). Cette thérapie permet une régression durable et curative chez les patients atteints de mélanome métastatique.

Malheureusement, de par leur faible spécificité et à cause des fortes doses administrées, les cytokines présentent des effets secondaires parfois sévères tels que l'hypotension, des vomissements ou de la fièvre. Ces observations ont ouvert la voie à une immunothérapie anti-tumorale mieux ciblée dans le but d'optimiser la réponse locale et de limiter les effets toxiques des cytokines à l'échelle de l'organisme. Afin de pallier ces effets, le développement des AcTakines (*Activated-by-Targeting cytokines*) présente un avantage considérable avec la capacité pour ces cytokines mutées ayant une affinité réduite (Garcin et al. 2014), de fusionner avec des domaines spécifiques cibles de certaines cellules. Au contact de ces populations cellulaires sélectionnées, l'activité des AcTakines est restaurée. Pour la première fois ce concept d'AcTakine a été étudié dans le domaine de l'oncologie. L'AcTaféron (IFN mutant de type 1) ciblant les DC, a démontré une efficacité remarquable dans des modèles humanisés de tumeurs hématologiques et de tumeurs solides (mélanome et carcinome) sans effet secondaire par rapport à l'IFN WT, ou lors d'associations thérapeutiques avec des chimiothérapies, du TNF ou des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires (Cauwels et al. 2018).

Par ailleurs, ces 5 dernières années, de nombreux essais ont été lancés pour tester l'innocuité et l'efficacité des cytokines recombinantes en tant qu'agents immunostimulants dans des stratégies de thérapies combinées. Par exemple, l'utilisation du TNF- α , impliqué dans l'apoptose, la survie cellulaire et l'inflammation ne semble pas avoir d'effet thérapeutique mais semble faciliter l'accumulation d'une chimiothérapie, la doxorubicin, au site tumoral dans un modèle de sarcome de rat (van der Veen et al. 2000).

c. Les vaccins anti-cancéreux.

La majorité des vaccins sont développés dans la cadre de maladies infectieuses causées par des virus comme la grippe, la rougeole ou la poliomyélite. Mais il existe aussi des vaccins anti-cancéreux qui sont développés dans le but, soit de stimuler le SI et d'empêcher le développement d'un cancer avec les vaccins prophylactiques, soit de traiter un cancer, il s'agit alors de vaccins thérapeutiques. Depuis la découverte en 1904 du *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) et ses premiers effets anti-tumoraux en 1929 (Pearl, 1929, Mathé et al. 1969), le BCG est toujours utilisé en clinique en tant qu'adjuvant à d'autres thérapies. L'instillation du BCG induit une réponse inflammatoire de type TH1 permettant des réponses cliniques encourageantes dans le traitement des cancers de la vessie avec une régression tumorale (Bid 2015). Cependant, cet effet vaccinal est aussi associé à des échecs thérapeutiques dans 50% des cas et présente de nombreux effets secondaires chez près de 90% des patients (Dias et al. 2018).

Concernant les vaccins anti-cancéreux, il existe, à titre d'exemple, des vaccins antigéniques qui correspondent à des Ags spécifiques de la cellule tumorale associés parfois à des adjuvants pour permettre une meilleure réponse du SI. Une étude sur un modèle préclinique de souris immunocompétentes C57BL/6 de mélanome (lignée cellulaire B16F10) a montré des résultats encourageants (Petruzzo et al. 2017). Un vaccin multi peptidiques (TrP2 et deux peptides mutés MUT30 et MUT44) combiné à une chimiothérapie métronomique de faible dose et un α -PD-1, inhibe la croissance tumorale et prolonge la survie des souris. Cet effet est associé à une réponse effectrice des cellules T et une réduction de la fréquence des T_{reg} . Néanmoins, dans cette étude, seulement une souris présente une protection à long-terme lors d'une nouvelle greffe sur l'autre flanc de la souris.

Un effet vaccinal est aussi recherché par la manipulation des DCs des patients. Pour cela, une fois prélevées, les DCs du patient sont chargées avec des Ags spécifiques des cellules cancéreuses puis réinjectées au patient. En clinique, l'utilisation de ces thérapies vaccinales utilisant les DCs est répandue. Les patients atteints notamment de mélanomes métastatiques

en bénéficient et présentent des réponses sur le long-terme sans développement de la maladie dans les 4 ans qui suivent l'immunothérapie (Uslu et al. 2017).

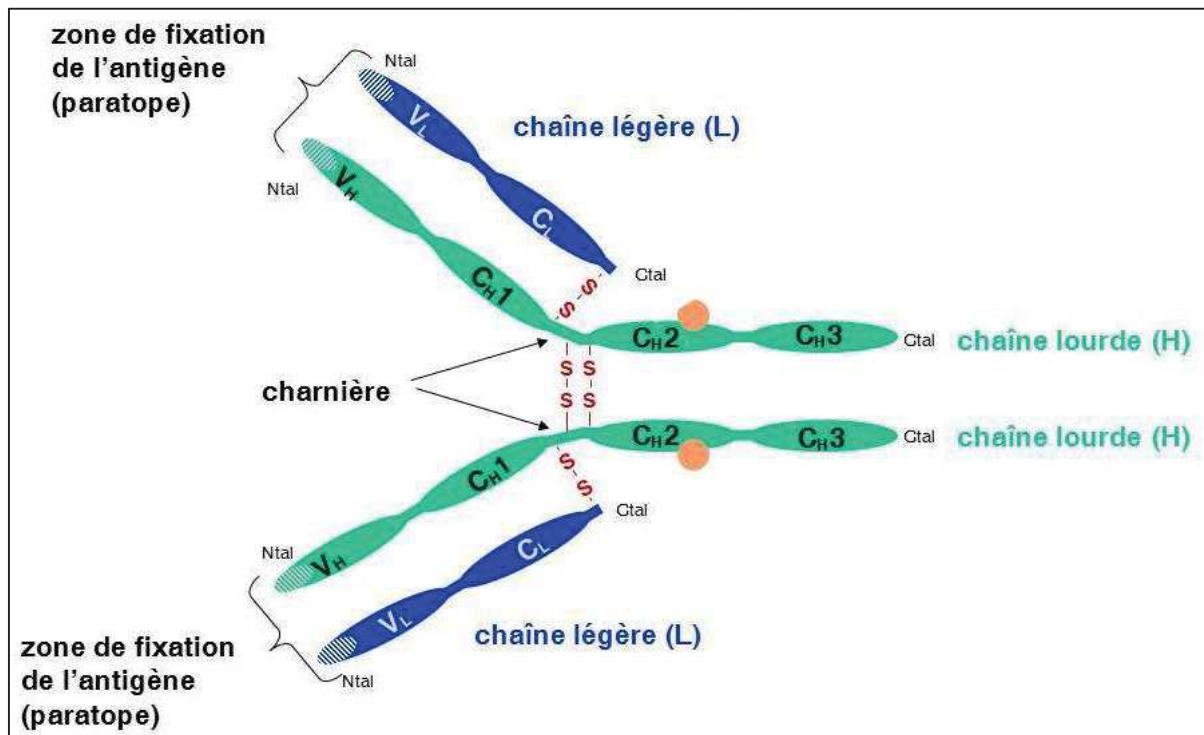


Figure 18 Structure schématique d'un Ac.

Les Ac sont composés de deux chaînes lourdes (L) et de deux chaînes légères (L), reliées par des liaisons non covalentes et par des ponts disulfures (S-S). La région charnière relie les deux variables de l'Ac (Fab) la portion cristallisable (Fc). Chaque chaîne est composée de domaines (deux domaines pour les chaînes légères et quatre (IgD, IgG, IgA) à cinq (IgM et IgE) domaines pour les chaînes lourdes). Les domaines N terminal (Ntal) des chaînes lourdes et légères V_H (Variable Heavy) et V_L (Variable Light) incluent des régions spécifiques variables (en clair sur le schéma). Les autres domaines C_L (Constant Light) et C_H (Constant Heavy) sont très conservés au sein d'une espèce.

Cependant, l'efficacité de ce type de thérapie peut, au contact du microenvironnement tumoral immunosuppresseur, diminuer dans le temps du fait d'une anergie du SI. Une des stratégies pour contourner cela est d'utiliser de petits fragments d'ADN des cellules cancéreuses, les vaccins à ADN, qui portent le génome des protéines antigéniques pour vacciner le patient. Par exemple, un vaccin codant pour les protéines E6 et E7, impliquées dans les cancers induits par le papillomavirus humain, a fait l'objet d'un essai clinique de phase II b. Les femmes vaccinées présentent un taux de régression tumorale plus important associé à une charge virale plus faible (Trimble et al. 2015).

d. Les anticorps Monoclonaux.

L'amélioration des connaissances en immunologie, et la compréhension des mécanismes de la réponse immunitaire anti-tumorale et des mécanismes d'échappement, ont permis l'émergence des immunothérapies basées sur l'utilisation d'AcM. Les AcM sont des immunoglobulines de structure complexe (**Figure 18**) qui possèdent la double capacité d'une part de fixer directement l'antigène (portion Fab) d'autre part d'interagir avec le SI (portion Fc) et qui ont l'avantage d'être bien tolérés en tant que molécules biologiques.

Les Ac sont classés selon la nature de leurs chaînes lourdes associées à des propriétés et des caractéristiques spécifiques (**Figure 18**). Parmi les différentes classes d'Ac, les IgG sont les seules utilisées en thérapeutique principalement parce que leur structure est la plus simple à reproduire et parce qu'elles représentent la catégorie avec la plus longue demie-vie grâce à leur capacité de liaison au FcRn leur permettant de persister plus longtemps dans l'organisme avant d'être dégradées. En clinique, cela signifie une diminution du nombre d'injections au patient.

D'après l'état des lieux en 2014 sur les bio-médicament en France, 17% des 173 bio-médicaments disponibles sur le marché français sont des AcM (**Figure 19**). En 2017, quatre AcM ont obtenu une autorisation de mise sur le marché en oncologie avec : l'Avelumab, un α -PD-L1 dans le traitement de carcinome métastatique à cellules de Merkel ; l'Ocrelizumab, un

α -CD20 dans le traitement de sclérose en plaques ; le Durvalumab, un α -PD-L1 dans le cadre de carcinome urothélial ; l'Inotuzumab ozogamicin, un α -CD22 conjugué à la calicheamicin (un antibiotique néoplasique) dans le traitement de leucémies lymphoblastiques (Kaplon et Reichert 2018). Les propriétés des AcM représentent ainsi un enjeu thérapeutique grandissant en cancérologie.

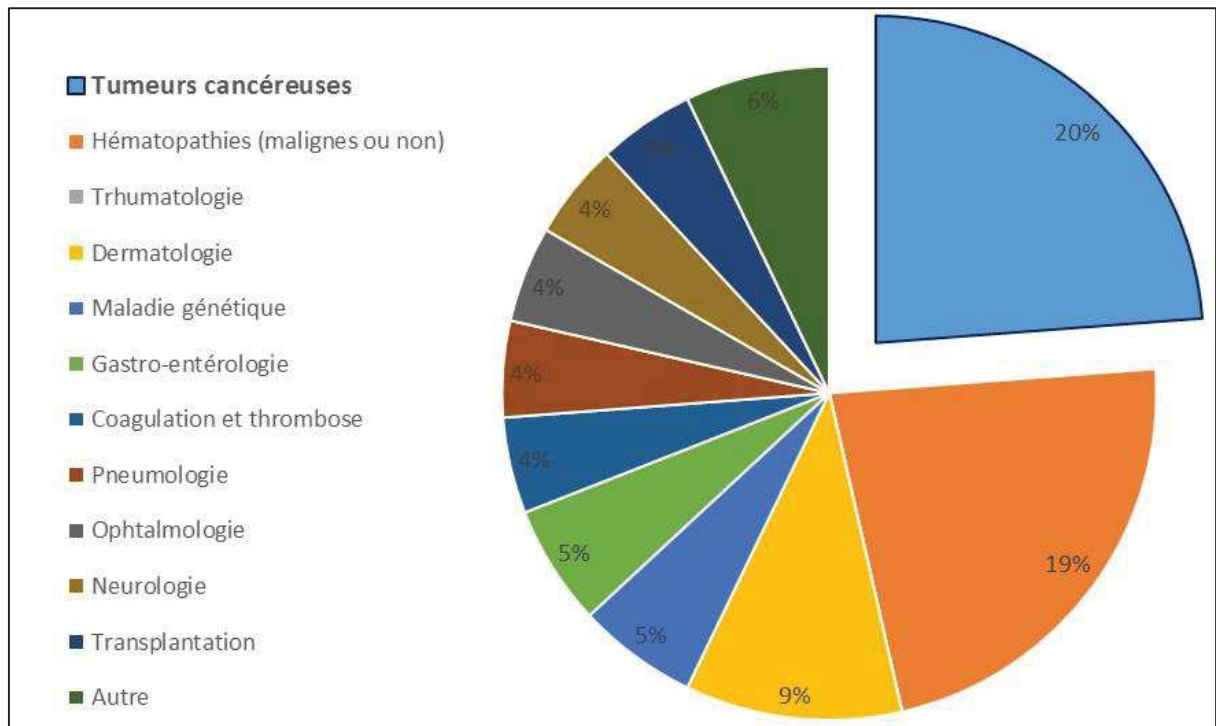


Figure 19 Indication thérapeutique des Ac commercialisés en France, Mars 2016.

Aujourd'hui en plein essor, les Ac permettent de traiter de nombreuses maladies avec une augmentation toujours plus importante du nombre d'Ac autorisés sur le marché notamment en cancérologie.

i. Les effets cytotoxiques de l'AcM ciblant la cellule tumorale.

Les AcM ciblant la cellule tumorale sont utilisés depuis longtemps avec en 1982, le premier traitement dans le cadre d'un lymphome et l'utilisation d'un anti-CD20 (Foon 1982), approuvé par la FDA en 1998 (Rituximab). Initialement ces AcM ciblant la cellule tumorale étaient utilisés pour leurs effets directs via l'antigène qu'ils reconnaissent qui passent par une cytotoxicité cellulaire (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) (**Tableau 5 D**), une phagocytose (*antibody-dependent phagocytosis*, ADPh) ou une activation du complément (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC). Ils peuvent ainsi inhiber la prolifération cellulaire ou la survie (**Tableau 5 A et B**). De plus, les AcM peuvent être associés à des drogues (*antibody-drug conjugates* ou ADC) (**Tableau 1 C**) qui permettent d'utiliser la spécificité d'un anticorps pour cibler la cellule tumorale et libérer à l'intérieur ou à proximité de celle-ci, un composé hautement toxique qui lui est couplé, comme un agent cytotoxique ou un agent radioactif (Haeuw, Caussanel, et Beck 2009) (**Tableau 5 E**).

	Mécanismes d'action	Exemple	Référence	approuvé par la FDA
A	Inhibition des voies de signalisation requis pour la survie et la progression tumorale	Cetuximab : α -EGFR	Ming, 2013	Traitement des cancers de la tête et du cou et le cancer colorectal
B	Activation des récepteurs de mort cellulaire à la surface des cellules tumorales	Tigatuzumab : facteur de nécrose tumorale (TRALR-2)	Forero-Torres, 2013	En développement clinique
C	Anticorps ciblant un antigène tumoral spécifique couplé à des toxines ou des radionucléides (immune conjugates)	Gemtuzumab ozogamicin	Leal, 2014	Patients atteints de leucémie myéloïde aiguë
D	AcM anti-tumoral qui augmente les mécanismes d'ADCC	Rituximab : α -CD20	Scott, 1998 et Jones, 2013	Leucémies lymphoïdes chroniques et les lymphomes non hodgkinien
E	BiTES (<i>Bispecific T cell EngagerS</i>), anticorps à deux chaînes variables dont l'une cible un antigène spécifique de la cellule tumorale et l'autre cible un antigène spécifique des lymphocytes T	Blinatumomab : α -CD19 et α -CD3	Topp, 2012 et Walter, 2014 et Hoffman, 2014	Leucémies aiguës lymphoblastiques à précurseur B de l'adulte

Tableau 5 Les classes d'AcM ciblant la cellule tumorale.

Les AcM peuvent être classés selon leur mécanisme d'action regroupés dans ce tableau avec des exemples précis référencés qui sont validés par la FDA ou en essais cliniques actuellement.

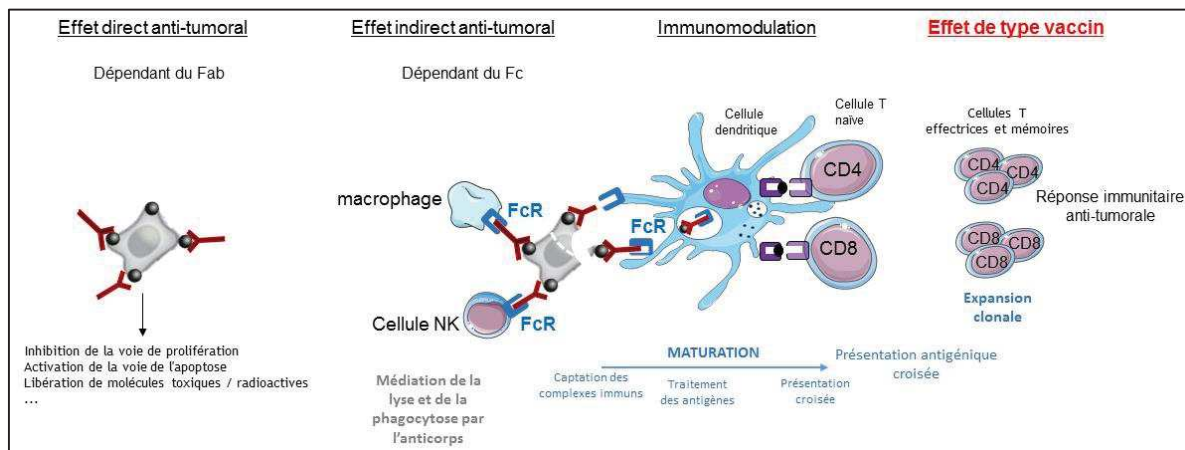


Figure 20 Les effets immunomodulateurs des AcM (adapté Michaud et al. 2014).

La partie Fab de l'Ac va pouvoir agir directement avec sa cible comme nous l'avons déjà vu dans le chapitre sur les AcM. Mais grâce à sa partie Fc, l'AcM est capable de recruter des acteurs de l'immunité innée tels que les cellules NK ou encore les macrophages. Ainsi il permet d'augmenter la lyse tumorale par des mécanismes d'ADCC et de favoriser la formation de complexes immuns (Michaud et al. 2010). Ces complexes immuns sont captés par les cellules dendritiques, permettent une maturation optimale et une meilleure présentation antigénique. Cette présentation antigénique efficace, active les lymphocytes T cytotoxiques médiée par la liaison du FcγR (Michaud et al. 2010; Nasser et al. 2010). La réponse immunitaire qui en résulte se traduit par une réponse mémoire cellulaire et humorale associée à une protection sur le long-terme (Gros et al. 2008). Ainsi un AcM favorise l'émergence d'une réponse immune endogène contribuant à la protection sur le long-terme (Gros et al. 2005).

ii. Les effets immunomodulateurs des AcM ciblant la cellule tumorale.

Au début des années 2000, le concept d'une surveillance des tumeurs par le système immunitaire s'est enrichi grâce à des études de grandes cohortes de patients atteints de divers cancers. Ces études suggèrent des effets de type vaccin chez des patients traités avec le Rituximab (Cartron et al. 2004) mais également une immunomodulation chez des patientes traitées avec le Trastuzumab (Taylor et al. 2007) soulignant l'implication du SI dans les effets cliniques observés.

Parallèlement, la première preuve de concept des effets de type vaccin est démontré dans un modèle de leucémie viro-induite par le rétrovirus FrCas^E en utilisant un AcM neutralisant qui se lie à l'enveloppe du rétrovirus (Gros et al. 2005; Nasser et al. 2013; Michaud et al. 2010).

Cette preuve de concept a été reproduite dans deux modèles cancéreux, le lymphome B avec un anti-CD20 (Abès et al. 2010) et un modèle solide de cancer du sein avec l'anti HER2 (S. Park et al. 2010) (Figure 20).

Dans le cadre du lymphome B, les auteurs démontrent pour la première fois qu'un traitement avec l'anti-CD20 induit une protection contre les cellules tumorales exprimant le CD20 avec une amélioration durable de la survie dépendante de la présence de la partie Fc de l'AcM anti-CD20. Seules les cellules CD4 + étaient nécessaires au début du traitement, mais les cellules CD4 + et CD8 + étaient nécessaires après la stimulation tumorale pour assurer la protection. Ces résultats démontrent que les mAb anti-CD20 exercent des effets thérapeutiques en induisant une réponse immunitaire cellulaire adaptative, en dehors de tout mécanisme direct impliquant des effecteurs de l'immunité innée. Le rituximab, est le premier AcM approuvé en 1998 par la FDA et en 2000 par l'EMA (European Medicines Agency) pour un usage thérapeutique dans le traitement des lymphomes (**Figure 3**). Le traitement avec le rituximab est efficace chez plus de 50% des patients atteints de lymphomes non hodgkinien folliculaires mais il n'est pas curatif (Boross P., Am J. Cancer Research, 2012).

Concernant la thérapie par l'AcM anti-HER2 ou ErbB2 (récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain), une mutation présente dans 15 à 20% des cancers du sein humains primaires (Kast et al. 2017), Park et al. démontrent que l'efficacité de l'AcM n'est pas uniquement liés à la cytotoxicité induit par le FcR mais dépend également de l'immunité adaptative. Le pronostic des patientes Her2-positive initialement très mauvais (Slamon et al. 1987) a largement évolué depuis l'introduction du trastuzumab, l'AcM humanisé recombinant de classe IgG1 dirigé contre HER2.

Toutes ces données relativement récentes sur les effets des AcM anti-tumeur soulignent leur capacité à induire une protection à long terme du fait de leur capacité à promouvoir une réponse adaptative spécifique de type mémoire via leur partie Fc (Figure 20).

Plus récemment, une étude de phase I étudie pour la première fois les effets d'un AcM anti-tumoral chez des patients atteints de mélanome qui échappent ou sont réfractaires aux traitements actuels (Khalil et al. 2016). L'AcM anti-tumoral utilisé, l'IMC-20D7S, est une IgG1 humaine recombinante dirigée contre la protéine TYRP-1. TYRP-1 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée dans les mélanocytes et impliquée dans la synthèse de la mélanine. Cette protéine est surexprimée dans les mélanocytes tumoraux ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante (Tai et al. 1983; Ghanem et Fabrice 2011). Parmi les 27 patients enrôlés dans l'étude, un patient présente une régression complète et dans 41% des cas on observe un contrôle de la maladie définie comme une phase de stabilisation ou mieux. L'AcM est bien toléré par les patients avec une activité anti-tumorale évidente et encourageante pour les thérapies à venir.

Mieux comprendre les mécanismes mis en place lors de l'utilisation de ces AcM anti-tumoraux représente un enjeu capital en oncologie pour associer de façon efficace d'autres thérapies afin de potentialiser les effets vaccins générés pour éliminer la tumeur et mettre en place une réponse immunitaire anti-tumorale efficace et durable.

iii. Les AcM ciblant le système immunitaire.

Le début du XXIème siècle correspond à une nouvelle aire de thérapies immunomodulatrices. En effet, la compréhension des mécanismes d'échappement conduisant à l'inefficacité de la réponse immune anti-tumorale a conduit au développement d'AcM ciblant des points de contrôles immunitaires aussi nommés « anti-immune checkpoints ». Il s'agit d'une révolution dans les thérapies anti-cancéreuses, car ce sont les premiers traitements ciblant directement les cellules immunitaires et non plus uniquement la cellule tumorale. La première génération d'inhibiteurs de points de contrôles immunitaires fonctionne par blocage des interactions du récepteur et / ou du ligand des molécules, tels que CTLA-4 et PD-1, impliqués dans l'inhibition des fonctions effectrices des lymphocytes T (Topalian, Drake, et Pardoll 2015).

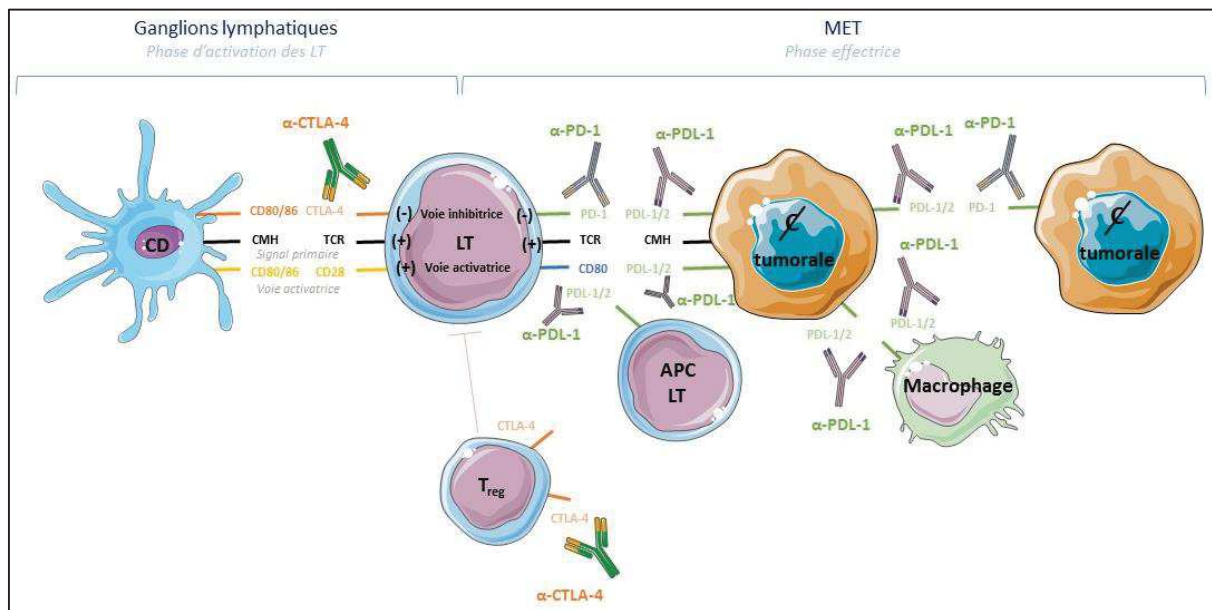


Figure 21 Les mécanismes des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires.

Les AcM inhibant les points de contrôles immunitaires inhibent l'activation des cellules qui expriment le récepteur ou le ligand.

Les α -CTLA-4.

L'ipilimumab, un α -CTLA-4, est le premier inhibiteur de point de contrôle immunitaire développé et approuvé en 2011 par la FDA (United states food and drugs administration) et l'EMA (European medicines agency) (Chapman et al. 2011; Hodi et al. 2010). Cet AcM agit par inhibition de la liaison de CTLA-4 à son ligand (Morse, 2015) (**Figure 21** partie de gauche). Testé dans deux essais cliniques de phase III sur des patients atteints de mélanome avancé, l'ipilimumab triple l'espérance de vie de 20% des patients avec une survie sur le long-terme prolongée de 3 ans après la thérapie (Postow, Callahan, et Wolchok 2015). Ainsi, l'ipilimumab est devenu le traitement de première ligne pour les patients atteints de mélanome. D'autres molécules ciblant CTLA-4, ont été développées par la suite. Par exemple le Tremelimumab, utilisé en monothérapie ou en combinaison avec un α -PD-1, et le durvalumab (α -PD-L1) dans les cancers du poumon à petites cellules, les cancers gastriques, du pancréas, les cancers du sang et les mélanomes avancés (Ribas, Kefford, et al. 2013). Nous reviendrons sur les combinaisons thérapeutiques associant l' α -CTLA-4 dans le chapitre suivant.

Les α -PD-1/ α -PD-L1.

Suite au succès de l'ipilimumab, d'autres stratégies thérapeutiques ont été développées pour lever le frein de la réponse immunitaire suite à la découverte et à la caractérisation des points de contrôles immunitaires dont nous avons parlé dans le chapitre sur l'échappement tumoral. Ainsi, de nombreux α -PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab approuvé par la FDA en 2014...) et α -PD-L1 (Atezolizumab approuvé par la FDA en 2015, Durvalumab approuvé par la FDA en 2018...) sont développés pour bloquer l'interaction entre le récepteur et son ligand, interaction qui inhibe les fonctions des lymphocytes T (**Figure 21** partie de droite). Des essais cliniques menés sur des patients atteints de mélanome à un stade avancé, démontrent de meilleurs résultats des thérapies α -PD-1 ou α -PD-L1 qu'une thérapie α -CTLA-4 (Sharon et al. 2014) avec moins d'effets secondaires (Topalian et al. 2012). L'atezolizumab (α -PD-L1) est approuvé par la FDA en octobre 2016 dans le traitement des patients atteints de NSCLC métastasés qui évoluent malgré un traitement de chimiothérapie. De plus, une étude de phase II et III dans le NSCLC, compare les effets de l'atezolizumab à une chimiothérapie, le docetaxel (Rittmeyer et al. 2017). L'atezolizumab améliore la survie de 4.2 mois contre 2.4 mois pour le docetaxol seulement. Il est approuvé par la FDA en octobre 2016 dans le traitement des patients atteints de NSCLC métastasés qui évoluent malgré un traitement de chimiothérapie. Les inhibiteurs de points de contrôles immunitaires ciblant la voie PD-1 ont suscité un grand intérêt, avec des taux de réponses de 20 à 30% en moyenne. Cela inclut les réponses chez des patients atteints de mélanome, du cancer du poumon non à petites cellules, du cancer du poumon à petites cellules, du cancer du rein, du lymphome de Hodgkin, du cancer hépatocellulaire, du cancer de la vessie et du cancer du sein (L. Chen et Han 2015). De nombreux essais cliniques sont en cours pour associer ces molécules inhibant la voie PD-1/PD-L1 avec d'autres thérapies cancéreuses, associations que nous développons dans le chapitre 5.

D'autres thérapies visant des points de contrôles immunitaires.

De tels résultats ont permis d'ouvrir la voie au développement d'inhibiteurs d'autres points de contrôles immunitaires tel que LAG-3 qui, comme PD-1, est exprimé sur les cellules T

épuisées. Bien que les mécanismes soient encore mal compris, il semble que LAG-3 fonctionne au moins en partie en reconnaissant et en supprimant les réponses aux CMH de classe II (Lui et Davis 2018). Le traitement par un Ac inhibant LAG-3 (IMP321) semble être en corrélation avec le développement d'un phénotype effecteur dans les lymphocytes T CD8 mais pas dans les lymphocytes T CD4 périphériques, bien que plusieurs patients présentent une stabilisation de la maladie sans réponse objective (Brignone et al. 2007, 2009). Ces résultats encourageants favorisent le développement de nombreux essais chez l'Homme avec des molécules ciblant LAG-3 (Legat et al. 2016; Andrews et al. 2017). D'autres inhibiteurs de points de contrôles immunitaires tels que les thérapies α -Tim-3 présentent une activité prophylactique et thérapeutique modeste dans des modèles de sarcomes, de mélanomes et de cancers de la prostate. Cependant, des études comparatives et combinées d' α -Tim-3 avec des α -CTLA-4 ou des α -PD-1 suggèrent que ces agents sont bien tolérés et efficaces en combinaison (Ngiow et al. 2011).

Il est également possible de cibler la réponse cytotoxique avec des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires sur les cellules NK. IPI-2101 (1-7F9), développé par Innate Pharma, est un AcM de type IgG4 α -Ig-like (KIR) entièrement humain destiné au traitement des malignités hématologiques, telles que la leucémie myéloïde aiguë et le myélome multiple. Dans des études précliniques, des tests *in vitro* ont mis en évidence la liaison spécifique d'IPI-2101 à KIR2DL1, 2 et 3, et KIR2DS1 et 2. L'exposition à l'IPI-2101 de lignées cellulaires cibles transfectées par KIR conduit à une augmentation de la lyse médiée par des cellules NK (Alici 2010). Cet AcM améliore la fonction des cellules NK contre les cellules cancéreuses bloquant l'engagement du KIR inhibiteur avec les ligands, favorisant la formation de complexes immunitaires et la cytotoxicité des cellules NK (Benson et al. 2011). 45.5% des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules ont une expression positive de KIR inhibiteurs dans le tissu tumoral après avoir été traités avec des AcM α -PD-1. La résistance au traitement par AcM α -PD-1 pourrait être liée au KIR. Le HLA / KIR inhibiteur pourrait se combiner avec la voie de signalisation PD-1 / PD-L1 régulant négativement l'immunité tumorale (He et al. 2018).

Comme nous l'avons vu précédemment (p53), des points de contrôle activateurs peuvent aussi être des cibles intéressantes. Le premier essai clinique de phase I avec un AcM α -OX40 a été testé en monothérapie chez des patients atteints d'un cancer avancé (NCT01644968). 12 patients sur 30 présentent une régression d'au moins une lésion métastatique (Curti et al. 2013).

iv. Les limites de ces thérapies.

Le recul actuel des résultats cliniques permet d'identifier trois grandes populations de patients - (1) ceux qui répondent initialement et continuent à répondre (répondeurs), (2) ceux qui ne répondent jamais (résistance innée) et (3) ceux qui réagissent initialement mais développent une tumeur à plus ou moins long-terme (résistance acquise) (Pitt et al. 2016; Restifo, Smyth, et Snyder 2016; O'Donnell et al. 2017; Sharma et al. 2017). De manière générale, 20 à 30% des patients répondent à ce type de thérapies. Des problèmes subsistent quant à la classification des répondeurs et des non-répondeurs, en particulier compte tenu de l'hétérogénéité des schémas de réponses pouvant être observées avec les inhibiteurs de points de contrôles immunitaires.

Par ailleurs, environ 10% à 20% des patients traités développent des effets secondaires importants avec des auto-immunités graves, des colites inflammatoires, des myocardites, des pneumonies ou des éruptions cutanées qui nécessitent des prises en charges particulières.

L'une des difficultés principales dans les thérapies anti-cancéreuses est de trouver les bons marqueurs, et suivre leur expression tout au long de la maladie afin de déterminer quelle drogue administrer, à quel moment et à quelle dose.

Plusieurs inhibiteurs de points de contrôles immunitaires sont donc largement rentrés dans les protocoles de thérapies anti-cancéreuses. Bien que de nouvelles molécules entrent en essais cliniques très régulièrement, les stratégies de thérapies consistent principalement à combiner ce types de molécules avec d'autres inhibiteurs de points de contrôles immunitaires ou des thérapies conventionnelles pour contrer les échappements tumoraux en stimulant ou bloquant

des voies non redondantes impliquées dans les mécanismes d'échappements (Benzaquen et al. 2018).



Figure 22 Représentation de l'augmentation des essais de combinaisons thérapeutiques associant un α -PD-1 ou α -PD-L1 à d'autres thérapies anti-cancéreuses.

Les bulles représentent la quantité de patients enrôlés dans les études, et les bulles de la même couleur représentent les différents types de cancers dans lesquels les études sont réalisées.

5. Combinaisons thérapeutiques.

Les diversités cellulaires ainsi que la variété des facteurs moléculaires impliqués dans la survie, la croissance et la dissémination des cellules cancéreuses sont autant de limites au succès des monothérapies. Il est clair désormais que l'avenir des thérapies anticancéreuses repose sur les combinaisons thérapeutiques (**Figure 22**). Les approches de thérapies combinées ont pour principe d'utiliser deux ou plusieurs molécules qui agissent sur des voies et des mécanismes distincts mais complémentaires afin d'obtenir des effets synergiques ou additifs. Cela permet ainsi d'éliminer un plus grand nombre de cellules cancéreuses et de diminuer la probabilité de développement de résistances. De plus lorsque des médicaments ayant des effets différents sont combinés, chaque médicament peut être utilisé à sa dose sub-optimale dans le but de limiter les effets secondaires intolérables.

Type tumoral	Traitement	Points de mesures	Essais
NSCLC	Comparaison de patients sous pembrolizumab ayant reçu ou non de la radiothérapie au préalable	Les patients ayant reçu des doses de radiothérapies au préalable ont une survie sans progression et une survie plus longue	(Shaverdian et al. 2017)
Cancers métastatiques non opérables	Radiothérapie + Durvalumab	Bonne tolérance	(Levy et al. 2016)
Tumeurs solides métastatiques	Ipilimumab + Radiothérapie ablative stéréotactique	Marqueurs T périphériques peuvent prédire les bénéfices cliniques et activation immunitaire systémique plus importante après une irradiation du foie	(C. Tang et al. 2017)
Mélanome métastatique	Radiothérapie palliative + ipilimumab	Bien tolérée. 50% des patients présentent un bénéfice clinique incluant des réponses complètes ou partielles	(Hiniker et al. 2016)
NSCLC	Radiothérapie stéréotaxique combinée à l'Avelumab.	En cours: Tolérabilité	NCT03050554
NSCLC	Radiation non ablative en mono-fractionnement en association avec le pembrolizumab.	En cours : Survie	NCT02658097
Tumeur cérébrale	Radiochirurgie stéréotaxique plus ipilimumab, nivolumab ou pembrolizumab.	En cours : Réponse au traitement à 18 mois	NCT03458455
Carcinome rénal métastatique et urothélial	Nivolumab / Atezolizumab.	En cours: Meilleurs taux de réponse, toxicité, survie	NCT03115801
	Nivolumab / Atezolizumab plus radiothérapie.		
NSCLC	Traitement radiothérapeutique quotidien jusqu'à 10 jours pendant l'immunothérapie standard. Les patients qui refusent de suivre une thérapie de radiation reçoivent une immunothérapie standard	En cours: Survie sans progression	NCT03176173

Tableau 6 Essais cliniques d'inhibiteurs de points de contrôles immunitaires en association avec la radiothérapie (adapté de Yan et al. 2018).

a. Radiothérapie/Immunothérapie.

Nous avons précédemment souligné l'effet immunomodulateur des radiothérapies. Utiliser le potentiel immunomodulateur des radiothérapies en plus de leur capacité à éliminer les cellules tumorales a conduit à de nouvelles stratégies de traitement basées sur la combinaison radiothérapie et immunothérapie.

Une étude préclinique associant une radiothérapie fractionnée à un Ac α -CLTA4 (9H10) montre une amélioration de la réponse anti-tumorale sur le site primaire et un effet abscopal sur le site secondaire et les métastases comparativement à la radiothérapie fractionnée seule (Dewan et al. 2009). Les auteurs montrent, dans deux modèles murins de cancers (cancer du sein et cancer du côlon), une fréquence de lymphocytes T CD8 sécrétant de l'IFN- γ proportionnelle à l'inhibition de la tumeur secondaire.

Des réponses abscopales sont aussi observées chez plus de 50% des patients atteints de mélanome avancé et traités avec une combinaison d'AcM α -CTLA-4 suivie de radiothérapie (43% des patients ont une réponse partielle et 10% présentent une stabilisation de la progression tumorale) (Grimaldi et al. 2014).

De plus, dans un modèle murin de gliome, une amélioration de la survie a été démontrée avec un traitement combiné α -PD-1 et radiations, par rapport aux monothérapies, avec une survie médiane de 25 jours sans traitement, 27 jours avec l' α -PD-1 seul, 28 jours avec la radiothérapie seule et 53 jours avec la combinaison (Zeng et al. 2013). Il a aussi été démontré que la radiothérapie hypo-fractionnée peut améliorer l'efficacité de la thérapie α -PD-1 chez les patients atteints de mélanomes métastatiques (Roger et al. 2018).

D'autres combinaisons thérapeutiques sont regroupées dans le **Tableau 6**.

Type tumoral	Traitement	Points de mesures	Essais
NSCLC phase I	Cohorte A: Pembrolizumab + carboplatine et paclitaxel	Taux de réponse global (ORR): 52% sans progression (PFS): 10 mois	(Rittmeyer et al. 2017)
	Cohorte B: Pembrolizumab + carboplatine et plaxclitaxel + bevacizumab		
	Cohorte C: Pembrolizumab + pemetrexed		
NSCLC phase II	Pembrolizumab + carboplatine + pemetrexed	ORR:55% et PFS: 19 mois	(Langer et al. 2016)
	Carboplatine + pemetrexed	ORR : 29% et PFS : 8,9 mois	(Borghaei et al. 2017)
NSCLC	Nivolumab + gemcitabine + cisplatine	PFS : 5,7 mois et OS : 11,6 mois	(Rizvi et al. 2016)
	Nivolumab + pemetrexed + cisplatine	PFS : 6,8 mois et OS : 19,2 mois	
	Nivolumab (10mg/kg) + carboplatine et paclitaxel	PFS : 4,8 mois et OS : 14,9 mois	
	Nivolumab (5mg/kg) + carboplatine et paclitaxel	PFS : 7,1 mois	
NSCLC	Chimiothérapie seule ou en combinaison avec le Nivolumab	En cours PFS et OS	(Paz-Ares et al. 2017)
NSCLC	Atezolizumab + carboplatin et paclitaxel	ORR : 36% PFS : 7,1 mois et OSS : 68%	(Ryu et Ward 2018)
	Atezolizumab + carboplatin et pemetrexed	ORR : 68% et PFS : 8,4 mois	
	Atezolizumab + carboplatine + nab-paclitaxel	ORR : 46% PFS : 5,7 mois et OS : 17 mois	
NSCLC	Durvalumab + tremelimumab + chimiothérapie	En cours PFS puis OS et ORR	NCT02537418
	Durvalumab + chimiothérapie		
	Chimiothérapie		
Cancer œsophagien	Durvalumab en combinaison avec des chimiothérapies et radiothérapies standards	En cours: effets secondaires, dose limite de toxicité puis ORR, PFS et OS	NCT02735239
NSCLC	Ipilimumab + carboplatine et paclitaxel	OS : 13,5 mois et PFS : 5,6 mois	(Govindan et al. 2017)
	Placebo + carboplatine et paclitaxel	OS : 12,4 mois et PFS : 5,6 mois	
Mélanome métastatique	Ipilimumab + temozolomide	La SSP à 6 mois était de 45% avec une OS médiane de 24,5 mois. 10 (15,6%) ont confirmé des réponses partielles et 10 (15,6%) ont confirmé des réponses complètes. Pas de décès / toxicités inattendues	(Patel et al. 2008)
NSCLC	Ipilimumab + etoposide et platinum	OS : 11 mois et PFS : 4,6 mois	(Reck et al. 2016)
	Placebo + etoposide et platinum	OS : 10,9 mois et PFS : 4,4 mois	

Tableau 7 Essais cliniques terminés et en cours évaluant la chimiothérapie en association avec des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires (adapté de Yan et al. 2018).

b. Chimiothérapie/Immunothérapie.

Dans la mesure où les chimiothérapies, tout comme la radiothérapie, peuvent moduler la réponse immunitaire avec l'induction d'une ICD comme nous l'avons vu au début de cette partie, il est intéressant de mesurer le bénéfice d'une combinaison d'immunothérapies en utilisant les chimiothérapies comme des adjuvants.

Dans un modèle murin de gliome (GL261-Luc2), l'utilisation en combinaison de chimiothérapies (doxorubicine, cisplatine ou methotrexate), d'un α -PD-1 et d'un vaccin (GVAX) permet une protection complète de 70% des souris traitées alors que la chimiothérapie seule, n'induit aucune protection (Ladle et al. 2017).

Certains essais cliniques évaluent l'efficacité de ces associations. Notamment la combinaison de dacarbazine et d'ipilimumab comparée à l'ipilimumab seul, chez des patients atteints de mélanomes métastatiques, montre un bénéfice certain, avec une survie à trois ans presque deux fois supérieure dans le groupe dacarbazine et ipilimumab (Robert et al. 2011).

D'autres combinaisons thérapeutiques sont regroupées dans le [Tableau 7](#).

c. Combinaisons d'immunothérapies.

D'autres stratégies de combinaisons consistent à associer des immunothérapies entre elles, afin de stimuler, par des voies non redondantes, la réponse immunitaire anti-tumorale. Il peut s'agir d'une combinaison associant des AcM qui ciblent des voies inhibitrices différentes ou bien d'un AcM ciblant une voie inhibitrice associée à un agoniste d'une voie activatrice.

Dans un modèle de gliome de souris (GL261-luc2), une double thérapie α -Tim-3 et α -PD-1 améliore la survie des souris traitées comparé à la monothérapie α -Tim-3. Associée à de la radio-chirurgie, cette bithérapie permet d'obtenir 100% de survie associée à une augmentation de l'infiltrat immunitaire (Kim et al. 2016).

Par ailleurs, la combinaison de thérapies associant des Ac α -CTLA-4, α -CD137 et α -OX40 montre une efficacité anti-tumorale locale et systémique dépendante des lymphocytes T CD8

dans un modèle de lymphome murin (A20) et dans un modèle de tumeur solide (MC38) (Hebb et al. 2018). Le blocage du récepteur à l'adénosine associé à un α -CTLA-4 permet d'éliminer 90% des tumeurs de souris greffées avec la lignée tumorale CT26. Dans 80% des cas, les souris greffées avec la lignée MC38 ont une survie prolongée contre seulement 40% en monothérapie. Bloquer de façon combinée les deux voies CTLA-4 et PD-1 (ipilimumab / nivolumab) conduit à une amélioration de la survie (Practitioners s. d.). De plus, bloquer de façon synergique PD-1 et LAG-3, deux marqueurs surexprimés sur les cellules T anergiques, permet de ralentir la progression de la tumeur chez des patients atteints de mélanome (Ascierto et al. 2017).

L'agoniste OX40 est également testé en association avec un AcM α -PD-L1 (durvalumab) ou α -CTLA-4 (tremelimumab) (NCT02705482). La combinaison s'appuie sur l'association d'un activateur du SI, OX40, à un Ac supprimant le frein immunitaire de la réponse anti-tumorale en bloquant les points de contrôle PD-L1 ou CTLA-4. Dans des modèles précliniques de cancers de la prostate et un modèle de sarcome, la thérapie combinée α -OX40/ α -CTLA-4 améliore la régression tumorale et la survie (Redmond, Linch, et Kasiewicz 2014).

Dans le mélanome, la présence d'IDO est de mauvais pronostic (Chevolet et al. 2014; Speeckaert et al. 2012). PD-L1 et IDO sont deux des cibles médicamenteuses intéressantes tels que l'avelumab (MERCK) ou l'épacadostat disponible par voie orale (INCB024360, Incyte). La combinaison d'inhibiteurs de l'IDO et d'un anticorps α -PD1 a démontré une efficacité prometteuse dans les premiers essais cliniques et est actuellement à l'étude dans le cadre d'essais de phase III plus importants (Gangadhar et al. 2017; Hamid et al. 2017, 20).

D'autres exemples de combinaisons thérapeutiques sont regroupées dans le **Tableau 8**.

Traitement	Drogue utilisée	Drogue partenaire	NCT	Statut
PD-1	Pembrolizumab	iMIQUIMOD	3276832	Recrutés
PD-1	Nivolumab	PD-L1/IDO vaccin peptide	3047928	Recrutés
PD-1	Pembrolizumab	IMP321 (LAG-3)	2676869	Recrutés
CTLA-4 et PD-1	Ipilimumab et nivolumab		3354962	Non recrutés
CTLA-4 et PD-1	Ipilimumab et pembrolizumab	Aspirin®	3396952	Recrutés
PD-1 et Tim-3	PDR001 et MGB453		2608268	Recrutés
CTLA-4 et PD-L1	Durvalumab et Tremelimumab	IMCgp100 ⁶	2535078	Recrutés

Tableau 8 Essais cliniques du blocage des points de contrôles immunitaires associés à d'autres stratégies immunomodulatrices du mélanome (adapté de Elia, Caputo, et Bellone 2018).

d. Combinaisons molécules inhibitrices spécifiques/Immunothérapie.

Les combinaisons associant des molécules inhibitrices spécifiques, tels que les inhibiteurs de BRAF, et des immunothérapies, telles que des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires (**Tableau 9**), permettent d'utiliser en synergie les effets de chacune de ces thérapies.

Type tumoral	Traitement	Points de mesures	Essais
Mélanome muté BRAF V600	Dabrafenib +/- Trametinib + Ipilimumab	Toxicité sévère	(Minor et al. 2015)
Mélanome muté BRAF V600	Vemurafenib + Ipilimumab	Toxicité sévère	(Ribas, Hodi, et al. 2013)
Mélanome sans ou avec mutation BRAF V600	Durvalumab + Dabrafenib + Trametinib	Tolérable sans toxicité	(Ribas et al. 2015)
	Durvalumab + Trametinib		
	Trametinib		
Mélanome muté BRAF V600	Vemurafenib + Ipilimumab	Grand toxicité	(Amin et al. 2016)
Mélanome métastatique	Dabrafenib + Trametinib suivie d'ipilimumab + nivolumab quand progression vs ipilimumab + nivolumab suivie de Dabrafenib + Trametinib	En cours: OS puis PFS	NCT0222478 1

Tableau 9 Essais cliniques terminés et en cours évaluant la combinaison des molécules inhibitrices et d'inhibiteurs de points de contrôles immunitaires (Yan et al. 2018).

En oncologie, l'arsenal thérapeutique actuel montre des effets cliniques très encourageants en faveur d'un rôle primordial de la réponse immunitaire anti-tumorale. L'efficacité sur le long-terme des immunothérapies ne s'appliquent néanmoins qu'à un pourcentage très faible de patients. L'échappement thérapeutique de certains patients souligne la nécessité de développer des combinaisons efficaces pour contourner les mécanismes mis en place. Dans ce contexte, la recherche en cancérologie vise à mettre en évidence, au sein du MET, ces mécanismes cellulaires et moléculaires afin de développer des stratégies thérapeutiques rationnelles et efficaces pour induire une réponse anti-tumorale robuste sur le long-terme.

Objectifs des travaux de thèse.

A. Contexte scientifique.

Les programmes de recherche développés au sein de l'équipe du Docteur Nathalie Bonnefoy visent une meilleure compréhension des relations entre les cellules cancéreuses et les cellules du SI. Un intérêt particulier est porté à la contribution des effecteurs de l'immunité dans la prévention ou le traitement du cancer, et au rôle des médiateurs de l'inflammation dans le développement du cancer. Le Docteur Laurent Gros a développé au sein de cette équipe, un projet qui s'attache à étudier les effets immunomodulateurs d'un AcM qui cible la cellule tumorale dans un modèle syngénique de mélanome murin.

Parmi les cancers de la peau, il existe les carcinomes cutanés et les mélanomes. Bien que les mélanomes ne représentent que 10%, il s'agit du cancer de la peau le plus agressif. Selon l'OMS, le nombre de nouveaux cas de mélanome double tous les dix ans depuis 1945. Il se place ainsi au 9^{ème} rang des cancers les plus fréquents en France. Cette tumeur est issue de la transformation maligne de cellules de la couche basale de l'épiderme, les mélanocytes, qui sont responsables de la synthèse de mélanine, un pigment qui colore la peau. Le principal facteur de risque des cancers de la peau et plus précisément des mélanomes, est l'exposition aux rayonnements ultraviolets provenant du soleil ou d'une source artificielle. Les antécédents familiaux de mutations des voies MAP kinases RAS/RAF/MEK/ERF, sont des facteurs constitutionnels qui peuvent aussi intervenir dans la survenue des mélanomes. Lorsque la maladie est localisée, la chirurgie reste le traitement principal associé ou non, selon le risque de récives, à un traitement adjuvant d'IFN- α -2b (Kirkwood et al. 1996; Cameron et al. 2001). Une fois que la maladie a atteint le stade métastatique, les options thérapeutiques sont limitées. Malgré une faible efficacité, avec des taux de réponses de 8 à 20% et une médiane de survie de 4 à 6 mois seulement (S. M. Lee, Betticher, et Thatcher 1995; Michael B. Atkins 1998), la dacarbazine (agent de chimiothérapie) est longtemps restée la seule option thérapeutique (Michael B. Atkins 1998). Par la suite, l'administration d'IL-2 a démontré pour la première fois qu'une modulation du SI favorisait une régression tumorale dans le cadre de mélanome (Lotze et al. 1986; M. B. Atkins et al. 1999). Cependant ce type de thérapie entraîne

des réponses complètes durables chez seulement 4 à 6% des patients avec d'importants effets indésirables associés au traitement. Le développement des petites molécules inhibiteurs de tyrosines kinases, tels que les α -BRAF avec le Vemurafenib (Zelboraf®) en 2012, le Dabrafenib (Tafinlar®) en 2014 et plus récemment l'Encorafenib (Braftovi®) et l' α -MEK Binimetinib (Mektovi®), ont permis d'améliorer significativement la survie des patients atteints de mélanome métastatique porteurs de la mutation BRAF^{V600E} ou BRAF^{V600K} (p62). Un essai clinique de phase 3 testant l'association du Braftovi® et du Binimetinib® dans le traitement de mélanomes non résecables mutés BRAF montre une augmentation de la médiane de survie de 33.6 mois avec une survie globale à 2 ans de 58% des patients contre 16.9 mois pour le Vemurafenib en monothérapie (Dummer et al. 2018). Néanmoins, ces traitements ne s'adressent qu'à un pourcentage restreint de patients porteurs des mutations BRAF (40 à 60% des patients atteints de mélanomes métastatiques) et de nombreuses résistances thérapeutiques sont rapportées (Manzano et al. 2016). Plus récemment, l'ipilimumab, ciblant CTL-4, a été approuvé en 2011 par la FDA et l'EMA dans le cadre du traitement des mélanomes métastatiques suivi du Pembrolizumab et du Nivolumab (α -PD-1) respectivement en 2014 et 2017 ainsi que des inhibiteurs de PD-L1 tels que l'atezolizumab en 2016 et le durvalumab en 2017 (Chapman et al. 2011; Hodi et al. 2010). Ces thérapies améliorent de façon significative la survie des patients (p77). Ce type de traitement nécessite souvent un délai avant d'observer une efficacité cliniquement décelable soulignant la nécessité de développer des biomarqueurs prédictifs et pronostique. Bien que l'arsenal thérapeutique du mélanome métastatique soit en pleine expansion il existe toujours un besoin critique de thérapies plus efficaces et mieux tolérées, qui augmentent le pourcentage de survie associé à une réponse immunitaire anti-tumorale efficace sur le long-terme.

Une étude de phase I récente étudie pour la première fois les effets d'un AcM qui cible la cellule tumorale chez des patients atteints de mélanome qui échappent ou qui sont réfractaires aux traitements actuels (Khalil et al. 2016). L'AcM anti-tumoral utilisé, l'IMC-20D7S est un AcM recombinant humain IgG1 dirigé contre la protéine TYRP-1. Il s'agit d'une glycoprotéine

transmembranaire exprimée dans les mélanocytes et impliquée dans la synthèse de la mélanine, un pigment colorant la peau. Cette protéine est surexprimée dans les cellules de mélanome ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante (Tai et al. 1983; Ghanem et Fabrice 2011). Parmi les 27 patients inclus dans l'étude, un patient présente une régression complète et dans 41% des cas on observe un contrôle de la maladie défini comme une phase de stabilisation ou une régression tumorale. Les auteurs soulignent l'intérêt d'associer des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires pour potentialiser ces effets. Comprendre les mécanismes d'action de l'AcM α -TYRP-1 est une étape incontournable afin de développer des stratégies efficaces de thérapies combinées.

Dans ce contexte, mon projet s'intéresse à caractériser les effets immunomodulateurs de l'AcM TA99, ciblant la protéine TYRP-1, dans un modèle murin de mélanome afin de développer des stratégies de thérapies combinées pour potentialiser ses effets.

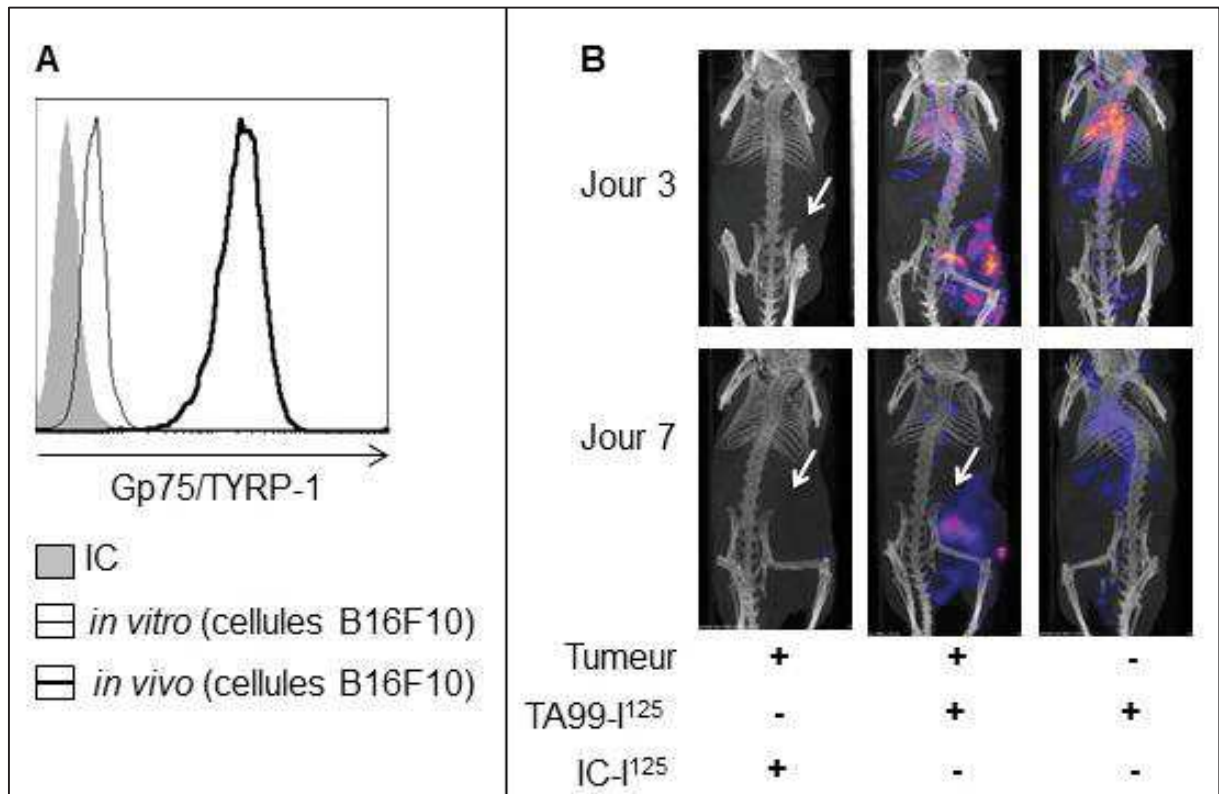


Figure 23 L'AcM TA99 cible la protéine TYRP-1/gp75 *in vivo*.

(A) Analyse de cytométrie en flux représentative de l'expression de gp75 dans des cellules B16F10 *in vitro* (trait fin) ou dans des tumeurs *in vivo* (trait épais). Les résultats sont représentatifs de 4 expériences indépendantes. (B) Images représentatives de SPECT / CT *in vivo* chez des souris porteuses de tumeurs B16F10 après une seule injection (IP) de l'AcM TA99-I125 ou IC-I125 (n = 12).

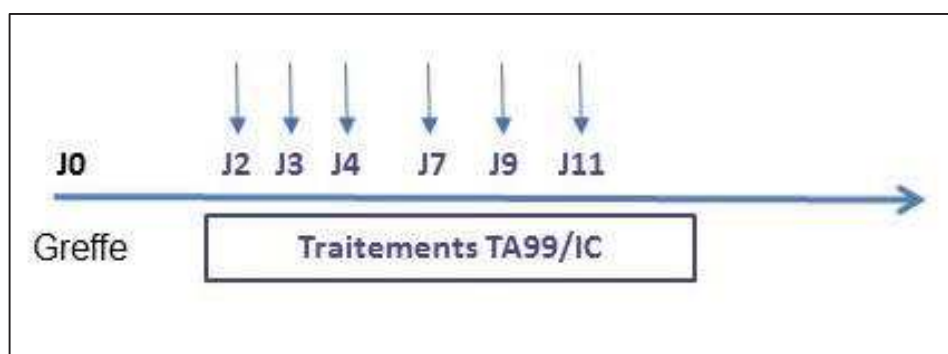


Figure 24 Protocole de traitement.

Les souris greffées avec $5 \cdot 10^4$ cellules B16F10 (SC), sont traitées par injection intrapéritonéale (IP) dès le deuxième jour post-grefe avec 400 μ g d'AcM TA99 (TA99) ou de son contrôle isotypique (IC) suivi de 5 injections supplémentaires d'AcM TA99 ou IC de 200 μ g chacune aux jours 3, 4, 7, 9 et 11.

B. Résultats antérieurs et bases du projet.

Le modèle de mélanome murin B16F10 utilisé dans ce projet est issue de la lignée B16 dont les variants successifs ont été sélectionnés pour leurs capacités à former des nodules tumoraux pulmonaires (Fidler 1975). Il s'agit d'une lignée exprimant peu ou pas les CMH de classe I et II soulignant le caractère peu immunogène de ce type de tumeurs (Ly et al. 2013). La lignée B16F10 greffée en sous cutanée (SC) dans des souris immunocompétentes C57BL/6N surexprime la protéine TYRP-1 ou gp75 que cible l'AcM TA99 (**Figure 23 A**). Par ailleurs, l'étude par SPECT-CT de la bio-distribution de l'AcM TA99 marqué à l'iode 125 confirme l'adressage spécifique de l'AcM TA99 sur la cellule tumorale *in vivo* (**Figure 23 B**).

La lignée cellulaire B16F10 surexprime *in vivo* TYRP1 ou TRP1 (tyrosinase related protein 1) dont la forme mature est également appelée gp75. Il s'agit d'une glycoprotéine de 75kDa appartenant à la famille des métalloenzymes. Ces métalloenzymes, composées de la tyrosinase (Raper 1927), la dopachrome tautomérase (DCT ou Tyrp2) (Aroca et al. 1991) et TYRP-1 ou gp75 (del Marmol et Beermann 1996), jouent un rôle clé dans les mécanismes de mélanogenèse conduisant à la formation de pigments qui colorent la peau (Ghanem et Fabrice 2011) (FIGURE). Ces métalloenzymes partagent une séquence de signalisation commune : deux domaines riches en cystéine et un domaine transmembranaire ainsi que deux sites de liaison $\text{Cu}^{++}/\text{Zn}^{++}$ responsables de leurs activités catalytiques (Olivares et Solano 2009).

Au niveau de la lésion primaire chez des patients atteints de mélanome, la protéine Tyrp1 / gp75 semble être exprimée dans la phase de croissance radiale mais absente de la phase verticale (Fang et al. 2001), suggérant un rôle potentiel dans l'invasion ou la dissémination cellulaire. Renforçant cette idée, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de TYRP-1 à la membrane chez des patients atteints de mélanome métastatique. Néanmoins, à notre connaissance, aucune donnée de la littérature n'a permis d'évaluer le rôle membranaire de cette protéine.

En 1985, Thomson et al caractérisent et produisent pour la première fois un anticorps monoclonal anti-tumoral dirigé contre la protéine Tyrp-1 Humaine et murine, le TA99 (IgG2a) (Thomson et al. 1985). C'est cet anticorps et son contrôle isotypique murin le C1.18.4 (IgG2) qui est utilisé pour traiter les souris greffées avec la lignée B16F10 dans ce projet.

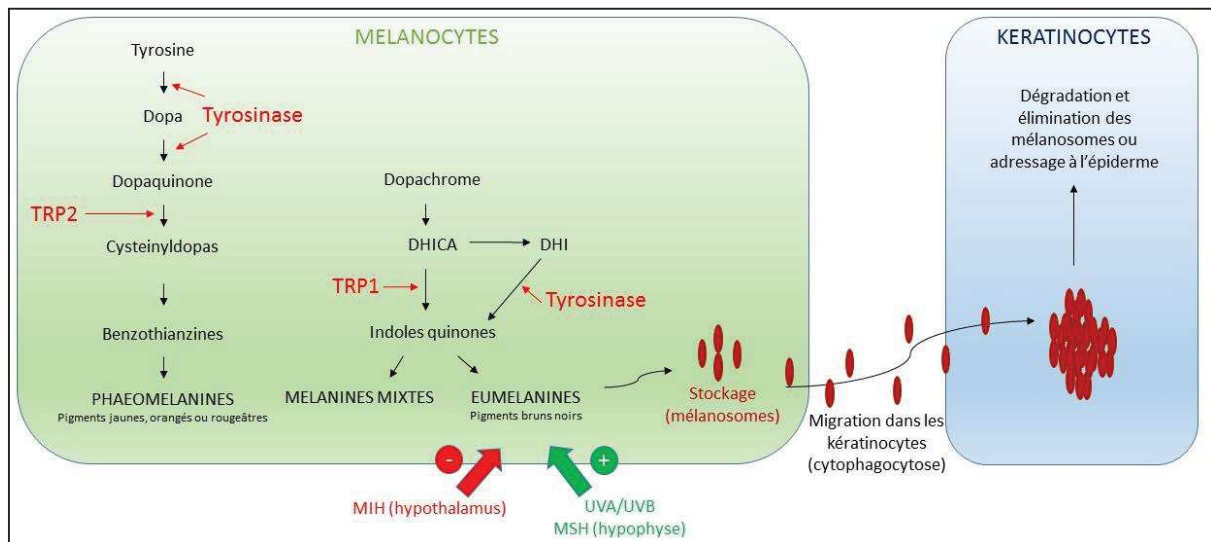


Figure 25 Schéma de la mélanogénèse

La mélanine, un pigment qui colore la peau est produit par les mélanosomes situés dans les mélanocytes, à partir d'un acide aminé apporté par voie sanguine : la tyrosine. La mélanogénèse est régulée par des voies impliquant des voies de signalisation (*RAS/RAF/MEK/ERK*), des facteurs de transcriptions, des hormones (*MSH* : melanocytes stimulating hormone, *MIH* : melanocytes inhibiting hormone) et des facteurs de régulation externe comme les UVA et les UVB. Lorsque les mélanosomes sont chargés en mélanine, ils sont soit dégradés, soit adressés à l'épiderme pour donner sa couleur à la peau. La quantité de mélanocytes est la même pour tous les individus, c'est la qualité de la mélanine sécrétée qui modifie le phototype à savoir le ratio de phaeomélanine (coloration jaune à rouge) et d'eumélanine (responsable de la coloration rousse des cheveux et des poils de mammifères).

Afin d'évaluer les effets anti-tumoraux de l'AcM TA99, des souris C57BL/6 immunocompétentes ont été greffées (SC) avec la lignée cellulaire B16F10 et traitées avec l'AcM TA99, son contrôle isotypique (IC) ou du PBS selon le protocole décrit dans la **Figure**

24.

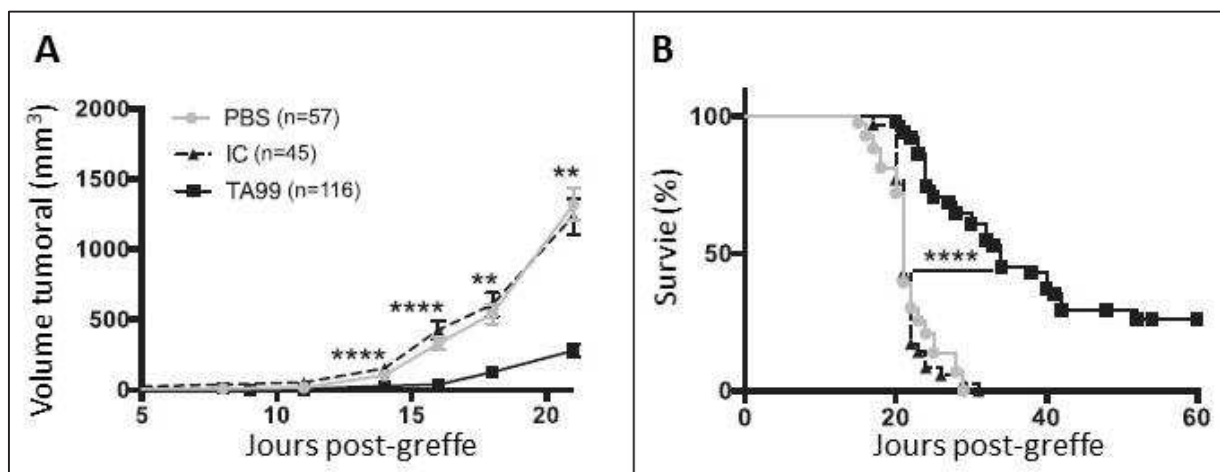


Figure 26 L'AcM ralentit la croissance tumorale et prolonge la survie in vivo.

Les souris greffées en SC avec 5.10^4 B16F10 sont traitées avec du PBS (PBS), le contrôle isotypique (IC) ou l'AcM TA99 (TA99). Courbe de croissance tumorale (mm^3) (A) avec un test non paramétrique de Mann-Whitney et courbe de survie Kaplan Meier (B) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

L'AcM TA99 ralentit la croissance tumorale (**Figure 26 A**) et améliore la survie (**Figure 26 B**) de façon significative par rapport aux contrôles (PBS et IC). Par ailleurs, 30% des souris traitées avec l'AcM TA99 ne développent pas de tumeur (observation jusqu'à 60 jours après la greffe) suggérant une éradication ou un contrôle soutenu de la croissance tumorale (**Figure 26 B**).

C. Objectifs du projet de thèse.

Dans ce contexte, les objectifs de mon travail de thèse ont été les suivants:

- (1) Comprendre les effets immunomodulateurs de l'AcM anti-tumoral TA99 et mettre en évidence les mécanismes responsables de la protection sur le long-terme dans les 30% de souris protégées.
- (2) Mettre en évidence les mécanismes à l'origine de l'échappement des 70% de souris traitées avec l'AcM TA99.

(3) Développer des stratégies de thérapies combinées pour potentialiser la réponse immunitaire anti-tumorale induite par l'AcM TA99.

La première partie de mon travail a fait l'objet d'une publication (They, Michaud et al. 2017). Dans une deuxième partie, je présenterai mes résultats non publiés sur des stratégies de thérapies combinées.

Ce travail de thèse a été développé avec le support de l'Agence de Recherche Nationale Française sous le programme « Investissements d'avenir » et l'agrément du LabEx MAbImprove : ANR-10-LABX-53.

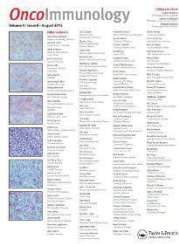
RESULTATS PARTIE 1 :

**Le blocage de PD-1 au moment de l'échappement tumoral
potentialise les effets anti-tumoraux immunomodulateurs
d'un anticorps monoclonal ciblant le mélanome.**

A. Introduction.

Depuis la démonstration des effets immunomodulateurs d'un AcM anti-viral (Gros et al. 2005, 2008; Nasser et al. 2010; Michaud et al. 2010), des études ont caractérisé les effets modulant la réponse immunitaire de l'hôte dans le cadre de thérapies utilisant des AcM ciblant la cellule tumorale tels que le trastuzumab (α -HER2/neu) (S. Park et al. 2010) ou le rituximab (α -CD20) dans des modèles murins immunocompétents (Abès et al. 2010). Ce concept d'immunomodulation par des AcM anti-tumoraux représente un enjeu clé dans les thérapies anti-cancéreuses actuelles pour favoriser une réponse sur le long-terme. Comme présenté précédemment (p89), une étude montre pour la première fois l'effet thérapeutique d'un AcM ciblant la cellule tumorale par reconnaissance de la protéine TYRP-1 dans une cohorte de patients atteints de mélanome avec des effets cliniques prometteurs (Khalil et al. 2016). Néanmoins, ces travaux n'ont pas caractérisé les mécanismes d'action de l'AcM thérapeutique.

Le modèle murin B16F10 permet d'évaluer les effets immunomodulateurs de l'AcM murin ciblant la protéine TYRP-1 (l'AcM TA99). Nos résultats démontrent que l'administration du TA99 conduit à une protection complète, sur long-terme, de 30% des souris dont les effets protecteurs sont liés au développement d'une réponse humorale et cellulaire mémoire. Concernant les 70% de souris qui échappent au traitement par l'AcM TA99 développent une tumeur avec un délai significatif, l'analyse des biopsies tumorales a permis de mettre en évidence une augmentation de l'infiltrat immunitaire de cellules T effectrices. Cependant les LT CD4 et CD8 sur-expriment PD-1 et Tim-3. La double expression PD-1⁺Tim-3⁺ sur les LT CD4 et LT CD8 est liée à une perte de fonctionnalité de ces populations. Les mêmes observations sont faites dans des biopsies de mélanomes métastatiques humains. Suite à ces observations phénotypiques, la stratégie a été de bloquer la voie PD-1/PD-L1 au moment de l'échappement au traitement par l'AcM TA99. Nous avons montré que l'administration d' α -PD-1 permet de réactiver la réponse immunitaire initiée par l'AcM TA99 (cf article ci-après).



PD-1 blockade at the time of tumor escape potentiates the immune-mediated antitumor effects of a melanoma-targeting monoclonal antibody

Laetitia They, Henri-Alexandre Michaud, Ondine Becquart, Virginie Lafont, Bernard Guillot, Florence Boissière-Michot, Marta Jarlier, Caroline Mollevi, Jean-François Eliaou, Nathalie Bonnefoy & Laurent Gros

To cite this article: Laetitia They, Henri-Alexandre Michaud, Ondine Becquart, Virginie Lafont, Bernard Guillot, Florence Boissière-Michot, Marta Jarlier, Caroline Mollevi, Jean-François Eliaou, Nathalie Bonnefoy & Laurent Gros (2017): PD-1 blockade at the time of tumor escape potentiates the immune-mediated antitumor effects of a melanoma-targeting monoclonal antibody, OncoImmunology, DOI: [10.1080/2162402X.2017.1353857](https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1353857)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2017.1353857>

View supplementary material [↗](#)

Accepted author version posted online: 20 Jul 2017.
Published online: 20 Jul 2017.

Submit your article to this journal [↗](#)

Article views: 15

View related articles [↗](#)

View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=koni20>

Download by: [195.220.112.251]

Date: 28 August 2017, At: 00:54

PD-1 blockade at the time of tumor escape potentiates the immune-mediated antitumor effects of a melanoma-targeting monoclonal antibody

Laetitia They^{a,*}, Henri-Alexandre Michaud^{a,*}, Ondine Becquart^{a,b}, Virginie Lafont^a, Bernard Guillot^b, Florence Boissière-Michot^c, Marta Jarlier^d, Caroline Mollevi^d, Jean-François Eliaou^{a,e}, Nathalie Bonnefoy^{a,**}, and Laurent Gros^{a,**}

^aIRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier; INSERM, U1194; Université Montpellier; Institut Régional du Cancer de Montpellier, Montpellier, France; ^bDépartement de Dermatologie, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier et Faculté de Médecine, Université de Montpellier, Hôpital Saint-Eloi, Montpellier cedex 5, France; ^cTranslational Research Department, Institut Régional du Cancer Montpellier, Montpellier, France; ^dBiometrics Unit, Institut Régional du Cancer Montpellier, Montpellier, France; ^eDépartement d'Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier et Faculté de Médecine, Université de Montpellier, Hôpital Saint-Eloi, Montpellier cedex 5, France

ABSTRACT

Tumor antigen-targeting monoclonal antibodies (TA-targeting mAbs) are used as therapeutics in many malignancies and their capacity to mobilize the host immunity puts them at the forefront of anti-cancer immunotherapies. Both innate and adaptive immune cells have been associated with the therapeutic activity of such antibodies, but tumor escape from mAb-induced tumor immune surveillance remains one of the main clinical issues. In this preclinical study, we grafted immunocompetent and immunocompromised mice with the B16F10 mouse melanoma cell line and treated them with the TA99 TA-targeting mAb to analyze the immune mechanisms associated with the tumor response and resistance to TA99 monotherapy. In immunocompetent mice TA99 treatment strongly increased the fraction of CD8 and CD4 effector T cells in the tumor compared with isotype control, highlighting the specific immune modulation of the tumor microenvironment by TA99. However, in most mice, TA99 immunotherapy could not prevent immune effector exhaustion and the recruitment of regulatory CD4 T cells and consequently tumor escape from immune surveillance. Remarkably, anti-PD-1 treatment at the time of tumor emergence restored the Th1 effector functions of CD4 and CD8 T cells as well as of natural killer and $\gamma\delta$ T cells, which translated into a significant slow-down of tumor progression and extended survival. Our findings provide the first evidence that PD-1 blockade at the time of tumor emergence can efficiently boost the host anti-tumor immune response initiated several weeks before by the TA-targeting mAb. These results are promising for the design of combined therapies to sensitize non-responder or resistant patients.

Abbreviations: ACK, ammonium-chloride-potassium; ADCC, antibody-dependent cell mediated cytotoxicity; ADCP, antibody-dependent cellular phagocytosis; Ag, antigen; BSA, bovine serum albumin; CD, cluster of differentiation; CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester; CTL, cytotoxic T lymphocyte; CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; DCs, dendritic cells; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FACS, fluorescence activated cell sorting; FBS, fetal bovine serum; gp75, glycoprotein 75; gp100, glycoprotein 100; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid; HER2/ERB-B2, Human Epidermal Growth Factor Receptor-2; IC, isotype control; IFN γ , interferon gamma; Ig, immunoglobulin; IHC, immunohistochemistry; IL, interleukin; i.p., intraperitoneal; i.v., intravenous; mAb, monoclonal antibody; MDSCs, myeloid-derived suppressor cells; MHC, major histocompatibility complex; NK, natural killer; NSG, NOD-*scid* IL2R γ null; OVA, ovalbumin; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate buffered saline solution; PBST, PBS containing Tween; PD-1, programmed cell death 1; PFA, paraformaldehyde; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; RPMI, Roswell Park Memorial Institute medium; s.c., subcutaneous; SPECT/CT, single-photon emission computed tomography; TA, tumor antigen; TCR, T cell receptor; Th, T helper; TIL, tumor-infiltrating lymphocyte; TIM3, mucin-domain containing-3; Treg, regulatory T cells; TRP2, tyrosinase-related protein 2; TYRP-1/TRP-1, tyrosinase-related protein 1

ARTICLE HISTORY

Received 24 February 2017
Revised 27 June 2017
Accepted 28 June 2017

KEYWORDS

anti-tumor immunity;
combined therapies;
immunomodulation;
long-lasting effects; tumor
escape; tumor immune
microenvironment; tumor-
targeting monoclonal
antibodies


Downloaded by [195.220.112.251] at 00:54 28 August 2017

Introduction

Among the many cancer therapy approaches, the recent clinical success of inhibitors of immune checkpoints, such as CTLA-4 and PD-1, highlights the potential of treating cancer by immune

modulation.¹ Moreover, preclinical and clinical studies have demonstrated that the long-term anti-tumor effects of conventional cancer treatments, such as chemotherapy and radiotherapy, rely on the host immunity.² Similarly, several studies have

CONTACT Laurent Gros  laurent.gros@inserm.fr  Immunité et Cancer, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (U1194) Campus Val d'Aurelle 208 rue des apothicaires 34298 Montpellier cedex 5, France.

 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

*L. They and H-A Michaud are first co-authors.

**N. Bonnefoy and L. Gros are co-senior and corresponding authors.

© 2017 Taylor & Francis Group, LLC

shown that the therapeutic activity of tumor antigen (TA)-targeting monoclonal antibodies (mAbs), such as trastuzumab (anti-HER-2/neu) and rituximab (anti-CD20), depends not only on direct effects on tumor cells, but also on immune cell-mediated effects through the activation of immunoglobulin G (IgG) Fc region gamma receptors (FcγR). Indeed, TA-targeting mAbs have the unique capacity to specifically target cancer cells and to kill them through FcγR-dependent mechanisms, such as antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP). FcγR polymorphisms have been associated with differential clinical outcome in patients treated with trastuzumab^{3,4} or rituximab,⁵ supporting the importance of FcγR-mediated mechanisms. Moreover, the demonstration that rituximab immunotherapy elicits a lymphoma-specific T cell response also suggests that immunotherapy with TA-targeting mAbs can result in the induction of a specific cellular immune response against tumor-associated antigens.⁶

Using a mouse model of virus-induced leukemia, we provided the first evidence of mAb-induced vaccine-like effects associated with an adaptive memory immune response and long-lasting protection.⁷⁻⁹ We demonstrated that immune complexes formed between infected cells and an anti-viral mAb improve dendritic cell (DC) maturation, antigen presentation and cross-priming, leading to immunological memory.¹⁰ Moreover, Stagg *et al.* demonstrated, using immunocompetent BALB/c mice with established TUBO breast tumors and treated with anti-TRAIL-R2 and anti-ERBB-2 mAbs, that the adaptive anti-tumor immunity is essential for complete tumor regression after treatment with TA-targeting mAbs.¹¹ The dependence of TA-targeting mAbs therapeutic effect on the adaptive immune response was confirmed using immunocompetent mice with CD20⁺ or HER2⁺ tumors and treated with anti-CD20^{12,13} or anti-HER2^{14,15} mAbs, respectively. In agreement with these preclinical results, increased levels of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) at diagnosis have been associated with higher response rates to adjuvant trastuzumab in patients with early breast cancer.¹⁶ Similarly, higher expression of immune markers, such as interferon gamma (IFNγ) and STAT1, and of metagenes linked to the adaptive immune system in pre-treatment biopsies from patients with breast cancer who received trastuzumab- or pertuzumab-based therapies has been associated with higher rate of pathological complete response.¹⁷

However, tumor escape from immune surveillance remains one of the main clinical issues. Indeed, malignant cells acquire the ability to exploit the host immunosuppressive mechanisms to avoid recognition and elimination by the host immune system and/or to drive the impairment of anti-tumor effector immune cells.^{18,19} The precise phenotypic and functional analysis of the tumor immune microenvironment at the time of tumor escape and a better understanding of its changes during tumor progression should bring key information for the development of new combinatorial strategies to delay or prevent tumor relapse and increase the overall survival of patients treated with TA-targeting mAbs.

Therefore, we decided to characterize the tumor escape mechanisms during immunotherapy with a TA-targeting mAb in mice grafted with B16F10 melanoma cells and treated with the TA-targeting mAb TA99, as monotherapy. In this

preclinical model, tumor progression is associated with a strong immunosuppressive tumor microenvironment and the response to TA99 therapy is heterogeneous. Indeed, in some mice TA99 leads to a long tumor-free survival, whereas in others it cannot efficiently control tumor progression. Using this preclinical model, we first characterized the cellular mechanisms of TA99-induced anti-tumor immunity in long-term protected mice. Then, we described the tumor immune microenvironment at the time of tumor escape in TA99-treated mice and proposed a combined therapeutic approach based on the synergistic effects of the TA-targeting mAb and an anti-immune checkpoint that resulted in an increased anti-tumor immunity and prolonged mice survival.

Materials and methods

Materials

The tyrosinase-related protein 2 (TRP2) (180–188; Ser-Val-Tyr-Asp-Phe-Phe-Val-Trp-Leu), gp100 (25–33; Glu-Gly-Ser-Arg-Asn-Gln-Asp-Trp-Leu), and ovalbumin (OVA) (257–264; Ser-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu) peptides were purchased from Anaspec.

For flow cytometry, the following antibodies were used: anti-mouse CD45-PerCPVio700 (clone 30F11) and anti-mouse MHC2-FITC (clone M5 114.15.2) from Miltenyi Biotec; anti-mouse CD4-BV650 (clone RM4–5), anti-mouse TCRγδ–B₅605 (clone GL3), anti-mouse CD25-PECy5 (clone B173002), anti-mouse IFNγ-BV421 (clone XMGL3), anti-mouse NKp46-FITC (clone 29A1.4) and anti-human TIM3-BV711 (clone F38 2E2) from Biolegend; anti-mouse CD8-PECy5.5 (clone 53–6.7), anti-mouse PD-1-FITC (clone J43), anti-mouse TIM3-PE (clone RMT 3–23), anti-mouse F4/80-APCeF780 (clone BM8), anti-mouse FOXP3-APC (clone FJK-16S) and anti-human CD45-PECy5.5 (2D1) from eBioscience; anti-mouse CD3-BV711 (clone 17A2), anti-mouse CD11c-PE (clone HL3), anti-mouse CD11b-APC (clone M1/70), anti-mouse CD107a-BV786 (clone 1D4B), anti-mouse IL2-APC-Cy7 (clone JES6–5H4), anti-mouse IL12-V450 (clone C15.6), anti-human CD3-PerCPy5.5 (clone SK7), anti-human CD4-BV650 (Clone SK3), anti-human CD8-BV605 (clone SK1), anti-human PD1-BV786 (clone EH12.1), anti-human IL2-PE (clone MQ1 17H12) and anti-human IFNγ-PECy7 (clone 4SB3) from BD PharMingen. The LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit for 405 nm excitation was purchased from Invitrogen.

The anti-mouse tyrosinase-related protein 1 (TYRP-1/TRP-1) TA99 and anti-mouse PD-1 (CD279) mAbs and their respective mouse IgG2a C1.18.4 and rat IgG2A 2A3 isotype controls were purchased from BioXcell. All antibodies were certified murine pathogen free.

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin were purchased from Sigma Aldrich; BD GolgiPlug™ Protein Transport inhibitor (containing brefeldin A) and BD GolgiStop™ Protein Transport inhibitor (containing monensin) were from BD Bioscience, fixation and permeabilization buffers from eBioscience, and ammonium-chloride-potassium (ACK) lysing buffer from BioWhittaker. The C57BL/6 murine melanoma B16F10 and colon adenocarcinoma MC38 cell lines were from ATCC.

Animals

Eight-week-old female NOD-*scid* IL2Rgamma^{null} (NSG) mice were purchased from Charles River and 8-week-old female C57Bl/6N or athymic nude *Foxn1*tm mice from Envigo. Mice were maintained according to protocols approved by the French national committee of animal care.

Cell culture

B16F10 and B16F1 cells were maintained in complete Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GE Healthcare Life Sciences) supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS), and 2 mg/ml gentamycin (Life Technology 15710-049). MC38 cells were grown in complete RPMI 1640 medium supplemented with 10% (vol/vol) FBS, 16 mM HEPES (Gibco by Life Technologies 15630-056) and 2 mg/ml gentamycin. All cell lines were cultured at 37°C and 5% CO₂ and tested regularly for mycoplasma contamination and for rodent pathogens.

Tumor models and treatments

For primary tumor graft, 5.10⁴ B16F10 or B16F1 cells in 100 μl of phosphate buffered saline solution (PBS) were inoculated subcutaneously (s.c.). At day 2 post-graft, treatment by intraperitoneal (i.p.) injection of TA99 mAb, IgG2a isotype control (IC) or PBS was started (400 μg for the first injection followed by 5 injections of 200 μg at day 3, 4, 7, 9 and 11). Tumors were measured 3 times per week with a caliper and mice were killed when the tumor reached a volume of 1500 mm³. Tumor volume was calculated using the following formula: length × width × width/2. For the challenge, 5.10⁴ B16F10 or 5.10⁵ MC38 cells in 100 μl PBS were inoculated s.c. in the opposite flank.

For testing the effect of immune checkpoint inhibition, 200 μg of anti-PD-1 mAb in 100 μl PBS was administered i.p. twice a week starting at the time of tumor emergence (30–50 mm³ tumor volume). For the lung metastasis model, 10⁵ B16F10 cells were inoculated intravenously (i.v.) in tumor-free TA99-treated or naive (i.e., ungrafted and never treated) mice that were killed 14 d after to analyze lung invasion. The total number and number of large foci (> 3 mm) were assessed by using a binocular microscope.

Quantification of anti-B16F10 immunoglobulins by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

After retro-orbital sinus blood sampling at different time points or intra-cardiac blood sampling after euthanasia, serum was recovered and stored at –20°C. For ELISA assays, B16F10 cells were plated overnight at 37°C in 96-well plates. The day after, cells were rinsed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA). Cells were washed twice with PBS and incubated at room temperature (RT) with PBS/0.1% Tween 20 (PBST) and 1% bovine serum albumin (PBST-BSA) for 1 h. Serum samples were diluted in PBST-BSA and incubated at RT for 2 h. After 3 washes in PBST, a peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (γ chain specific) (Sigma), diluted 1/1000 in PBST-BSA, was added at RT for 1 h. After 2 washes in PBST and one wash in

PBS, 50 μl of TMB solution (TMB Substrate Reagent Set BD OptEIA™ Cat: 55514) was added at RT in the dark for 15 min. The reaction was stopped by addition of 50 μl of H₂SO₄ and absorbance was read at 450 nm. The total serum IgG concentrations were calculated using the standard curve obtained with purified TA99.

Serum transfer experiments

Serum samples from untreated (naive serum) or challenged tumor-free TA99 treated-mice (immune serum) were collected and pooled. Mice were grafted with 5.10⁴ B16F10 cells and received 6 i.p. injections of 100 μl of immune or naive serum at day 2, 3, 4, 7, 9 and 11 post-graft.

Isolation of immune cells

Spleen, lymph nodes and tumors were recovered in ice-cold PBS containing 0.5% BSA and 2 mM EDTA (dissociation buffer) and were mechanically dissociated. For spleen, red blood cells were eliminated by adding 2 ml ACK lysing buffer. Then white blood cells were recovered by centrifugation, washed with PBS and re-suspended in RPMI 1640 plus 10% FBS for functional assays or in FACS buffer (2% fetal calf serum, 1 ml 0.5 M EDTA, 1 μg/ml sodium azide in PBS) for staining and flow cytometry analysis. For tumors and lymph nodes, after dissociation, cells were filtered through 70 μm filters (Falcon Cell Strainer Nylon 352340) and centrifuged. Pellets were re-suspended in RPMI 1640 plus 10% FBS for functional assays or in FACS buffer for staining and flow cytometry analysis.

In vivo cytotoxicity assays

Splenocytes from naive mice were suspended in RPMI 1640 plus 10% FBS, and loaded at 37°C with a mix of gp100 and TRP2 peptides or OVA (all at 1 μg/ml) for 2 h. After washes with PBS to eliminate the peptide excess, gp100 and TRP2-loaded splenocytes were labeled with 5 μM carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (CFSE^{high}) and OVA-loaded splenocytes with 0.5 μM CFSE (CFSE^{low}) at 37°C for 10 min. Cells were washed again in ice-cold PBS, re-suspended in PBS, counted and mixed in a 1:1 ratio. Then, 1.5 10⁷ splenocytes were injected i.v. in recipient mice 12 d after challenge. Five days later, mice were killed for flow cytometry quantification of splenic CFSE^{low} and CFSE^{high} cells. The CTL activity against gp100/TRP2-loaded splenocytes was calculated according to the CFSE^{high}/CFSE^{low} cell ratio normalized to the CFSE^{high}/CFSE^{low} cell ratio assayed before splenocyte injection in recipient mice.

Flow cytometry analysis

When tumors reached a volume of 300–400 mm³, mice were killed. Spleen, lymph nodes and tumors were recovered and dissociated as described above. Cells were suspended in RPMI 1640/10% FBS (unstimulated conditions), or RPMI 1640/10% FBS with 20 ng/ml PMA and 1 μg/ml ionomycin (stimulated conditions) in 96-well plates at 37°C for 5 hours. The

anti-mouse CD107a-BV786 antibody (BD Horizon) was added simultaneously to evaluate degranulation. After 1 hour, GolgiPlug™ and GolgiStop™ were added in each well to block cytokine secretion (according to the manufacturer's protocol; BD Biosciences). Then, at the end of the 5 hours, cells were washed once with PBS and antibodies for surface markers were added at 4°C for 1 hour. After extracellular staining, cells were fixed and permeabilized, according to the eBioscience fixation and permeabilization procedures, and intracellular staining was performed overnight at 4°C. Then, samples were washed, fixed in 1% PFA, and processed for data acquisition using a FORTRESSA flow cytometer (Beckton Dickinson). Data were analyzed using the Flowjo 10 software.

Histology

For the evaluation of TRP-1 expression on human melanoma biopsies, immunohistochemical staining of TRP-1 was performed on 6 of the 15 metastatic patients included in our study and 4 primary patients selected from the database of the tumor library from ICM-Val d'Aurelle. Four- μm thin sections of formalin-fixed paraffin-embedded tissues were mounted on Flex microscope slides (Dako) and allowed to dry overnight at room temperature before immunohistochemistry processing. PT-Link® system (Dako) was used for pre-treatment, allowing simultaneous de-paraffinization and antigen retrieval. Heat-induced antigen retrieval was executed for 15 minutes in High pH Buffer (Dako) at 95°C. Immunohistochemistry procedure was performed using the Dako Autostainer Link48 platform. Briefly, endogenous peroxidase was quenched using Flex Peroxidase Block (Dako) for 5 min at room temperature. Slides were then incubated with the anti-TYRP1 mouse monoclonal antibody (Abcam, Clone TA99; 13.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 30 min at room temperature. After 2 rinses in buffer, the slides were incubated with a horseradish peroxidase-labeled polymer coupled to secondary anti-mouse and anti-rabbit antibodies for 20 min, followed by application of 3,3'-Diaminobenzidine for 10 min as substrate. Counterstaining was performed using Flex Hematoxylin (Dako) followed by washing the slides under tap water for 5 min. Finally, slides were mounted with a coverslip after dehydration. All samples were also processed with irrelevant IgG2A isotypic control at the same concentration as TRP-1 antibody, and used as negative control. Normal skin was used as positive control.

Patient samples

Tumor biopsies and blood samples were recovered from patients with metastatic melanoma before any treatment. Informed consent was obtained from all patients. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll density gradient centrifugation, as described by the manufacturer (Eurobio). Tumor biopsies were cut in small pieces of 0.5 cm^3 in RPMI 1640 medium and dissociated by combining mechanical disruption (GentleMACS™ dissociator, Miltenyi Biotec) with enzymatic digestion using 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ collagenase type IV-S (Sigma). After dissociation, samples were filtered (40 μM nylon filter) to remove any remaining larger particles from the cell suspension and the recovered cells were used immediately.

Primary melanomas were selected from the database of the tumor library from ICM-Val d'Aurelle. Tumor samples were collected following French laws under the supervision of an investigator and declared to the French Ministry of Higher Education and Research (declaration number DC-2008-695). All patients were informed about the use of their tissue samples for biologic research and the study was approved by the local translational research committee.

Ethics Statement

All procedures for animal handling and experiments were approved by the local animal facility "ComEth" Institutional Review Board under the supervision of the French LR Regional CEEA ethics committee on animal experimentation (Chairman: Pr M Michel, Montpellier).

Statistical analysis

All results were expressed as the mean \pm SEM of at least 2 independent experiments. Statistical analyses were performed with the non-parametric Mann-Whitney test when comparing 2 groups, the Kruskal-Wallis test when comparing multiple groups and the Kaplan-Meier test for survival analyses. Statistical analyses were performed using the Prism 6 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). Differences between groups with a p value $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

Results

Long-term protection following treatment with TA99 relies on a specific host immune memory response that requires the innate immunity

The TA99 mAb targets TRP-1 (known also as gp75/TYRP-1), a glycoprotein synthesized by pigmented melanocytes, strongly expressed in B16F10 melanoma cells *in vivo* (Fig. S1A) and recognized as a dominant melanocytic antigen expressed by both primary and metastatic human melanoma tumors (Fig. S2A and B). First, we analyzed TA99 biodistribution in mice bearing B16F10 melanoma tumors by SPECT-CT imaging. ^{125}I -labeled TA99 specifically targeted tumor cells with a maximal signal intensity 3 d post-injection and was still detectable in tumors one week after injection (Fig. S1B). Conversely, the IgG2a isotype control antibody (IC) was never detected in tumors. Then, to evaluate TA99 immune cell-mediated effects we grafted immunocompetent C57BL/6 mice with B16F10 melanoma cells and treated them with TA99, IC antibody or PBS (6 i.p. injections starting at day 2 after graft). IC treatment did not have any effect, and IC-treated mice as well as PBS-treated mice died within 3 weeks (mean of 21 ± 3 days) after tumor cell graft (Fig. 1A and B). On the other hand, the TA99 mAb significantly delayed tumor growth and prolonged mice survival compared with IC or PBS (Fig. 1A and B). Moreover, about 30% of TA99-treated mice were still tumor-free after 60 d (Fig. 1B). At that time, we could not detect TA99 any longer in the blood (data not shown), suggesting that tumor eradication or control can be obtained with TA99 monotherapy and maintained

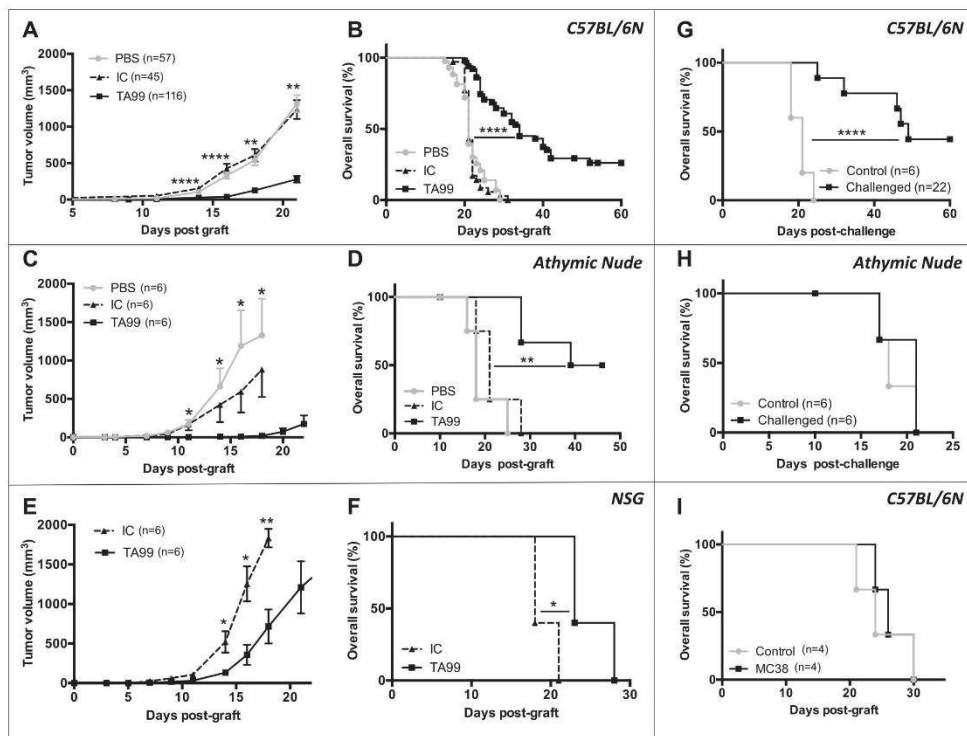


Figure 1. Long-term anti-tumor immunity in TA99-treated mice relies on a specific T-cell memory response. C57BL/6N (A, B), athymic nude (C, D) and NSG (E, F) mice engrafted with 5.10^4 B16F10 melanoma cells received 6 injections (i.p.) of TA99 mAb (TA99), isotype control (IC) or PBS (PBS). The mean tumor sizes \pm SEM (A, C, E) and Kaplan-Meier survival curves (B, D, F) are shown. Kaplan-Meier survival curves for tumor-free TA99-treated C57BL/6N (G) and athymic nude (H) mice after a second injection (s.c.) of 5.10^5 B16F10 cells on the opposite flank (challenge). (I) Tumor-free TA99-treated C57BL/6N or athymic nude mice was used as control. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ (log-rank test for Kaplan Meier survival curves and non-parametric Mann-Whitney test for tumor growth).

beyond persistence of the therapeutic mAb. To determine the immune mechanisms underlying TA99-mediated tumor control, we used the same treatment protocol in B16F10-engrafted athymic nude mice that cannot produce T cells and in NSG mice that lack functional macrophages, T, B, natural killer (NK) and DCs. Results in athymic nude mice were similar to those obtained in immunocompetent mice, with a significant delay of tumor progression only after TA99 treatment and the presence of a group of mice that were tumor-free 50 d after tumor engraftment (Fig. 1 C and D). In NSG mice, TA99 treatment delayed tumor growth and increased overall survival by 5 d compared with IC-treated mice; however, all mice developed tumors (Fig. 1 E and F). Altogether, these data clearly demonstrate that T cells are not required for TA99-mediated early control of primary B16F10 tumor growth and emphasize the role of NK and myeloid cells, present in athymic nude but not in NSG mice, in TA99 anti-tumor effect. To determine whether the innate immune system is involved in the early tumor control by TA99, we evaluated the effect of TA99 treatment on innate immune cell activation by analyzing the cytokine profile of myeloid and NK cells after TA99 treatment of C57BL/6 mice with established tumors (50 mm^3). Two injections of TA99 ($n = 8$), but not of IC ($n = 8$), were sufficient to

significantly increase the fraction of IL12-producing macrophages and DCs as well as $\text{IFN}\gamma$ secretion by activated NK cells in the tumor (Fig. S3). These results illustrate the specific effect of TA99 on tumor infiltrating innate immune cells, and strengthen previous findings on the crucial role of $\text{Fc}\gamma\text{R}$ -expressing immune cells for TA99 efficacy.²⁰⁻²²

To determine whether TA99 treatment resulted in durable tumor immunity, we challenged C57BL/6 ($n = 22$) and athymic nude ($n = 6$) mice that remained tumor-free after TA99 treatment (tumor-free TA99-treated mice, hereafter) with a second s.c. injection of B16F10 cells at day 50 to 60 after the primograft. Half of the C57BL/6 mice developed tumors with a significant delay compared with control (untreated, newly grafted mice) and half of them remained tumor-free (Fig. 1G). Conversely, all athymic nude mice developed tumors without any delay and died within 21 days, like control mice (Fig. 1H). This indicates that T cells are required for the long-term anti-tumor immunity. Moreover, all tumor-free TA99-treated C57BL/6 mice grafted with the colon adenocarcinoma cell line MC38 ($n = 4$) developed tumors and died with a similar kinetics as control mice (Fig. 1I). This demonstrates that the immune response established after TA99 treatment is B16F10-specific.

Finally, we analyzed whether tumor-free TA99-treated C57BL/6 mice could control tumor cell dissemination in the lung after i.v. challenge with B16F10 cells at day 60 post-primograft. Twelve days post-injection, we counted the tumor foci in the lungs and classified them according to their size (small foci: <3 mm, and large foci: >3 mm). The total number of foci and the number of large foci were significantly lower in TA99-treated mice (n = 10) than in controls (untreated and never grafted s.c.) (n = 8) (Fig. 2A-C).

Altogether these data demonstrate that a short-term monotherapy with the TA99 TA-targeting mAb stimulates innate immune cells and induces, in a fraction of mice, long-term protective immunity through the development of a specific T-cell-dependent memory immune response.

TA99 mAb treatment induces specific cellular and humoral memory anti-tumor immune responses

We then analyzed the specific cellular and humoral anti-tumor immune responses in tumor-free TA99-treated mice. To assess the presence of a functional memory CD8 T cell response, we challenged tumor-free TA99-treated C57BL/6 mice by s.c. injection of B16F10 cells between day 50 and 60 after the primograft. Twelve days later, we injected i.v. splenocytes loaded with a mix of gp 100 and TRP2 peptides or the irrelevant peptide OVA and assessed the specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity in the spleen and draining and non-draining lymph nodes 5 d later (i.e., 17 d post challenge). CTL activity was significantly increased (from 5 to 25%) in the spleen (Fig. 3A and B), but not in draining and non-draining lymph nodes (Fig. S4), of TA99-treated animals (n = 9) compared with naive mice (n = 9).

We also evaluated the endogenous antibody response in tumor-free TA99-treated mice just before and 12 d after the challenge. Before the new injection of melanoma cells, we detected an average of 130 $\mu\text{g/ml}$ of anti-B16F10 IgGs in serum samples of TA99-treated mice, but anti-B16F10 IgGs were not detected in serum samples from naive or B16F10 grafted but non-treated mice (Fig. 3C and data not shown). The concentration of anti-B16F10 IgGs was significantly increased (mean value: 315 $\mu\text{g/ml}$; $p < 0.05$) after the challenge with melanoma cells, suggesting a memory B cell response in tumor-free TA99-treated mice (Fig. 3C). To test whether this specific antibody response could contribute to TA99 protective effect, we collected serum from tumor-free TA99-treated mice (immune serum) and from naive control mice (non-immune serum). Administration of immune serum to mice grafted with B16F10 cells (same therapeutic protocol as for TA99) delayed tumor growth, as observed with the TA99 mAb, whereas non-immune serum had no effect (n = 6/group) (Fig. 3D). Similarly, overall survival was significantly increased in mice treated with immune serum compared with animals that received non-immune serum (+ 5 days; $p < 0.05$). Nevertheless, all mice treated with immune serum developed tumors (Fig. 3E).

This demonstrates that tumor-free TA99-treated mice have developed cellular and humoral anti-tumor responses to control tumor progression. These responses could explain the long-lasting tumor control and protection against tumor challenge.

TA99 treatment increases the fraction of effector T cells at tumor sites but does not counteract their exhausted phenotype

Although TA99 treatment led to tumor eradication in about 30% of C57BL/6 mice, in all other mice, it could not efficiently control tumor progression on the long-term (Fig. 1B). To understand the immunomodulatory effects associated with TA99 immunotherapy and the reasons for tumor escape, we analyzed the effector T lymphocyte

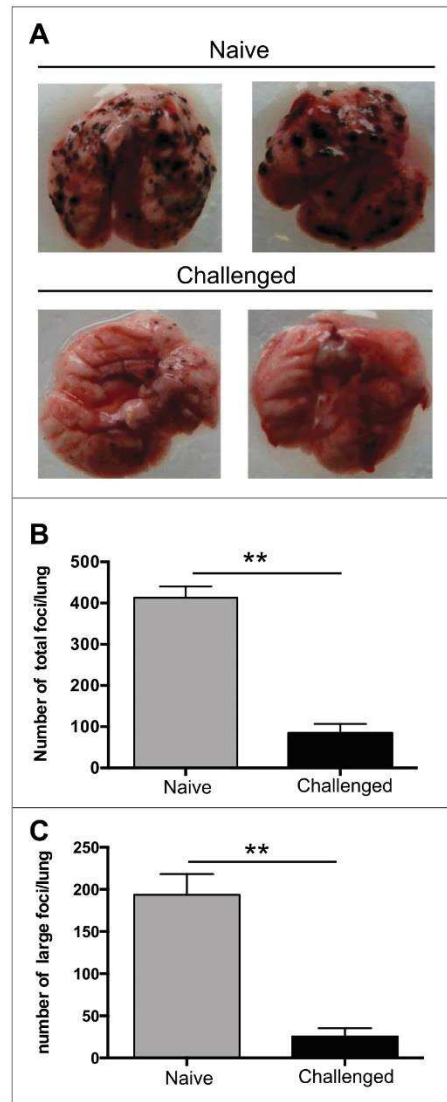


Figure 2. Long-term anti-tumor immunity in TA99-treated mice reduces B16F10 lung metastasis formation. 10^5 B16F10 cells were injected (i.v.) in age-matched naive or tumor-free TA99-treated C57BL/6N mice that were killed 12 d later to quantify tumor foci in the lungs. Representative images of lungs (A) and quantification of total foci (B) and foci larger than 3 mm (C) in the lungs of naive (gray bars, n = 8) and tumor-free TA99-treated mice (black bars, n = 10). In B and C, data are the mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ (non-parametric Mann-Whitney test).

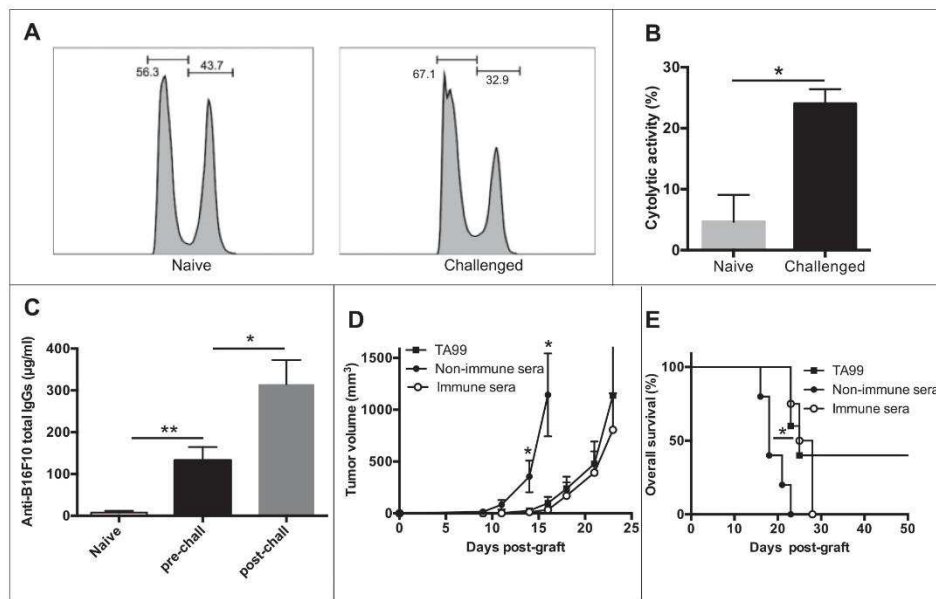


Figure 3. TA99 treatment induces cellular and humoral anti-tumor immune responses. Tumor-free TA99-treated C57BL/6N mice received a second s.c. injection of 5.10^4 B16F10 cells on the opposite flank (challenged) and the CTL activity of CD8 splenocytes was evaluated 17 d later and compared with that of age-matched untreated and never grafted controls (naive). Representative flow cytometry histograms (A) and percentages of CTL activity (B) in naive ($n = 9$) and challenged ($n = 9$) mice. (C) Serum samples were collected from the same naive ($n = 9$) and TA99-treated mice before (pre-chall) and after challenge (post-chall) and anti-B16F10 IgGs quantified by ELISA. (D, E) Serum samples from naive mice (non-immune sera) or from tumor-free TA99-treated mice (immune sera) were used to treat C57BL/6N mice grafted with 5.10^4 B16F10 cells for the first time ($n = 6$ /group). The mean tumor size \pm SEM (D) and Kaplan-Meier survival curves (E) are indicated. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (log-rank test for Kaplan Meier survival curves, nonparametric Mann-Whitney test for tumor growth and non-parametric Kruskal-Wallis test for ELISA).

phenotype in mice treated with PBS, IC or TA99 ($n = 9$ /group) when tumors reached a volume of 300–400 mm^3 . In each group, we isolated lymphocytes from spleens, lymph nodes and tumors and evaluated the ratio between effector ($\text{CD44}^{\text{high}}\text{CD62L}^{\text{low}}$) and naive ($\text{CD44}^{\text{low}}\text{CD62L}^{\text{high}}$) CD8 T cells and the percentages of effector ($\text{CD25}^+\text{FoxP3}^-$) and regulatory ($\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$) CD4 T cells (Fig. 4). The ratio between effector and naive CD8 T cells was very low in spleen (Fig. 4A, left) and lymph nodes (data not shown) in all treatment groups. Similarly, the percentage of effector CD4 T cells in spleen and lymph nodes was not modified by TA99 immunotherapy (Fig. 4B, left, and data not shown). Conversely, TA99 treatment strongly increased the percentage of CD8 and CD4 effector T cells in tumors compared with IC and PBS (Fig. 4A and B, right), highlighting the specific immune modulation of the tumor microenvironment by TA99 toward a strong intra-tumor effector T cell recruitment. Immunophenotyping of the infiltrating T cell populations revealed a high frequency of regulatory T cells whatever the treatment (Fig. 4C). The presence of these immunosuppressive cells suggests that effector T cells recruited by TA99 might be functionally impaired, thus explaining the absence of tumor control.

Effector T cell dysfunction has been associated with the upregulation of inhibitory receptors, such as CTLA-4, PD-1 and TIM3.²³ In patients with melanoma, several studies have associated PD-1 and TIM3 upregulation in circulating TA-

specific CD8 T cells with their exhaustion/dysfunction.^{24–27} We thus assessed PD-1 and TIM3 expression in effector T lymphocytes from B16F10 tumor-bearing mice when tumors reached a volume of 300–400 mm^3 . The percentage of CD4 and CD8 effector cells that expressed the exhaustion markers PD-1 and TIM3 was significantly higher within the tumor (right) than in the spleen (left), whatever the treatment (Fig. 4D and E). In agreement, the percentage of tumor-infiltrating CD4 and CD8 cells that produced $\text{IFN}\gamma$ alone or $\text{IFN}\gamma$ and IL-2 was not affected by TA99 treatment (Fig. S5). We obtained similar results when we monitored the expression of PD-1 and TIM3 in biopsies and blood samples from untreated patients with stage IV melanoma ($n = 15$). Specifically, the percentage of cells that expressed PD-1 alone or with TIM3 was significantly higher in tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes (TILs) than in paired PBMCs (Fig. 4F), a phenotype associated with a decreased production of $\text{IFN}\gamma$ or/and IL-2 following PMA-ionomycin stimulation *in vitro* in TILs than in PBMCs (Fig. S6). Of note that although TRP-1 is a dominant melanocytic antigen, we observed no correlation between TRP-1 expression and the percentage of TILs expressing TIM3 and PD-1 (data not shown).

Collectively these data show that TA99 treatment is associated with a specific increase of effector T lymphocytes in the tumor. However, in 70% of mice, TA99 immunotherapy was not sufficient to prevent the anti-tumor immunity alteration

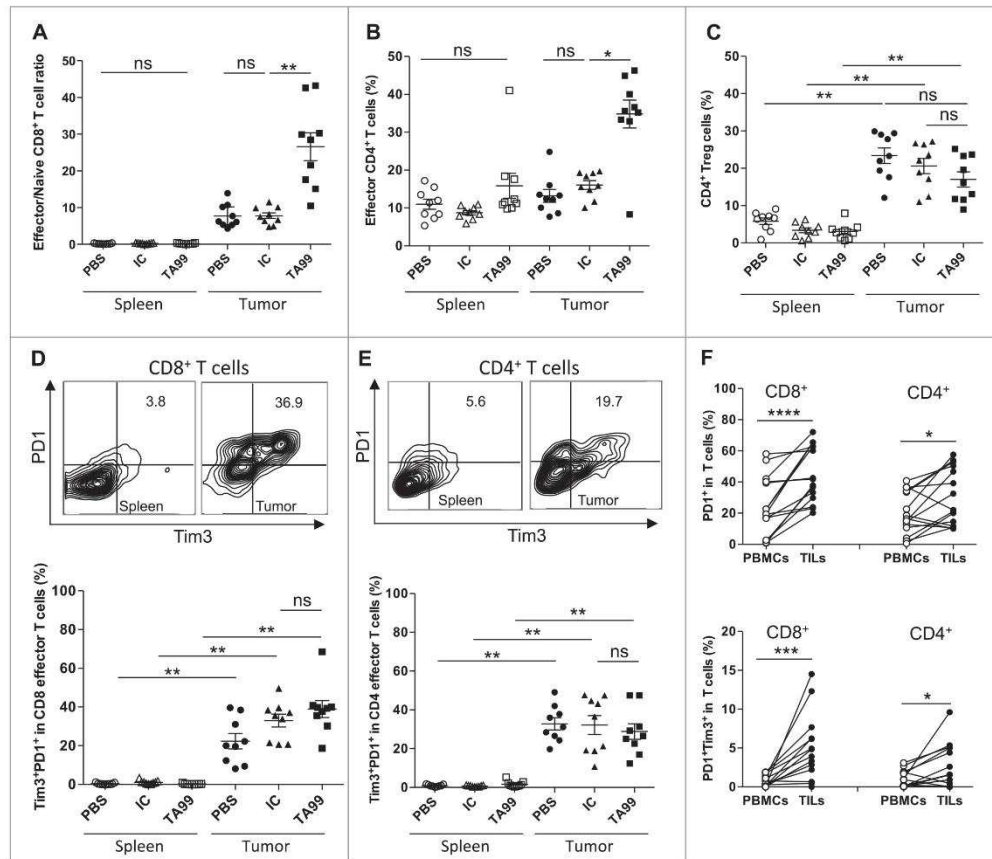


Figure 4. TA99 treatment increases the percentage of tumor infiltrating effector lymphocytes, but does not prevent their exhaustion. (A-C) Immune cells were isolated from spleens (white symbols) and tumors (black symbols) of mice treated with PBS (PBS, $n = 9$), IgG2a isotype control (IC, $n = 9$) or TA99 (TA99, $n = 9$). The ratio between effector memory ($CD44^+CD62L^-$) and naive ($CD44^-CD62L^+$) $CD8^+$ T cells (A), and percentage of $CD25^+FOXP3^-$ effector $CD4^+$ T cells (B) and $CD25^+FOXP3^+CD4^+$ Tregs (C) are indicated. (D, E) Expression of PD-1 and TIM3 in $CD8^+$ (D) and $CD4^+$ (E) T cells isolated as indicated in A and B. Top, representative dot-plots; bottom, individual data from 9 mice/group (same mice as in A-C). (F) Expression of PD-1 and TIM3 in PBMCs and TILs from 15 untreated patients with metastatic melanoma. The percentages of $PD1^+$ and $PD1^+TIM3^+$ in the $CD4$ and $CD8$ subpopulations are shown. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, not significant; determined with the non-parametric Kruskal-Wallis test (A, B, C, D, E) or the non-parametric Wilcoxon matched-pairs rank test (F).

associated with the recruitment of regulatory $CD4^+$ T cells and the exhaustion of effector lymphocytes.

The anti-PD-1 antibody synergizes with TA99 immunotherapy to potentiate the cellular anti-tumor immunity

As PD-1 expression in tumor-infiltrating effector T cells was high at the time of tumor emergence, we then asked whether PD-1 blockade could prolong the beneficial effect of TA99 treatment. To this aim, we grafted immunocompetent C57BL/6 mice with B16F10 melanoma cells and treated them with TA99 or the IC antibody, as before. At the time of tumor emergence (i.e., from day 14 to day 31 post-graft; 50 mm^3), mice were left un-treated or treated with anti-PD-1 antibodies twice a week for 3 weeks, and we followed tumor progression. In the absence of anti-PD-1 treatment, tumor progression after emergence was similar in both isotype control (IC) and TA99-treated

(TA99) groups ($n = 6/\text{group}$). In the isotype control group (IC+ α PD1; $n = 8$), PD-1 therapy slightly delayed tumor growth, but had no effect on survival (Fig. 5A and B). Conversely, in TA99-treated mice (TA99+ α PD1; $n = 8$), we observed a significant delay of tumor progression throughout the anti-PD-1 treatment (Fig. 5A) associated with a significant increase in overall survival (Fig. 5B). Similar results were observed in mice grafted with the B16 variant B16F1 (Fig. 5C and D), despite a weaker effect of TA99 treatment alone on disease-free survival (Fig. S7A) compared with mice grafted with B16F10 melanoma cells (Fig. 1B).

Although it was not concomitant to the TA99 treatment, we hypothesized that the anti-PD-1 therapy might strengthen the beneficial effect of TA99 (increased effector fraction in the tumor) by restoring the function of effector TILs. We thus studied the effect of PD-1 blockade on the functionality of peripheral and tumor-infiltrating $CD4^+$ and $CD8^+$ effector T cells. As in preliminary experiments we obtained similar results in

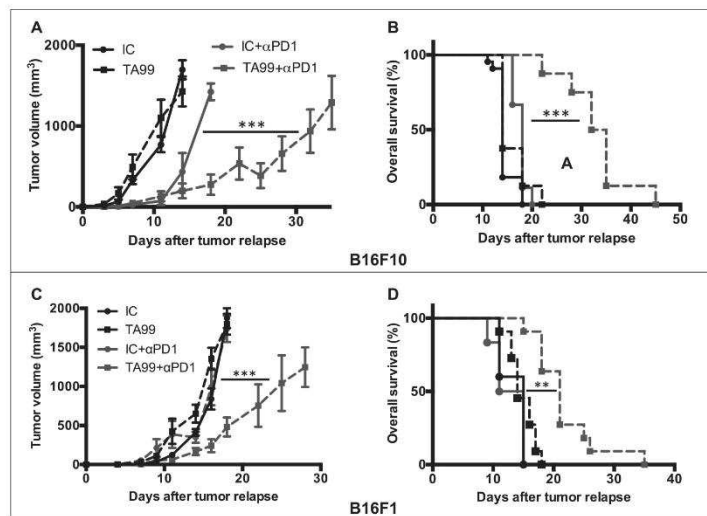


Figure 5. Anti-PD-1 treatment slows down tumor progression and increases survival of TA99-treated mice. C57BL/6N mice were grafted (s.c.) with 5.10^4 B16F10 (A and B) or B16F1 (C and D) cells and treated with the TA99 mAb or the isotype control (IC). Upon tumor appearance (50 mm^3), mice received anti-PD-1 antibodies (i.p.) twice a week (IC+ α PD-1, $n = 8$ or TA99+ α PD-1, $n = 8$) or PBS (IC, $n = 6$ or TA99, $n = 6$) for 3 weeks. The mean tumor sizes \pm SEM (A and C) and Kaplan-Meier survival curves (B and D) are indicated. Day 0 stands for the day of tumor appearance. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ determined with mixed-effects ML regression test for tumor growth (A and C) and the log-rank test for Kaplan Meier survival curves (B and D).

spleen and lymph nodes (data not shown), we then used spleen as representative of the periphery for all the experiments. After, graft of B16F10 melanoma cells and treatment with TA99 or IC followed by anti-PD-1 antibodies (TA99 + α PD1, $n = 9$; IC+ α PD1, $n = 9$) or not (TA99, $n = 7$; IC, $n = 7$), we analyzed cytokine production when tumors reached $200\text{--}300 \text{ mm}^3$. The percentage of CD4 and CD8 T cells that produced IFN γ or/and IL-2 was very low in spleens and tumors from mice treated with TA99 or IC only (Fig. 6A and B and Fig. S8A). Conversely, in TA99+ α PD1 mice, IFN γ and IFN γ plus IL-2-producing CD4 and CD8 T cells were significantly increased in the tumor (up to $36.15 \pm 2.17\%$ and $34.24 \pm 3.91\%$ of IFN γ producing tumor-infiltrating CD4 and CD8 T cells respectively, compared with $3.83 \pm 0.46\%$ and $6.6 \pm 1.52\%$ in mice that received only TA99) (Fig. 6A and B and Fig. S8A). Anti-PD1 treatment alone (IC+ α PD1) significantly increased only the percentage of IFN γ plus IL-2-producing CD4 cells in the tumor (Fig. 6A and Fig. S8A). These data clearly demonstrate the synergistic effect between TA99 therapy and PD-1 blockade on the activation of effector T lymphocytes (Fig. 6A and B and Fig. S8A). We then found that this synergistic effect was not restricted to CD4 and CD8 effector T cells because IFN γ -producing NK cells in the tumor were also increased in TA99+ α PD1 mice compared with animals that received TA99 or anti-PD-1 antibody alone ($42.95 \pm 3.12\%$ vs $2.73 \pm 0.25\%$ and $11.83 \pm 2.97\%$, respectively) (Fig. 6C and Fig. S8B). Similarly, the percentage of IFN γ -producing $\gamma\delta$ T cells was higher in TA99+ α PD1 mice ($66.35 \pm 3.79\%$ vs $4.18 \pm 0.46\%$ in animals that received one single antibody) (Fig. 6D and Fig. S8B). Moreover, in TA99+ α PD1 mice, increased IFN γ production by NK and $\gamma\delta$ T cells was associated with a significant increase of CD107a expression, reflecting a higher degranulation activity (Fig. 6C

and D and Fig. S8B). We also observed similar synergistic effects on cytokine production in B16F1 grafted mice (Fig. S7B).

Altogether, these data clearly show that the synergistic effect between TA99 and anti-PD-1 treatments leads to a significant increase of Th1 cytokine production (IFN γ and IL2) in the tumor through the restoration of both innate and adaptive immune cell functions. Despite increased immune response rates, we never detected any systemic toxicity upon TA99 plus anti-PD-1 treatment.

PD-1 blockade potentiates the endogenous memory responses

As 50% of tumor-free TA99-treated mice developed a tumor after the second melanoma cell graft (Fig. 1G), we investigated whether treatment with the anti-PD-1 antibody after the challenge could also have an impact on the cellular and humoral memory responses. Thus, we treated or not challenged tumor-free TA99-treated mice with the anti-PD-1 antibody at the time of tumor escape, and assessed CTL activity (same method as before). In spleen, CTL activity increased by 2-folds after anti-PD-1 treatment (TA99+ α PD1) compared with mice that did not received anti-PD1 (TA99) (Fig. 7A). Similarly, CTL activity could be measured in draining and non-draining lymph nodes after anti-PD-1 treatment (TA99+ α PD1) but not in mice treated with TA99 alone (TA99) (Fig. 7B and C). In parallel, we quantified endogenous anti-B16F10 IgGs by ELISA. We observed a 4-fold increase of anti-B16F10 IgGs in the serum of mice that received anti-PD-1 compared with mice that did not received anti-PD1 ($416.11 \pm 42.06 \mu\text{g/ml}$ vs $72.39 \pm 25.4 \mu\text{g/ml}$) (Fig. 7D). Altogether, these data suggest

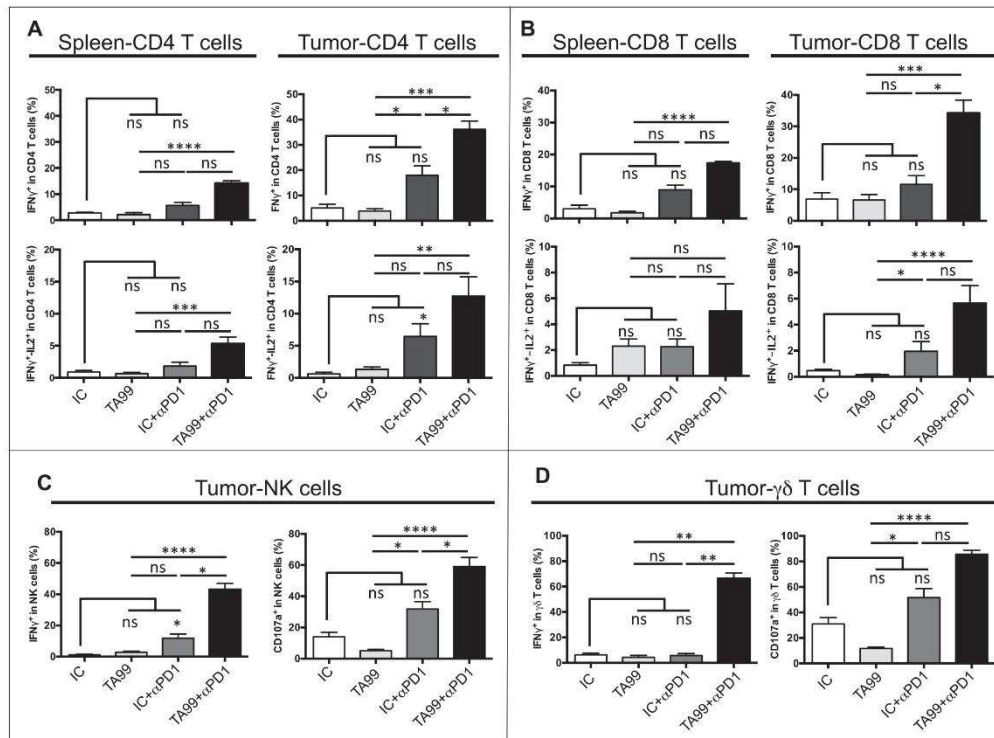


Figure 6. PD-1 blockade synergizes with TA99 therapy to enhance effector T cell functions. Upon tumor appearance, TA99-treated and isotype control (IC)-treated mice received anti-PD-1 antibodies (i.p.) twice per week (TA99+ α PD1, n = 9; IC+ α PD1, n = 9) or PBS (TA99, n = 7; IC, n = 7). When tumors reached 200–300 mm³, cytokine production was analyzed in spleen and tumor by flow cytometry. (A and B) Percentage of IFN γ (top) and IFN γ plus IL-2 (bottom)-producing CD4 (A) and CD8 (B) T cells isolated from spleens and tumors. (C and D) Percentage of NK (C) and $\gamma\delta$ T cells (D) that produce IFN γ (left) and expressing CD107a (right) in tumors; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001; ns, not significant (non-parametric Kruskal-Wallis test).

that PD-1 blockade potentiates the TA99-induced endogenous memory responses. This translates into a significant delayed tumor progression in TA99+ α PD1-treated mice (n = 5) compared with TA99-treated mice (n = 7) (Fig. 7E).

Discussion

We previously demonstrated in a mouse model of virus-induced leukemia that immune complex formation between infected cells and an anti-viral mAb improves DC maturation and antigen presentation, thus resulting in a sustained memory immune response and long-lasting protective effects.¹⁰ This was followed by several preclinical studies showing that the host adaptive immunity is essential for tumor control after treatment with TA-targeting mAbs.^{9,12,14,28} Innate immune cells, especially NK cells and DCs, also are needed for the efficacy of TA-targeting-based immunotherapies, notably anti-ERBB-2 and anti-CD20 therapies, in preclinical models.^{13,15} In the case of TA99-based immunotherapy in the B16F10 melanoma preclinical model, activating Fc γ Rs, especially Fc γ RI together or not with Fc γ RIII or Fc γ RIV,^{20,22} are crucial for TA99 protective effect. It was proposed that among Fc γ R-expressing cells, neutrophils are required and sufficient to mediate the anti-tumor effect of the TA99 mAb.²⁹ Here, we

observed a similar TA99-mediated tumor growth control in athymic nude mice, which lack T lymphocytes, and in immunocompetent C57BL/6 mice, resulting in 30–50% of tumor-free mice after the treatment. Conversely, we never observed tumor eradication in the severely immunocompromised NSG mice after TA99 treatment, although neutrophils are present and functional in this strain.³⁰ These results suggest that in the absence of other functional immune cells, neutrophils are not sufficient to control B16F10 tumor progression.

Thus, our results strengthen the hypothesis that the control and eradication of the primary tumor by TA99 can be achieved in the absence of T cells and confirm the key implication of innate immune cells in this model.^{22,31} This conclusion is further supported by the early and significant increase of IL12-producing macrophages and DCs as well as of IFN γ -producing NK cells observed in the tumor of TA99-treated mice. This TA99 short-term effect was also associated with a decrease in the tumors of CD11b⁺Gr1^{int} monocytic-myeloid-derived suppressor cells (M-MDSC) (data not shown), which have been described as the most suppressive MDSC subset in the tumor microenvironment.³² However, despite the clear contribution of the innate immune cells to TA99 anti-tumor effect, our data also show that the establishment of a long-term protective

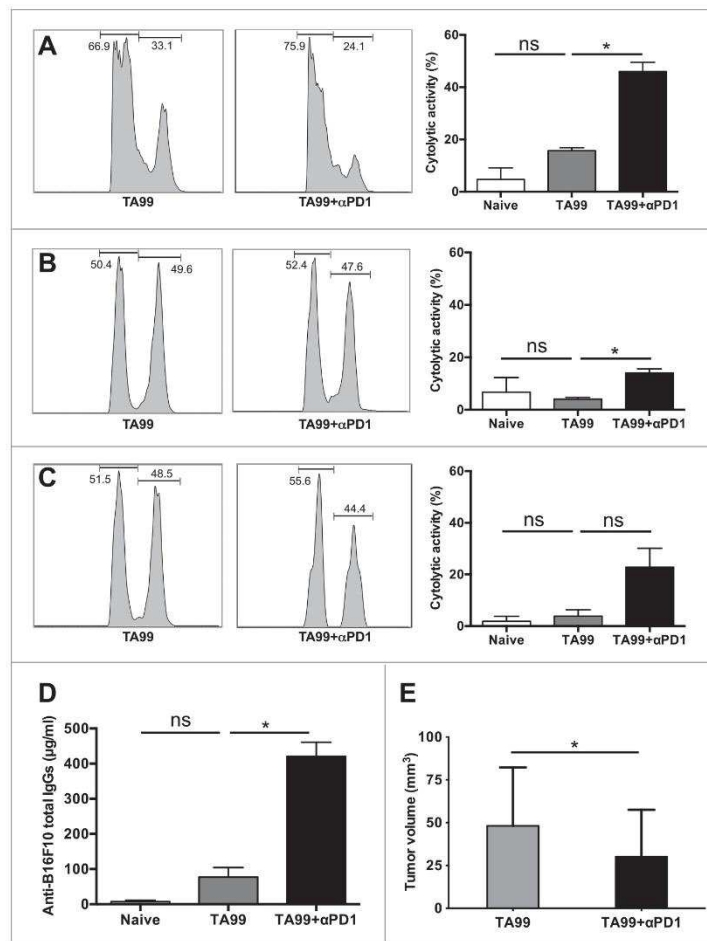


Figure 7. PD-1 blockade synergizes with TA99 treatment to enhance the cellular and humoral adaptive memory responses. Tumor-free TA99-treated mice were challenged (s.c.) with 5.10^4 B16F10 cells. Upon tumor appearance, mice received 2 i.p. injections, anti-PD-1 antibodies (TA99+ α PD1, $n = 5$) or PBS (TA99, $n = 7$). The CTL activity of CD8 splenocytes was evaluated 17 d after the challenge and compared with that of splenocytes from age-matched non-grafted and untreated mice (naive, $n = 8$). Representative flow cytometry histograms (left) and percentages of CTL activity (right) in spleen (A), draining (B) and non-draining lymph nodes (C) from naive and TA99-treated mice treated or not with anti-PD-1 antibodies. (D) Concentration of anti-B16F10 IgGs determined by ELISA in serum samples from naive, TA99-treated and TA99+ α PD1-treated mice on the day of sacrifice for the CTL assay. (E) Tumor growth in TA99-treated and TA99+ α PD1-treated animals. * $p < 0.05$; ns, not significant; determined with the non-parametric Kruskal-Wallis (A, B, C, D) and the non-parametric Mann-Whitney test (E).

anti-tumor immunity definitely requires TA99-dependent development of T cell cytotoxic activity to efficiently control both subcutaneous and intravenous tumor challenges.

We also showed that TA99 treatment induces a humoral immune response characterized by the presence of endogenous anti-B16F10 IgGs in the serum that displayed a significant anti-tumor activity when transferred to mice engrafted with B16F10 tumor cells. However in contrast to TA99 immunotherapy, serum transfer was not sufficient to induce long-term tumor-free survival in our experimental settings. It was previously reported that the B cell population is essential for T cell priming during the early steps of the anti-tumor immune response and for optimal cellular immunity in the B16F10 melanoma

model.³³ Here, we showed that TA99 stimulates the innate immunity at the tumor site. We can thus speculate that endogenous anti-B16F10 antibodies may keep stimulating DCs, macrophages and NK cells through FcR-dependent mechanisms, and therefore maintain the immunomodulatory effects beyond the persistence of the therapeutic mAb. We previously showed such a mechanism in a mouse model of virus-induced leukemia.¹⁰ Although our results demonstrate that tumor-specific antibodies are generated following TA99 monotherapy, B cell contribution to treatment efficacy remains to be fully determined. A similar frequency of tumor inhibition was observed in B16F10 tumor-bearing μ MT mice that lack mature B cells after combined treatment with TA99, extended half-life IL-2,

anti-PD-1 antibody and TRP2 vaccine, suggesting that the host antibody response is not essential for the therapeutic effect of this combination.³⁴ However, one can speculate that with this complex therapeutic combination, the contribution of B cells could be compensated by a very robust T cell response induced by the T cell vaccine together with the anti-PD-1 antibody.

A crucial clinical issue is tumor escape in patients treated with TA-targeting mAbs. Our model, in which 30% of mice remained tumor-free and 70% developed tumors after a significant delay following TA-targeting mAb-based therapy, represents a suitable preclinical model to study tumor escape following anti-tumor antibody treatment. Analysis of the tumor immune microenvironment in TA99-treated mice at the time of tumor detection clearly shows that TA99 monotherapy specifically increases CD4 and CD8 effector cells in the tumor, but not in the spleen. The B16F10 melanoma is known to exploit escape mechanisms, particularly low expression of MHC class I antigens and promotion of a strong immunosuppressive microenvironment.³⁵ In line with these observations, immune infiltrate analysis in progressing B16F10 tumors revealed an increase of the Treg fraction and upregulation of TIM3 and PD-1 in both CD4 and CD8 effector T cells at the tumor site, a phenotype associated with defective secretion of IFN γ and IL-2 by these effector cells after *in vitro* stimulation.

Cancer immunotherapies that target immune checkpoints, including anti-PD-1/anti-PD-L1 antibodies have shown clinical activity in melanoma and also in other cancer types.¹⁸ Several clinical trials are currently assessing the potential of combining immune checkpoint inhibitors, such as anti-PD-1 or anti-CTLA-4 molecules, with various anti-cancer treatments (radiotherapy,^{36,37} chemotherapy,³⁸⁻⁴¹ targeted therapies including mAbs^{42,43}). Recent preclinical studies clearly demonstrated the benefit of adding immune checkpoint inhibitors to increase the anti-tumor effect of TA-targeting mAbs.^{15,34,44-46} In all these studies, the TA-targeting mAb-immune checkpoint inhibitor combination was designed to prevent tumor growth and/or improve regression of established tumors. Specifically, in the B16F10 model, PD-1/PD-L1 blockade with an anti-PD-L1 mAb increases TA99 anti-tumor effect; however, durable anti-tumor responses require the concomitant neutralization of CD47, an anti-phagocytic ligand exploited by tumor cells to evade antibody-dependent clearance by phagocytes.⁴⁵

To our knowledge, the effect of immune checkpoint blockade has never been studied in conditions of tumor escape after TA-targeting monotherapy. Here, we clearly show that anti-PD-1 treatment twice a week soon after primary tumor escape induces a strong Th1 cytokine production by effector T CD4 and CD8 lymphocytes and also $\gamma\delta$ T cells and NK cells. This reduces tumor progression and increases mice survival in the absence of any immune-related adverse events. Even if B16F10 melanoma tumors respond better to TA99 mAb monotherapy, we observed similar synergistic effects in mice grafted with the B16F1 variant, described as less metastatic than the B16F10 cells, but without any quantitative or qualitative differences in the patterns of exposed surface proteins including TRP-1. Combined therapies to sensitize non-responder or resistant patients are currently tested in clinical trials and one of the challenges is to identify the best timing for therapeutics association. Our findings show that by blocking PD-1 it is possible to

boost the host anti-tumor immune response initiated several weeks before by treatment with a TA-targeting mAb. However, in our model the synergy observed between TA99 and anti-PD-1 mAbs was not sufficient to induce complete tumor regression, suggesting the implication of other immune suppressive pathways. Our study also demonstrates, for the first time, that PD-1 inhibitors can potentiate the cellular and humoral memory anti-tumor responses and delay tumor progression in challenged mice. Altogether, these promising results could pave the way for the development of novel therapeutic strategies, particularly for patients with acquired resistance and/or tumor relapse because of the development of an exhausted phenotype after the first therapeutic approach. These results are also of particular interest following the report of a phase 1 clinical trial using the anti-human TRP-1 mAb IMC-20D7S in 27 advanced melanoma patients with evidence of antitumor activity, since one complete response was observed and 10 patients achieved stable disease (Khalil DN et al. Clin Cancer Research 2016).⁴⁷

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

The authors thank the staff of the IRCM animal facility for their technical assistance and Joëlle Simony-Lafontaine for her helpful expertise in the analysis and interpretation of IHC data.

Funding

This work was supported by institutional grants from INSERM, Université de Montpellier and additional support from the Labex MabImprove, (LG), the Cancropole Grand Sud Ouest (projets emergence NB and LG), the Cancropole Grand Sud Ouest and the GIRCI SOOM (API-K, OB) and the Société Française de Dermatologie (OB). L. They is supported by a Ph. D. studentship and H-A. Michaud by a post-doctoral fellowship from the Labex MabImprove. O. Becquart is supported by a fellowship from the Fondation pour la recherche Nuovo Soldati.

Authors contribution

N. Bonnefoy and L. Gros conceived, supervised the study and wrote the manuscript. L. Gros, L. They and H-A. Michaud designed and performed experiments and analyzed the data. B. Guillot and O. Becquart coordinated the melanoma patients' surgery and collected tumor and blood samples. C. Mollevi and M. Jarlier gave expertise for statistical analysis. L. They, H-A. Michaud, V. Lafont and J.F. Eliaou discussed results and reviewed the manuscript.

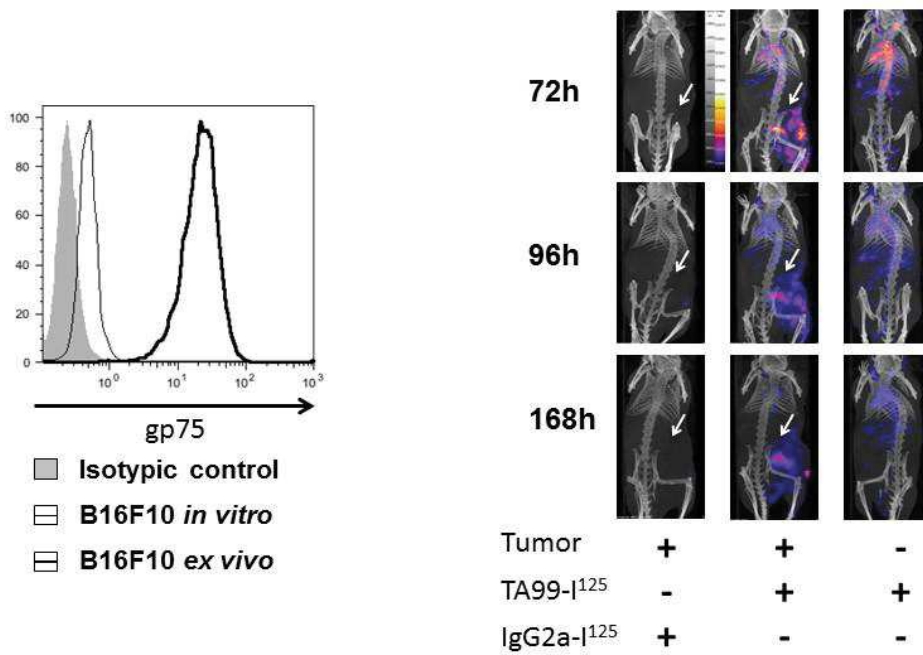
References

1. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science* 2015; 348:56-61; PMID:25838373; <https://doi.org/10.1126/science.aaa8172>
2. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anti-cancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007; 13:1050-9; PMID:17704786; <https://doi.org/10.1038/nm1622>
3. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, Laccabue D, Zerbini A, Camisa R, Bisagni G, et al. Immunoglobulin G

- fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:1789-96; PMID:18347005; <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.8957>
4. Musolino A, Naldi N, Dieci MV, Zannoni D, Rimanti A, Boggiani D, Sgargi P, Generali DG, Piacentini F, Ambroggi M, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and efficacy of preoperative chemotherapy plus trastuzumab and lapatinib in HER2-positive breast cancer. *Pharmacogenomics J* 2016; 16:472-7; PMID:27378608; <https://doi.org/10.1038/tpj.2016.51>
 5. Burkhardt B, Yavuz D, Zimmermann M, Schieferstein J, Kabickova E, Attarbaschi A, Lisfeld J, Reiter A, Makarova O, Worch J, et al. Impact of Fc gamma-receptor polymorphisms on the response to rituximab treatment in children and adolescents with mature B cell lymphoma/leukemia. *Ann Hematol* 2016; 95:1503-12; PMID:27376362; <https://doi.org/10.1007/s00277-016-2731-x>
 6. Hilchey SP, Hyrien O, Mosmann TR, Livingstone AM, Friedberg JW, Young F, Fisher RI, Kelleher RJ, Jr, Bankert RB, Bernstein SH. Rituximab immunotherapy results in the induction of a lymphoma idiotype-specific T-cell response in patients with follicular lymphoma: support for a "vaccinal effect" of rituximab. *Blood* 2009; 113:3809-12; PMID:19196657; <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-185280>
 7. Gros L, Dreja H, Fiser AL, Plays M, Pelegrin M, Piechaczyk M. Induction of long-term protective antiviral endogenous immune response by short neutralizing monoclonal antibody treatment. *J Virol* 2005; 79:6272-80; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15858011; PMID:15858011; <https://doi.org/10.1128/JVI.79.10.6272-6280.2005>
 8. Gros L, Pelegrin M, Michaud HA, Bianco S, Hernandez J, Jacquet C, Piechaczyk M. Endogenous cytotoxic T-cell response contributes to the long-term antiretroviral protection induced by a short period of antibody-based immunotherapy of neonatally infected mice. *J Virol* 2008; 82:1339-49; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18032505; PMID:18032505; <https://doi.org/10.1128/JVI.01970-07>
 9. Nasser R, Pelegrin M, Michaud HA, Plays M, Piechaczyk M, Gros L. Long-lasting protective antiviral immunity induced by passive immunotherapies requires both neutralizing and effector functions of the administered monoclonal antibody. *J Virol* 2010; 84:10169-81; PMID:20610721; <https://doi.org/10.1128/JVI.00568-10>
 10. Michaud HA, Gomard T, Gros L, Thiolon K, Nasser R, Jacquet C, Hernandez J, Piechaczyk M, Pelegrin M. A crucial role for infected-cell/antibody immune complexes in the enhancement of endogenous antiviral immunity by short passive immunotherapy. *PLoS Pathog* 2010; 6:e1000948; PMID:20548955; <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000948>
 11. Stagg J, Sharkey J, Pommey S, Young R, Takeda K, Yagita H, Johnstone RW, Smyth MJ. Antibodies targeted to TRAIL receptor-2 and ErbB-2 synergize in vivo and induce an antitumor immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:16254-9; PMID:18838682; <https://doi.org/10.1073/pnas.0806849105>
 12. Abes R, Gelize E, Fridman WH, Teillaud JL. Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. *Blood* 2010; 116:926-34; PMID:20439625; <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-248609>
 13. Deline C, Metidji A, Fridman WH, Teillaud JL. Anti-CD20 therapy induces a memory Th1 response through the IFN-gamma/IL-12 axis and prevents protumor regulatory T-cell expansion in mice. *Leukemia* 2015; 29:947-57; PMID:25231744; <https://doi.org/10.1038/leu.2014.275>
 14. Park S, Jiang Z, Mortenson ED, Deng L, Radkevich-Brown O, Yang X, Sattar H, Wang Y, Brown NK, Greene M, et al. The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer Cell* 2010; 18:160-70; PMID:20708157; <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.06.014>
 15. Stagg J, Loi S, Divisekera U, Ngiew SF, Duret H, Yagita H, Teng MW, Smyth MJ. Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:7142-7; PMID:21482773; <https://doi.org/10.1073/pnas.1016569108>
 16. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Kataja V, Desmedt C, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol* 2014; 25:1544-50; PMID:24608200; <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu112>
 17. Bianchini G, Pusztai L, Pienkowski T, Im YH, Bianchi GV, Tseng LM, Liu MC, Lluch A, Galeota E, Magazzu D, et al. Immune modulation of pathologic complete response after neoadjuvant HER2-directed therapies in the NeoSphere trial. *Ann Oncol* 2015; 26:2429-36; PMID:26387142; <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv395>
 18. Smyth MJ, Ngiew SF, Ribas A, Teng MW. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. *Nat Rev Clin Oncol* 2016; 13:143-58; PMID:26598942; <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.209>
 19. Teng MW, Galon J, Fridman WH, Smyth MJ. From mice to humans: developments in cancer immunoeediting. *J Clin Invest* 2015; 125:3338-46; PMID:26241053; <https://doi.org/10.1172/JCI80004>
 20. Albanesi M, Mancardi DA, Macdonald LE, Iannascoli B, Zitvogel L, Murphy AJ, Daeron M, Leusen JH, Bruhns P. Cutting edge: Fc gammaRIII (CD16) and Fc gammaRI (CD64) are responsible for anti-glycoprotein 75 monoclonal antibody TA99 therapy for experimental metastatic B16 melanoma. *J Immunol* 2012; 189:5513-7; PMID:23150715; <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201511>
 21. Clynes R, Takechi Y, Moroi Y, Houghton A, Ravetch JV. Fc receptors are required in passive and active immunity to melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:652-6; PMID:9435247; <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.652>
 22. Otten MA, van der Bij GJ, Verbeek SJ, Nimmerjahn F, Ravetch JV, Beelen RH, van de Winkel JG, van Egmond M. Experimental antibody therapy of liver metastases reveals functional redundancy between Fc gammaRI and Fc gammaRIV. *J Immunol* 2008; 181:6829-36; PMID:18981101; <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.6829>
 23. Fuertes Marraco SA, Neubert NJ, Verdeil G, Speiser DE. Inhibitory receptors beyond T cell exhaustion. *Front Immunol* 2015; 6:310; PMID:26167163; <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00310>
 24. Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, Guillaume P, Luescher IF, Sander C, Kirkwood JM, Kuchroo V, Zarour HM. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med* 2010; 207:2175-86; PMID:20819923; <https://doi.org/10.1084/jem.20100637>
 25. Fourcade J, Sun Z, Pagliano O, Guillaume P, Luescher IF, Sander C, Kirkwood JM, Olive D, Kuchroo V, Zarour HM. CD8(+) T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res* 2012; 72:887-96; PMID:22205715; <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2637>
 26. Fourcade J, Sun Z, Pagliano O, Chauvin JM, Sander C, Janjic B, Tarhini AA, Tawbi HA, Kirkwood JM, Moschos S, et al. PD-1 and Tim-3 regulate the expansion of tumor antigen-specific CD8(+) T cells induced by melanoma vaccines. *Cancer Res* 2014; 74:1045-55; PMID:24343228; <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2908>
 27. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, Rosenberg SA. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 2009; 114:1537-44; PMID:19423728; <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195792>
 28. Nasser R, Pelegrin M, Plays M, Gros L, Piechaczyk M. Control of regulatory T cells is necessary for vaccine-like effects of antiviral immunotherapy by monoclonal antibodies. *Blood* 2013; 121:1102-11; PMID:23264590; <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-432153>
 29. Albanesi M, Mancardi DA, Jonsson F, Iannascoli B, Fiette L, Di Santo JP, Lowell CA, Bruhns P. Neutrophils mediate antibody-induced antitumor effects in mice. *Blood* 2013; 122:3160-4; PMID:23980063; <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-497446>
 30. Racki WJ, Covassin L, Brehm M, Pino S, Ignatz R, Dunn R, Laning J, Graves SK, Rossini AA, Shultz LD, et al. NOD-scid IL2rgamma(null) mouse model of human skin transplantation and allograft rejection. *Transplantation* 2010; 89:527-36; PMID:20134397; <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181c90242>

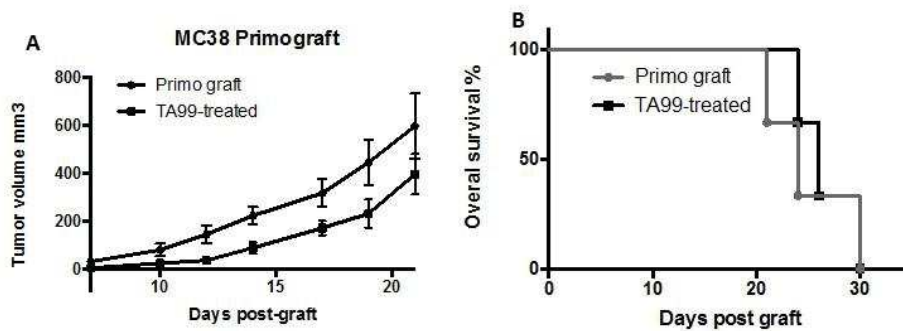
31. Bevaart L, Jansen MJ, van Vugt MJ, Verbeek JS, van de Winkel JG, Leusen JH. The high-affinity IgG receptor, Fcγ₁, plays a central role in antibody therapy of experimental melanoma. *Cancer Res* 2006; 66:1261-4; PMID:16452176; <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2856>
32. Dolcetti L, Peranzoni E, Ugel S, Marigo I, Fernandez Gomez A, Mesa C, Geilich M, Winkels G, Traggiai E, Casati A, et al. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur J Immunol* 2010; 40:22-35; PMID:19941314; <https://doi.org/10.1002/eji.200939903>
33. DiLillo DJ, Yanaba K, Tedder TF. B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. *J Immunol* 2010; 184:4006-16; PMID:20194720; <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903009>
34. Moynihan KD, Opel CF, Szeto GL, Tzeng A, Zhu EF, Engreitz JM, Williams RT, Rakhra K, Zhang MH, Rothschilds AM, et al. Eradication of large established tumors in mice by combination immunotherapy that engages innate and adaptive immune responses. *Nat Med* 2016; 22:1402-10; PMID:27775706; <https://doi.org/10.1038/nm.4200>
35. Ly LV, Sluijter M, van der Burg SH, Jager MJ, van Hall T. Effective cooperation of monoclonal antibody and peptide vaccine for the treatment of mouse melanoma. *J Immunol* 2013; 190:489-96; PMID:23203930; <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200135>
36. Golden EB, Demaria S, Schiff PB, Chachoua A, Formenti SC. An abscopal response to radiation and ipilimumab in a patient with metastatic non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Res* 2013; 1:365-72; PMID:24563870; <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0115>
37. Slovin SF, Higano CS, Hamid O, Tejwani S, Harzstark A, Alumkal JJ, Scher HI, Chin K, Gagnier P, McHenry MB, et al. Ipilimumab alone or in combination with radiotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer: results from an open-label, multicenter phase I/II study. *Ann Oncol* 2013; 24:1813-21; PMID:23535954; <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt107>
38. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, Lebbe C, Baurain JF, Testori A, Grob JJ, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011; 364:2517-26; PMID:21639810; <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1104621>
39. Lynch TJ, Bondarenko I, Luft A, Serwatowski P, Barlesi F, Chacko R, Sebastian M, Neal J, Lu H, Cuillerot JM, et al. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 2012; 30:2046-54; PMID:22547592; <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.4032>
40. Kanda S, Goto K, Shiraishi H, Kubo E, Tanaka A, Utsumi H, Sunami K, Kitazono S, Mizugaki H, Horinouchi H, et al. Safety and efficacy of nivolumab and standard chemotherapy drug combination in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a four arms phase Ib study. *Ann Oncol* 2016; 27:2242-50; PMID:27765756; <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw416>
41. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, Hoeller C, Khushalani NI, Miller WH, Jr, Lao CD, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16:375-84; PMID:25795410; [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70076-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70076-8)
42. Amin A, Lawson DH, Salama AK, Koon HB, Guthrie T, Jr, Thomas SS, O'Day SJ, Shaheen MF, Zhang B, Francis S, et al. Phase II study of vemurafenib followed by ipilimumab in patients with previously untreated BRAF-mutated metastatic melanoma. *J Immunother Cancer* 2016; 4:44; PMID:27532019; <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0148-7>
43. Hodi FS, Lawrence D, Lezcano C, Wu X, Zhou J, Sasada T, Zeng W, Giobbie-Hurder A, Atkins MB, Ibrahim N, et al. Bevacizumab plus ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *Cancer Immunol Res* 2014; 2:632-42; PMID:24838938; <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0053>
44. Linch SN, Kasiewicz MJ, McNamara MJ, Hilgart-Martiszus IF, Farhad M, Redmond WL. Combination OX40 agonism/CTLA-4 blockade with HER2 vaccination reverses T-cell anergy and promotes survival in tumor-bearing mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113:E319-27; PMID:26729864; <https://doi.org/10.1073/pnas.1510518113>
45. Sockolosky JT, Dougan M, Ingram JR, Ho CC, Kauke MJ, Almo SC, Ploegh HL, Garcia KC. Durable antitumor responses to CD47 blockade require adaptive immune stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113:E2646-54; PMID:27091975; <https://doi.org/10.1073/pnas.1604268113>
46. Charlebois R, Allard B, Allard D, Buisseret L, Turcotte M, Pommey S, Chrobak P, Stagg J. PolyI:C and CpG Synergize with Anti-ErbB2 mAb for Treatment of Breast Tumors Resistant to Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Res* 2017; 77:312-9; PMID:27872096; <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1873>
47. Khalil DN, Postow MA, Ibrahim N, Ludwig DL, Cosaert J, Kambhampati SR, Tang S, Grebennik D, Kauh JS, Lenz HJ, et al. An Open-Label, Dose-Escalation Phase I Study of Anti-TYRP1 Monoclonal Antibody IMC-20D7S for Patients with Relapsed or Refractory Melanoma. *Clin Cancer Res* 2016; 22:5204-10; PMID:5117650; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27797971>

TA99 targets specifically TYRP1 antigen highly expressed in B16F10 cells *in vivo*



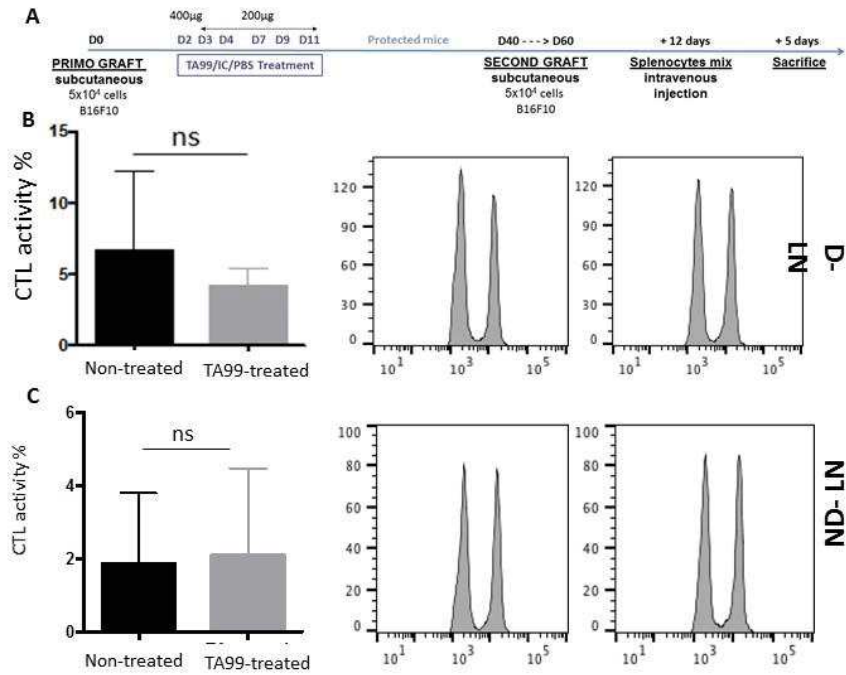
Supplementary Figure 1

Long-lasting protective effects are specific of B16F10 melanoma cells



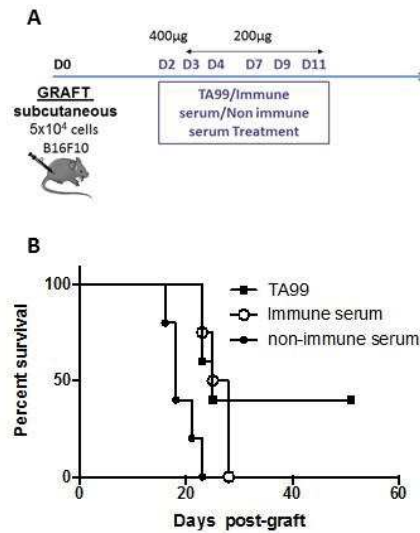
Supplementary Figure 2

Detection of *in vivo* CTL activity after challenge in TA99 protected mice



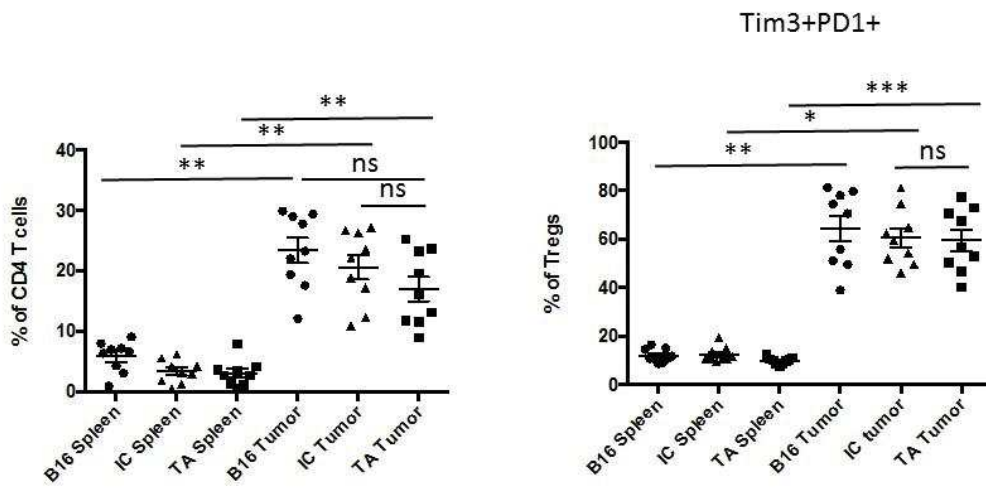
Supplementary Figure 3

Specific anti-tumor seric IgGs transferred into primografted mice increase survival



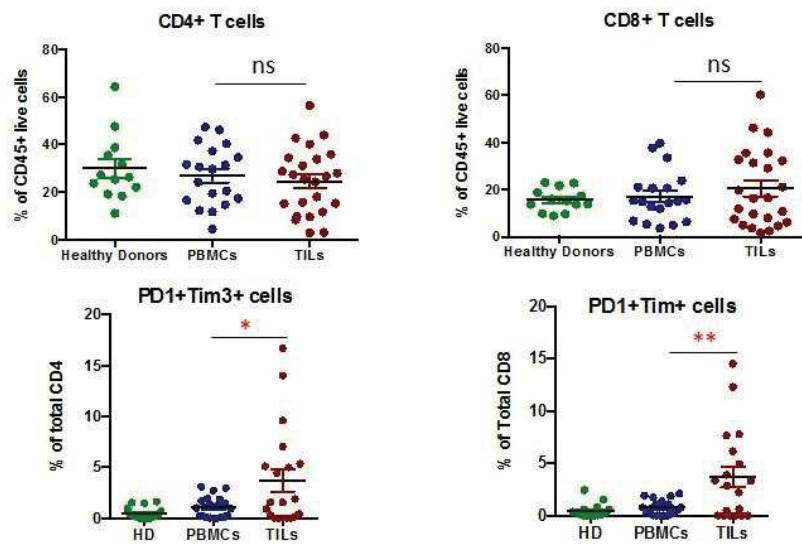
Supplementary Figure 4

Treg infiltrate is independent of TA99 treatment



Supplementary Figure 5

Similar exhausted phenotype is observed in human metastatic melanoma biopsies



Supplementary Figure 6

B. Discussion et perspectives.

1. Les effets de l'AcM TA99 sur la réponse innée.

Nos résultats montrent que le traitement par l'AcM TA99 augmente significativement le pourcentage de macrophages et de DCs produisant de l'IL-12 ainsi que la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK dans la tumeur (Fig. S3). Dans les souris NSG, dépourvues de macrophages fonctionnels, de lymphocytes T et B, de cellules NK et de DCs, le traitement par l'AcM TA99 retarde la croissance tumorale et augmente la survie globale de 5 jours seulement et toutes les souris développent des tumeurs (Fig. 1 E et F) alors que 50% des souris Nude traitées sont protégées d'une primo-greffe. Ces données permettent d'exclure que l'AcM TA99 agit seulement par un effet direct et démontrent l'implication de la réponse innée dans le contrôle et l'élimination précoce des cellules tumorales lors du traitement par l'AcM TA99. Une étude récente dans un modèle de métastases du foie, généré par injection intra-splénique de cellules B16F10, souligne l'implication essentielle des cellules NK dans les effets anti-métastatiques observés chez des souris immunocompétentes (Foerster et al. 2018). Nous ne nous sommes pas intéressés à l'implication et au rôle individuel de chacune des populations NK, DCs et macrophages dans la mise en place de l'initiation de la réponse immunitaire. Pour cela, nous pourrions dépleter sélectivement chacune des populations et étudier l'impact de ces déplétions sur la croissance tumorale et la survie.

La réponse innée est cruciale pour le développement d'une réponse immunitaire adaptative endogène. Une des stratégies pour augmenter le pourcentage de souris répondant au traitement par le TA99 consisterait à améliorer l'initiation de la réponse immunitaire pour augmenter l'efficacité de la réponse anti-tumorale sur le long-terme. Compte tenu des effets immunogéniques de certaines chimiothérapies (p55), l'association de l'AcM TA99 et de l'oxaliplatine représente une combinaison thérapeutique intéressante. Ces données, non publiées, seront développées ultérieurement (p133). Par ailleurs, comme nous l'avons décrit dans l'introduction (p48), CTLA-4 est un point de contrôle immunitaire inhibant l'activation des

lymphocytes T au niveau des ganglions lymphatiques. Une stratégie de combinaison thérapeutique intéressante, mais que nous n'avons pas explorée, serait d'associer un α -CTLA-4 à l'AcM TA99 afin de lever ce frein immunitaire précoce souvent exploité par les cellules tumorales pour échapper à la réponse immunitaire anti-tumorale. Avant d'envisager une thérapie combinée in vivo, il sera nécessaire de déterminer la cinétique d'expression de CTLA-4 sur les différentes populations du MET.

2. Les effets tardifs de l'AcM TA99.

Nous avons observé que 50% des souris qui demeurent sans tumeur suite au traitement par l'AcM TA99 développent une réponse anti-tumorale, caractérisée par une activité humorale et cellulaire mémoire protectrice lors d'une deuxième greffe de cellules B16F10 (figure 1G et figure 3 A B C). Dans le sérum des souris traitées avec l'AcM TA99, la réponse humorale, se caractérise par la présence d'IgG α -B16F10 et présente une activité anti-tumorale significative mise en évidence lors du transfert de ce sérum chez des souris greffées avec des cellules tumorales B16F10 (figure 3 D E). Néanmoins, contrairement à l'immunothérapie par l'AcM TA99, le transfert de sérum n'est pas suffisant pour induire une survie sur le long-terme dans nos conditions expérimentales. L'AcM TA99 est une IgG2a qui présente une forte capacité à médier une réponse immunitaire Fc dépendante. La nature des IgG α -B16F10 qui composent le sérum n'a pas été caractérisé mais pourraient expliquer l'efficacité réduite du transfert adoptif si la proportion d'IgG2a est faible. Utiliser lors de tests ELISA des α -IgG spécifiques des différentes sous-classes (α -IgG2a, α -IgG1, α -IgG2b...) permettrait de mesurer leurs concentrations. Des données de la littérature soulignent l'importance de la réponse LB dans la réponse anti-tumorale. Notamment, la déplétion en lymphocytes B (traitement α -CD20) favorise le développement tumoral et les métastases pulmonaires dans un modèle de mélanome B16F10 et est associée à une diminution des fonctions effectrices des LT mémoires, et des LT CD4 et CD8 sécrétant de l'IFN- γ et du TNF- α (DiLillo, Yanaba, et Tedder 2010) par rapport aux animaux contrôles. Nos résultats de transfert de sérum suggèrent que les Ac endogènes α -B16F10 participent sûrement au maintien de l'activation des DCs, des

macrophages et des cellules NK, par un mécanisme FcR dépendant, prenant le relais de l'AcM TA99 lorsque celui-ci a disparu de la circulation générale. De plus, les lymphocytes B peuvent jouer le rôle de CPA et participer à l'élaboration de la réponse adaptative efficace sur le long terme.

Outre la réponse humorale, l'AcM TA99 favorise la mise en place d'une réponse cytotoxique protectrice. Il s'agit d'une réponse de type vaccinale caractérisée par une réponse anti-tumorale mémoire initiée par l'AcM TA99. Cependant chez les souris protégées de la primo-greffe, ayant subi une deuxième greffe, certaines tumeurs primaires se développent avec un délai sans nécessairement de développement sur le site de la deuxième greffe. Ce phénomène souligne un contrôle de la croissance tumorale de la primo-greffe et non une éradication complète et efficace de toutes les cellules tumorales.

Afin de mettre en évidence l'implication des réponses humorales et cellulaires mémoires, il apparaît nécessaire de réaliser une déplétion des lymphocytes B ou des LT CD4 et CD8. Une déplétion précoce, avant le début du traitement avec l'AcM TA99 permettrait de mettre en évidence l'implication des lymphocytes B comme APC et des LT 4 et 8 dans la réponse primaire. Une déplétion plus tardive, juste avant que les souris protégées de la première greffe soient challengées par une seconde greffe, permettrait d'évaluer l'implication de ces populations dans la mise en place de la réponse immunitaire mémoire.

3. La caractérisation de l'échappement au traitement à l'AcM TA99.

En clinique, un des problèmes majeurs concerne l'échappement aux thérapies administrées en première ligne et notamment celles utilisant des AcM ciblant la cellule tumorale. Bien qu'aucun AcM ciblant la cellule tumorale ne soit encore accepté en clinique dans le cadre du mélanome, notre modèle est particulièrement approprié pour étudier les mécanismes d'échappement puisque 70% des souris traitées par le TA99 montrent un retard de croissance tumorale significatif mais sans contrôle sur le long-terme. L'analyse de l'infiltrat immunitaire des tumeurs qui se développent chez les souris traitées par l'AcM TA99, montre une

augmentation des populations effectrices CD4 et CD8 au sein de la tumeur, cependant cet effet est insuffisant pour assurer une protection efficace. Ces populations, présentes mais non fonctionnelles, sont caractérisées par une augmentation de la co-expression PD-1⁺/Tim-3⁺ (Fourcade et al. 2010, 2012, 2014; Ahmadzadeh et al. 2009). Nous avons aussi mis ce phénotype en évidence dans des biopsies de patients atteints de mélanomes métastatiques de type IV. De ce fait, PD-1 semble un candidat intéressant en tant que cible thérapeutique potentielle dans notre modèle d'étude. Les immunothérapies anti-cancéreuses qui ciblent les points de contrôles immunitaires tels que les Ac α -PD-1, montrent une activité clinique dans le mélanome et d'autres cancers (Smyth et al. 2016). Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux essais cliniques évaluent les effets thérapeutiques de combinaison d'inhibiteurs des points de contrôles immunitaires avec différents traitements anti-cancéreux (radiothérapie, (Golden et al. 2013; Slovin et al. 2013) chimiothérapies, (C. Robert et al. 2011; Lynch et al. 2012; Kanda et al. 2016; Weber et al. 2015) thérapies ciblées dont les AcM (Amin et al. 2016; Weber et al. 2015)). L'un des défis en oncologie consiste à identifier le meilleur moment pour l'association thérapeutique. Dans notre étude, l'association thérapeutique d'un α -PD-1 à distance de l'AcM, i.e. au moment de l'échappement tumoral, ralentit significativement la croissance tumorale et améliore la survie. Nos résultats montrent qu'en bloquant l'interaction de PD-1 avec son ligand au moment de l'échappement, il est possible de stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale de l'hôte, initiée plusieurs semaines auparavant par le traitement avec un AcM ciblant la cellule tumorale. Nous avons mis en évidence que le traitement par α -PD-1 augmente les fonctions effectrices des LT CD4, CD8, T $\gamma\delta$ et des NK soulignant l'effet de l'AcM sur la réponse effectrice. Cependant nous n'avons pas étudié les effets de la thérapie α -PD-1 sur d'autres populations du MET tels que les macrophages. En effet, l'expression de PD-1 sur les macrophages infiltrant la tumeur (MITs) est corrélée à une diminution de leurs propriétés de phagocytose dans des modèles de cancers murins et humains. Ainsi, le blocage de la voie PD-1/PD-L1 améliore la phagocytose par les MITs, ralentit la croissance tumorale et améliore la survie des souris (Gordon et al. 2017).

Cependant, dans notre modèle, malgré un délai significatif dans la croissance tumorale et une amélioration significative de la survie globale, la synergie observée entre les AcM TA99 et α -PD-1 n'est pas suffisante pour induire une régression complète de la tumeur, suggérant l'implication d'autres voies immunosuppressives.

Les limites de la combinaison thérapeutique associant l'AcM TA99 et un α -PD-1 soulignent la présence d'autres voies immunosuppressives nécessitant d'être bloquées par l'ajout de thérapies complémentaires. En effet, de nombreuses études combinant de nombreuses thérapies se développent avec, par exemple, l'étude de Sockolosky et al qui démontre, dans un modèle de tumeur de mélanome B16F10, un effet anti-tumoral de la tri-thérapie associant l'AcM TA99, un α -PD-1 et un AcM dirigé contre CD47, un ligand exploité par les cellules tumorales pour échapper à l'élimination par les macrophages (Sockolosky et al. 2016). De plus, une autre étude démontre dans trois modèles syngéniques, mélanome (B16F10), cancer du sein (DD-Her2/Neu) et col de l'utérus (TC1) que la mise en place d'une réponse anti-tumorale efficace nécessite quatre composants: un Ac ciblant un Ag tumoral, une IL-2 recombinante avec une demi-vie prolongée, un α -PD-1 et un vaccin (Moynihan et al. 2016). Ainsi, ces études démontrent la nécessité de combiner des thérapies pour potentialiser les effets de l'AcM TA99 et obtenir une réponse immunitaire anti-tumorale efficace sur le long-terme.

L'analyse de l'infiltrat immunitaire des tumeurs de souris traitées par l'AcM TA99 et l' α -PD-1 met en évidence une sur-expression des ectonucleotidases CD39 et CD73 impliquées dans la voie de dégradation de l'ATP en adénosine. Cette surexpression pourrait être responsable d'une augmentation de la concentration d'adénosine favorisant un microenvironnement immunosuppresseur (p42). Des cellules NK et LT CD4+ et CD8+ en co-culture avec des lignées cellulaires de carcinome ovarien exprimant CD39 et CD73, présentent une capacité proliférative et lytique accrue *in vitro* après un traitement d' α -CD39 ou d' α -CD73 (Häusler et al. 2014). Ces effets ont été directement attribués à la réduction de la production d'adénosine dans le système de culture, favorisant la réponse immunitaire. De plus, le traitement par un

Ac α -CD73 retarde significativement la croissances de tumeurs primaires de cancer mammaire chez des souris immunocompétentes avec une inhibition significative du développement de métastases pulmonaires spontanées (Stagg et al. 2010). Les auteurs ont démontré que l'efficacité thérapeutique nécessitait la présence d'un SI compétent, indiquant que le blocage de la génération d'adénosine augmentait l'immunosurveillance. Nous nous sommes intéressés pour la suite de ce projet à la combinaison de l'AcM TA99 avec l' α -PD-1 et un α -CD73 (résultats présentés p123).

En conclusion, les travaux de cet article démontrent un effet de type vaccin de l'AcM anti-tumoral TA99 avec une protection sur le long terme des souris, protection caractérisée par une réponse humorale et cellulaire mémoire. L'association d'un Ac α -PD-1 au moment de la progression tumorale chez les souris qui échappent au traitement par l'AcM TA99 réactive la réponse immunitaire initiée plus tôt par ce même AcM. Bien que la combinaison TA99 + α -PD-1 améliore significativement la survie des souris, ces dernières développent toutes une tumeur dont la croissance tumorale est significativement ralentie mais non contrôlée sur le long-terme. La caractérisation du MET et l'analyse phénotypique des populations immunitaires infiltrant la tumeur, nous permettent d'envisager d'autres stratégies de thérapies combinées développées ci-après pour améliorer les effets anti-tumoraux de l'AcM TA99.

RESULTATS PARTIE 2 :

**Combinaison thérapeutique de l'AcM TA99 avec un α -PD-1
et un α -CD73 au moment de l'échappement.**

A. Introduction.

Les résultats obtenus lors de la combinaison des traitements par les AcM TA99 et α -PD-1 ont permis de souligner l'intérêt de cibler des points de contrôles immunitaires pour révéler les effets immunomodulateurs de l'AcM anti-tumoral. Malgré un délai dans la croissance tumorale et la survie, la tumeur se développe et les souris ne sont pas protégées sur le long-terme. Dans l'objectif d'améliorer la protection après l'échappement, nous avons cherché à caractériser d'autres voies immunosuppressives qui pourraient être mises en place lors de la combinaison thérapeutique par l'ACM TA99 + α -PD-1. L'analyse phénotypique de l'infiltrat immunitaire des tumeurs (300mm³) de souris traitées avec la combinaison montre une forte expression de l'enzyme CD73 (**Figure 27** C, D et E).

Nous avons détaillé dans l'introduction (p42) les mécanismes par lesquels l'ATP extracellulaire est converti en adénosine par l'activité enzymatique des deux ectonucleotidases membranaires CD39 et CD73. L'expression au sein du MET de ces deux enzymes est susceptible d'induire une augmentation de la production d'adénosine conduisant à une immunosuppression. Des études *in vivo* soulignent l'importance de cette voie et plus particulièrement de CD73 dans les mécanismes développés par la tumeur pour échapper à la réponse immunitaire. Des souris déficientes en CD73 empêchent efficacement la croissance dans un modèle de cancer du côlon (MC38), de lymphome (EG7), de cancer du sein (AT-3) et dans un modèle de mélanome (B16F10) (Stagg et al. 2012). De plus, une augmentation des cellules T CD8⁺ infiltrant la tumeur et circulant en périphérie a été mise en évidence dans des souris déficientes en CD73 (Long Wang et al. 2011). Par ailleurs, les inhibiteurs chimiques APCP et POM-1, qui inhibent les fonctions catalytiques des enzymes CD73 et CD39 respectivement, inhibent la croissance tumorale et la formation de métastases (Stagg et al. 2011; Long Wang et al. 2011; Sun et al. 2010). Les immunothérapies dirigées contre CD73 ont montré des propriétés anti-tumorales similaires (Stagg et al. 2010) démontrant que le blocage de cette voie restaure un contrôle tumoral efficace. Enfin, la surexpression de l'enzyme CD73 est de mauvais pronostic dans différents types de cancers tels que le cancer

du sein triple négatif (Sherene Loi et al. 2013) et le cancer colorectal (X.-R. Wu et al. 2012) et est associée à une résistance aux thérapies (Serra et al. 2011; Sherene Loi et al. 2013).

En ce qui concerne le mélanome (Monteiro et al. 2018), une étude récente a montré que les lignées cellulaires dérivées de mélanomes métastatiques exprimaient plus de CD73 que celles dérivées de mélanocytes normaux ou de mélanomes primaires (Sadej, Spychala, et Skladanowski 2006). Les mélanomes primaires, dont la transcription du gène NT5E (qui code le CD73) n'est pas diminuée, métastasent plus souvent que ceux dont la transcription est diminuée (H. Wang et al. 2012). En étudiant les cellules de mélanome chez des souris déficientes en CD73, il a été montré que l'enzyme CD73 favorise la signalisation de la MAP-kinase, la croissance tumorale et l'angiogénèse (Koszałka et al. 2015). La même étude a rapporté une contribution du CD73, associée aux cellules tumorales, à la formation de métastases *via* la fixation à l'endothélium (Koszałka et al. 2015). En outre, le complexe CD73-ténascine-C s'est révélé impliqué dans la migration et l'invasion cellulaire des lignées de mélanome (Sadej et Skladanowski 2012; Sadej, Spychala, et Skladanowski 2006). Dans un modèle murin de mélanome, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique du CD73 a amélioré l'immunité anti-tumorale médiée par les lymphocytes T et B et réduit la croissance tumorale (Forte et al. 2012).

En raison de l'implication de CD73 dans de nombreuses voies favorisant la croissance tumorale, cette ectonucleotidase semble être une cible prometteuse dans le développement de stratégies de thérapies combinées dans notre modèle. Nous avons donc associé un α -CD73 (un isotype neutralisant, le TY/23) à la combinaison des AcM TA99 / α -PD-1.

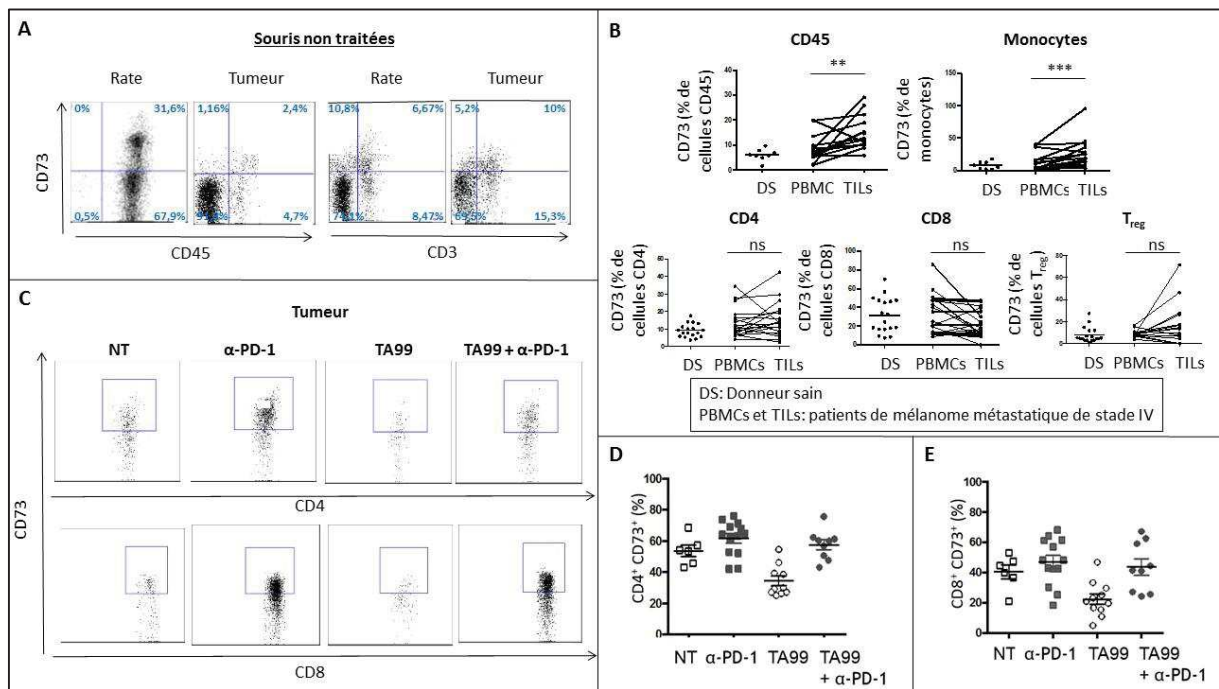


Figure 27 Expression de CD73 dans les populations immunitaires de souris porteuses de tumeurs de mélanome B16F10.

(A) Représentation DOT/PLOT de l'expression de CD73 dans les populations CD45⁺ et CD3⁺ dans la rate et la tumeur (300mm³) de souris non traitées (B) Expression de CD73 dans les populations CD45⁺, monocytes, CD4⁺, CD8⁺ et T_{reg} chez des donneurs sains (DS) et dans les PBMCs et les TILs de patients atteints de mélanomes métastatiques de stade IV. (C) Représentation DOT/PLOT de l'expression de CD73 dans les populations LT CD4⁺ et LT CD8⁺ des tumeurs (300mm³) de souris non traitées (NT), traitées avec l' α -PD-1 (α -PD-1), l'AcM TA99 (TA99) ou en combinaison (TA99 + α -PD-1). Représentation graphique du pourcentage de LT CD4⁺ (C) et LT CD8⁺ (D) exprimant CD73.

B. Résultats.

1. L'expression de CD73.

L'analyse des populations immunitaires de la rate et la tumeur de souris non traitées démontre une expression de CD73 principalement sur les populations immunitaires avec 32% de cellules CD73⁺ dans la rate et 2.4% de CD73⁺ parmi les 7.1% de CD45⁺ dans la tumeur, c'est à dire 33% de CD45⁺. Parmi les CD45⁺, les populations CD73⁺ sont principalement des cellules T (44% et 39% des CD3⁺ dans la rate et la tumeur respectivement) (**Figure 27 A**). Parallèlement, dans des biopsies de tumeurs de patients atteints de mélanomes métastatiques, on observe une augmentation significative de l'expression de CD73 dans l'infiltrat CD45⁺ *versus* la périphérie ainsi que dans les populations de monocytes (**Figure 27 B**). Il semblerait qu'il y ait une tendance à l'augmentation non significative de l'expression de CD73 par les T_{reg} (**Figure 27 B**). Par contre on n'observe pas d'augmentation significative de l'expression de CD73 dans les populations T CD4 et T CD8 des patients atteints de mélanomes métastatiques (ayant bénéficiés de diverses thérapies) à l'inverse des observations faites chez les souris (**Figure 27 B**). La tumeur des souris non traitées montre que près de 60% des CD4 (**Figure 27 C et D**) et 40 à 60% des CD8 (**Figure 27 C et E**) expriment CD73. Le traitement α -PD-1 ne modifie pas significativement ce pourcentage (**Figure 27 C, D et E**). En revanche, le traitement par l'AcM TA99 diminue le pourcentage des cellules T CD4 (en moyenne 40%) (**Figure 27 C et D**) et des T CD8 (en moyenne 20%) (**Figure 27 C et E**) exprimant CD73. La combinaison TA99 + α -PD-1 semble « annuler » les effets du l'AcM TA99 seul, avec une expression de CD73 semblable au groupe α -PD-1 seul dans les deux populations étudiées (**Figure 27 C, D et E**). De plus, le pourcentage de cellules exprimant CD39 dans les T CD4 (en moyenne 40%) et T CD8 (en moyenne 50%) est élevé mais n'est pas modifié par les traitements appliqués aux souris (données non présentées). Inhiber les fonctions enzymatiques de CD73, dont l'expression est régulée positivement par la combinaison avec l' α -PD-1, pourrait diminuer les taux d'adénosine et ainsi favoriser un microenvironnement propice à engendrer une réponse immunitaire anti-tumorale efficace.

Nous avons donc associé à l' α -PD-1, un α -CD73 au moment de l'échappement suite au traitement par l'AcM TA99, afin de bloquer cette voie immunosuppressive et révéler les effets immunomodulateurs de l'AcM.

2. La combinaison avec l' α -CD73 retarde la croissance tumorale et améliore la survie.

La combinaison de l'AcM TA99, l' α -PD-1 et l' α -CD73 ralentit la croissance tumorale et améliore la survie des souris par rapport aux monothérapies ou à la combinaison de l'AcM TA99 + α -PD-1 (**Figure 28** A, B et D). La moitié des souris traitées avec la trithérapie, présentent un contrôle de la croissance tumorale 30 jours post-traitement (**Figure 28** C). Malgré un effet moins important de l'AcM TA99 dans cette expérience (voir discussion p128), ces résultats suggèrent l'implication de la voie adénosine dans l'échappement tumoral.

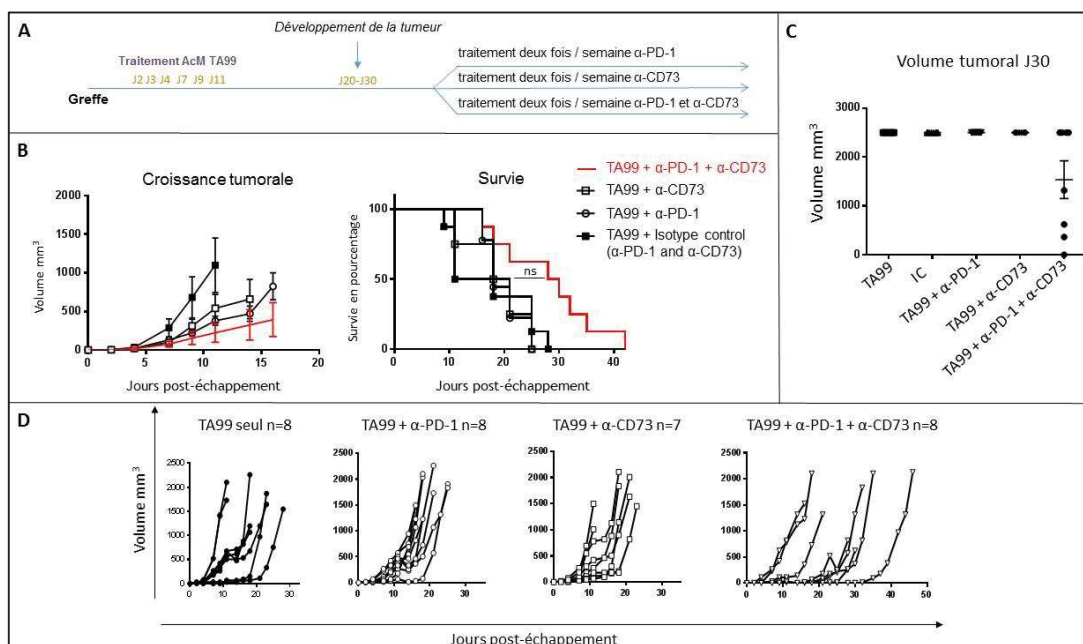


Figure 28 Les effets *in vivo* de la combinaison de l'AcM TA99 + α -PD-1 + α -CD73.

(A) Des souris immunocompétentes ont été greffées avec 5.10^4 B16F10, traitées par des injections (IP) de l'AcM TA99 seul (TA99) ou associé à l' α -PD-1 (TA99 + α -PD-1) ou l' α -CD73 (TA99 + α -CD73) ou la combinaison des deux (TA99 + α -PD-1 + α -CD73) ou bien avec le contrôle isotypique commun à ces deux inhibiteurs de points de contrôles immunitaires (TA99 + Contrôle isotypique). (B) Croissance tumorale par groupe et courbe de survie Kaplan Meier. (C) Volume tumoral 30 jours (J30) après la greffe. (D) Croissance tumorale individuelle en mm^3 .

C. Discussion et perspectives.

L'effet thérapeutique obtenu *in vivo* avec la combinaison TA99, α -PD-1 et α -CD73 se traduit par un ralentissement de la croissance tumorale et une amélioration de la survie. Plusieurs exemples de la littérature démontrent l'intérêt de bloquer la voie adénosine en présence d'une immunothérapie α -PD-1. En effet, des études réalisées dans des modèles murins de mélanomes indiquent que le traitement avec l'APCP, un inhibiteur sélectif de CD73, augmente l'activité d'un inhibiteur de point de contrôle immunitaire (α -PD-1) en améliorant la réponse immunitaire anti-tumorale (Iannone et al. 2014). De plus, l'activation du récepteur à l'adénosine A2A favorise l'expression de PD-1 (Mittal et al. 2014; Allard et al. 2013) soulignant l'intérêt de bloquer la voie de production de l'adénosine pour freiner l'apparition d'une autre voie immunosuppressive. Ainsi des études démontrent que bloquer CD73 augmente significativement l'activité d'un α -PD-1 dans des tumeurs MC38 (cancer du côlon) et RM1 (cancer de la prostate) et le cancer mammaire métastatique 4T1.2. Par ailleurs, le traitement α -CD73 augmente l'activité d'un AcM ciblant la cellule tumorale (α -ErbB2) dans les traitements de tumeurs greffées ou spontanées de cancer du sein (Turcotte et al. 2017).

Cependant les résultats obtenus *in vivo* dans notre étude restent non significatifs. Nous envisageons de reproduire cette expérience. En effet, dans cette expérience, l'efficacité de l'AcM TA99 est faible comparée à celle que nous avons obtenue dans les expériences précédentes. La faible efficacité de l'AcM TA99 seul se traduit par des effets modérés de la combinaison avec l' α -PD-1 soulignant cependant l'importance d'initier des effets immunomodulateurs avec l'AcM qui cible la cellule tumorale pour obtenir un effet synergique conséquent. Si nous pouvons exclure un quelconque problème du lot commercial de l'AcM TA99 dans la diminution des effets observés *in vivo*, cette diminution d'efficacité de l'AcM TA99 reste difficile à expliquer. Cependant nos résultats soulignent qu'en rétablissant l'efficacité de l'AcM TA99, les effets synergiques des combinaisons avec l' α -PD-1 et l' α -CD73 devraient être plus soutenus d'où la nécessité de reproduire cette expérience.

Par ailleurs, indépendamment des problèmes rencontrés avec l'AcM TA99, caractériser l'efficacité *in vivo* de l' α -CD73 est nécessaire pour poursuivre cette étude. Il serait intéressant de mesurer la concentration d'adénosine par spectrométrie de masse MALDI-TOF au sein des tumeurs de souris selon les conditions de traitement. Ainsi, corrélérer les effets thérapeutiques de l' α -CD73 à une diminution de la concentration d'adénosine au sein du MET renforcera l'idée que bloquer des voies immunosuppressives non redondantes favorise la mise en place d'une réponse anti-tumorale efficace.

L'analyse phénotypique de l'infiltrat immunitaire des tumeurs de souris met en évidence une forte expression de CD39 indépendamment du traitement administré. Bloquer la voie de l'adénosine en inhibant l'activité enzymatique de CD39 permettrait en même temps d'augmenter les concentrations d'ATP, une molécule immuno-stimulante, tout en diminuant la production d'adénosine. Il est important de noter qu'à l'heure actuelle aucun Ac ciblant CD39 et inactivant ses fonctions enzymatiques n'est disponible chez la souris.

Outre les effets de la combinaison sur l'échappement à la primo-greffe, nous envisageons également de comparer l'efficacité des différentes combinaisons thérapeutiques et notamment le blocage de la voie adénosine par l'AcM α -CD73, lors de l'échappement au « challenge », pour étudier les effets potentialisateurs sur la réponse anti-tumorale mémoire initiée par l'AcM TA99 (réponse mémoire efficace chez 50% des souris « challengées » qui ne développent pas de tumeur). Les effets thérapeutiques des combinaisons après la primo-greffe ou le « challenge » seront évalués *in vivo* sur la croissance tumorale et la survie des souris. De plus, comparer l'infiltrat immunitaire des tumeurs, en fonction des traitements appliqués mais aussi du contexte (primo greffe vs « challenge »), permettra de mettre en évidence des signatures phénotypiques et fonctionnelles spécifiques d'une situation donnée.

Dans notre modèle, la combinaison des AcM TA99, α -PD-1 et α -CD73, se traduit par un ralentissement de la croissance tumorale sans régression. Associer une thérapie supplémentaire, dont les effets seraient plus focalisés sur les étapes initiales de la mise en place de la réponse anti-tumorale semble intéressante. Des études récentes ont mis en

évidence l'efficacité de molécules (le PV10 ou Rose Bengal Disodium, le Talimogène laherperepvec et le LTX-315) administrées au niveau du site tumoral (intra-lésionnel) qui lysent de manière spécifique les cellules tumorales tout en favorisant une mobilisation de la réponse immunitaire. Une étude de phase I publiée en 2008 (Thompson, Hersey, et Wachter 2008) démontre un effet de type « chimio-ablation » du Rose Bengal Disodium sans effet secondaire majeur chez des patients atteints de mélanome métastatiques. L'étude met en évidence une réponse objective chez plus de 50% des patients (dose dépendente) et des effets bystander chez 27% des patients corrélé à une réponse au site d'injection primaire. Actuellement, une solution de 10% de Rose Bengal Disodium (PV-10) est en cours de développement pour une application intra-lésionnelle dans le cadre de mélanomes, de cancers du sein métastatique et du cancer du foie (Weide, Neri, et Elia 2017). La rapidité d'efficacité de cette molécule (30 à 60min pour induire l'autolyse des cellules tumorales) renforce l'intérêt de ce type de thérapie pour éliminer les cellules tumorales et favoriser le relargage massif d'antigènes tumoraux afin d'améliorer l'efficacité de la réponse anti-tumorale. Une autre thérapie pourrait être intéressante en combinaison avec l' α -PD-1, le LTX-315, un peptide modifié chimiquement pour perturber les membranes plasmiques des cellules tumorales qui favorise la libération de DAMPs (Sveinbjörnsson et al. 2017). L'injection locale de LTX-315 diminue la quantité de T_{reg} et de MDSCs et est associée à une diminution de PD-1 (Yamazaki et al. 2016). Cette molécule est actuellement en essai clinique de phase I sur des patients porteurs de tumeurs transdermiques accessibles. Il serait intéressant de tester cette molécule, en association avec l'AcM TA99. En effet, cette molécule permettrait à la fois d'éliminer les cellules tumorales, de diminuer les populations immunosuppressives au sein de la tumeur tout en augmentant l'activation du SI via la libération de DAMPs. Enfin, l'utilisation d'un virus oncolytique, tel que le Talimogène laherperepvec ou T-VEC, est aussi une piste intéressante. Le T-VEC résulte de la modification génétique du virus de l'herpès simplex permettant d'atténuer sa pathogénicité en remplaçant les gènes de neurovirulence par des séquences GM-CSF qui stimulent la reconnaissance des cellules de mélanome par le SI (Festino et al. 2018). Les différents essais cliniques menés sur des patients atteints de mélanome soulignent un effet

sur les lésions à distances du site traité, sans effet secondaire notable. En effet, le relargage de cytokines initie une réponse systémique spécifique médiée par les cellules CTL CD8⁺ (Liu et al. 2009). Des études cliniques sont en cours pour définir l'activité du T-VEC en combinaison avec des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires tels que le pembrolizumab (Long et al. 2016) ou l'ipilimumab (Puzanov et al. 2016). En effet, des résultats encourageants du T-VEC sont rapportés chez des patients mutés BRAF réfractaires à des thérapies ciblant des points de contrôles immunitaires (pembrolizumab et ipilimumab) (Seremet et al. 2018). De plus, cette immunothérapie oncolytique a été approuvée par la FDA et l'EMA à la fin 2015 sous le nom d'Imlygic™ pour les mélanomes métastatiques. Une étude préclinique testant l'efficacité thérapeutique d'une combinaison utilisant un AcM anti-tumoral (TA99), un inhibiteur de point de contrôle immunitaire (α -PD-1) et le T-VEC serait d'autant plus intéressante que des thérapies équivalentes existent en clinique et sont utilisées ou en essais chez l'Homme.

Dans ce contexte, l'intérêt de notre modèle est de pouvoir étudier l'échappement aux thérapies et de mettre en évidence de nouveaux mécanismes impliqués qui représentent des cibles thérapeutiques potentielles pour améliorer la réponse anti-tumorale dans le cadre d'échappement à une réponse primaire (après une primo-greffe) ou à une réponse mémoire (après challenge).

RESULTATS PARTIE 3 :

Combinaison de l'AcM TA99 avec une chimiothérapie

immunogénique (l'oxaliplatine).

A. Introduction.

Dans les chapitres précédents, nous nous sommes intéressés à réactiver la réponse anti-tumorale initiée par l'AcM TA99, au moment de la phase d'échappement. Dans cette partie, nous nous intéressons à renforcer les effets de l'AcM TA99 lors de la phase d'initiation de la réponse immunitaire. Le traitement par l'AcM TA99 entraîne une réponse sur le long-terme chez 30% des souris traitées, parmi lesquelles 50% ont une réponse mémoire efficace (figure 1 A et G de l'article publié). Afin d'augmenter l'efficacité de cette réponse mémoire et le pourcentage de souris protégées sur le long-terme, une autre stratégie de combinaison thérapeutique consiste à améliorer la présentation antigénique en associant de manière concomitante une chimiothérapie entraînant une mort immunogénique (p55).

L'oxaliplatine est une chimiothérapie dite immunogénique (Hato et al. 2014; Tesniere et al. 2010), qui provoque des dommages irréversibles de l'ADN des cellules en prolifération (Saris et al. 1996; Woynarowski et al. 1998). L'oxaliplatine est utilisée en clinique dans plusieurs types de cancer tels que le cancer colorectal ou dans le cadre de cancers résistants au cisplatine comme les cancers de l'estomac, du pancréas, de l'ovaire, du sein et du poumon (Di Francesco, Ruggiero, et Riccardi 2002; Dilruba et Kalayda 2016). Bien que non utilisée dans le mélanome, l'oxaliplatine montre une activité cytotoxique *in vitro* sur des lignées de mélanomes humains et souligne l'intérêt d'évaluer en clinique ses effets adjuvants en association à d'autres thérapies (Mohammed et Retsas 2000). De nombreuses études s'intéressent, en effet, au potentiel adjuvant de chimiothérapies favorisant l'ICD, telle que l'oxaliplatine dans le contexte de combinaisons avec des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires modulant la réponse anti-tumorale (p84). Par exemple, dans un modèle murin de cancer colorectal, l'association du FOLFOX à un α -PD-1 inhibe la croissance tumorale et améliore la survie (Dosset et al. 2018). Dans le cancer colorectal chez l'Homme, un essai clinique est en cours combinant le FOLFOX et des Ac ciblant PD-1 ou PD-L1 (NCT01633970). Par ailleurs, dans le cancer de l'estomac, une étude teste l'efficacité d'un Ac dirigé contre PD-L1 après traitement par le FOLFOX (NCT02625610) (Ghiringhelli et Bruchard 2017).

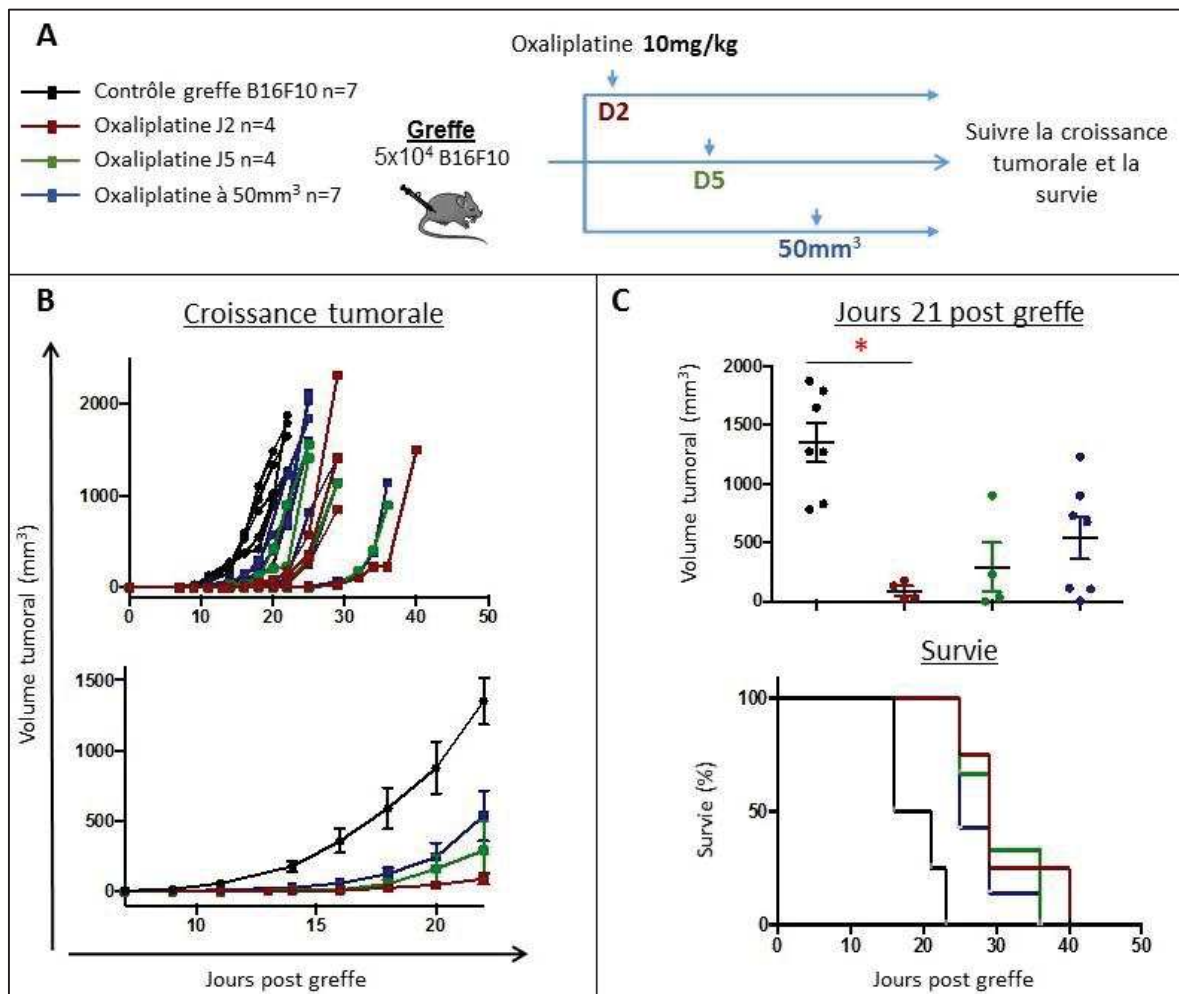


Figure 29 Etude des effets de l'oxaliplatine sur la lignée B16F10.

(A) Schéma du protocole de traitement des souris C57Bl/6N à J2, J5 post greffe de $5 \cdot 10^4$ B16F10 en sous cutané (SC) ou sur des souris porteuses de tumeurs de 50mm^3 . (B) Croissance tumorale individuelle et par groupe de traitement en mm^3 . (C) Volume tumoral en mm^3 à J21 post greffe et courbes de survie Kaplan-Meier. Courbes de survie de Kaplan Meier, test non paramétrique de Mann-Whitney pour la croissance tumorale et test Kruskal-Wallis pour le volume tumoral à J21.

Fort de ces observations, notre étude évalue les effets adjuvants de l'oxaliplatine combinée au traitement avec l'AcM TA99.

B. Résultats.

1. Les effets de l'oxaliplatine sur la lignée B16F10.

Afin de mesurer l'effet de l'oxaliplatine sur la croissance tumorale de la lignée B16F10 *in vivo* et de déterminer le moment de traitement optimal pour l'associer à l'AcM TA99, nous avons réalisé une expérience visant à administrer l'oxaliplatine 2 jours ou 5 jours après la greffe ou traiter tardivement sur des tumeurs de 50mm³ vers le 10^{ème} jour post-greffe (**Figure 29 A**). Nous avons observé que les trois temps de traitements ont un effet sur la croissance tumorale par rapport aux souris non traitées (**Figure 29 B**). Les résultats montrent un ralentissement de la croissance tumorale plus important chez les souris traitées à l'oxaliplatine à J2 plutôt qu'à J5 ou sur tumeur établie. A J21 post-greffe, on note une inhibition significative de la croissance tumorale dans le groupe de souris traitées deux jours post-greffe (en moyenne 70mm³) comparé aux souris non traitées (en moyenne 1350 mm³) (**Figure 29 C**). Les résultats montrent également un contrôle non significatif de la croissance tumorale dans les souris traitées avec l'oxaliplatine à jour 5 (280 mm³) ou tardivement (540 mm³). L'oxaliplatine augmente également transitoirement la survie des souris avec un avantage de 17 jours, pour le traitement effectué deux jours post-greffe, et 13 jours, pour les souris traitées à J5 ou tardivement, par rapport aux souris non traitées (**Figure 29 C**). Nous avons noté que les souris traitées à l'oxaliplatine présentent une perte de poids transitoire (données non présentées) soulignant une toxicité importante pouvant entraîner la mort (inférieur à 10% des souris). Cet effet toxique semble d'autant plus important que la chimiothérapie est administrée précocement. Sur la base de ces résultats nous avons décidé de traiter les souris à J5 afin d'utiliser l'effet suboptimal de l'oxaliplatine pour potentialiser l'immunothérapie par l'AcM TA99.

2. La combinaison induit un délai dans la croissance tumorale et la survie

Selon le protocole de traitement établi suite à l'expérience de mise au point (**Figure 30 A**), la combinaison de l'AcM TA99 avec l'oxaliplatine permet un ralentissement de la croissance tumorale par rapport à l'AcM TA99 seul ainsi qu'un délai transitoire dans la survie (**Figure 30 B**). Au jour 21 post-greffe, la combinaison contrôle significativement le volume tumoral par rapport au groupe IC + Oxa (**Figure 30 B**). En effet, le volume tumoral du groupe traité avec l'IC et l'oxaliplatine est en moyenne de 830 mm³ contre 50 mm³ pour le groupe traité par la combinaison. Les souris traitées avec l'immunothérapie TA99 seule et la combinaison AcM TA99/oxaliplatine présentent respectivement des tumeurs de 330 et 60 mm³ en moyenne. Cependant, bien que la combinaison de l'AcM TA99 et de l'oxaliplatine améliore transitoirement la survie des souris (non significatif), le pourcentage de souris protégées sur le long-terme n'est pas augmenté et plafonne à 50%.

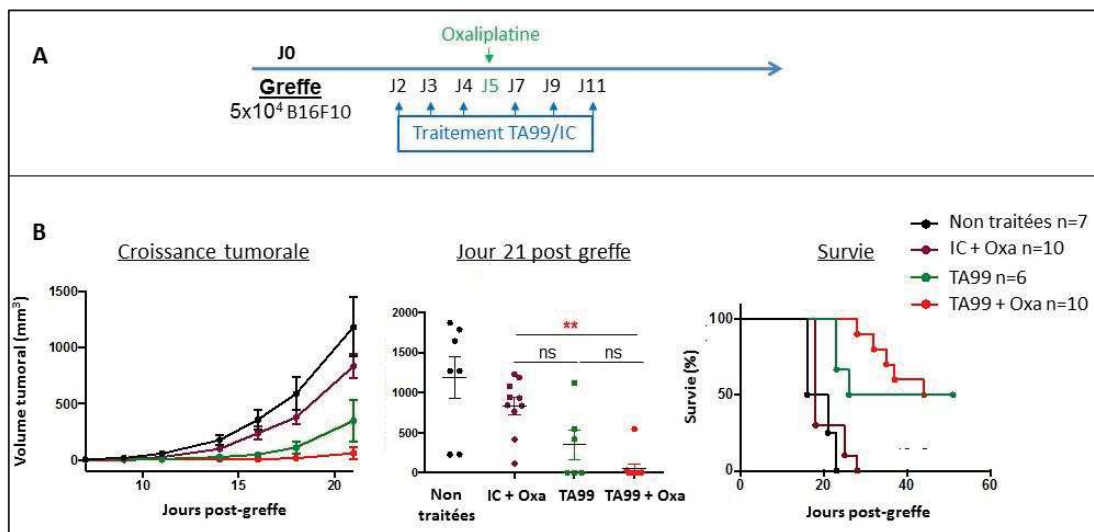


Figure 30 La combinaison avec l'oxaliplatine ralentit la croissance tumorale et améliore transitoirement la survie.

(A) Protocole de traitement. (B) Croissance tumorale, Volume tumoral (mm³) 21 jours après la greffe de $5 \cdot 10^4$ B16F10 et courbes de survie Kaplan-Meier des souris non traitées (NT), traitées avec le contrôle isotypique de l'AcM TA99 et l'oxaliplatine (IC + Oxa), traitées avec l'AcM TA99 seul (TA99) ou associé à l'oxaliplatine (TA99 + Oxa). Courbes de survie de Kaplan Meier, test non paramétrique de Mann-Whitney pour la croissance tumorale et test de Kruskal-Wallis pour le volume tumoral à J21.

3. La combinaison augmente la réponse humorale.

Le sang prélevé avant le challenge et après le challenge, au moment du sacrifice des souris (prélèvement sanguin mandibulaire), nous permet de comparer la réponse humorale des souris traitées avec l'oxaliplatine, l'AcM TA99 seul ou associé à la chimiothérapie. Marine Cahen, qui a réalisé son stage de Master 1 au sein de l'équipe et que j'ai pu encadrer durant deux mois lors de ma deuxième année de thèse, a réalisé des tests ELISA pour quantifier, dans les sérums de souris, la concentration (ng/mL) d'Ig dirigées contre les B16F10 suite aux différents traitements. Les résultats présentés dans la **Figure 31** montrent une augmentation d'Ig anti-B16F10 dans le sérum des souris traitées avec la combinaison par rapport aux souris traitées avec l'immunothérapie seule. Par ailleurs, cette réponse humorale est augmentée après un « challenge ». Augmenter l'ICD en associant l'oxaliplatine à l'immunothérapie par l'AcM TA99 favorise le développement d'une réponse humorale. Cette réponse humorale pourrait participer à prolonger les effets immunomodulateurs de l'AcM TA99 pouvant expliquer en partie l'augmentation transitoire de la survie chez les souris traitées avec la combinaison.

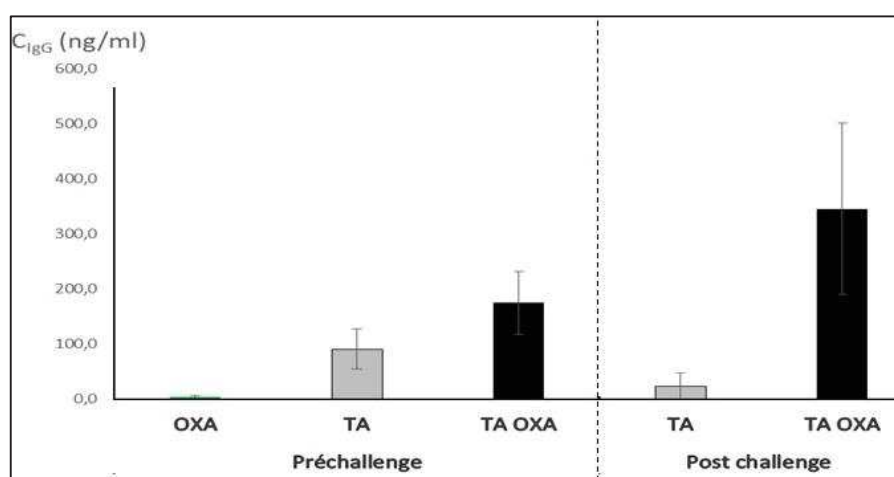


Figure 31 L'oxaliplatine associée à l'AcM TA99 potentialise la réponse humorale.

Les échantillons de sérums prélevés au moment du sacrifice des souris traitées à l'oxaliplatine (OXA), avec l'AcM TA99 seul (TA99) ou associé à l'oxaliplatine (TA OXA) avant (pré « challenge ») et après « challenge » (post « challenge »). La concentration (ng/mL) d'Ig dirigées contre la lignée B16F10 est quantifiée via un test ELISA.

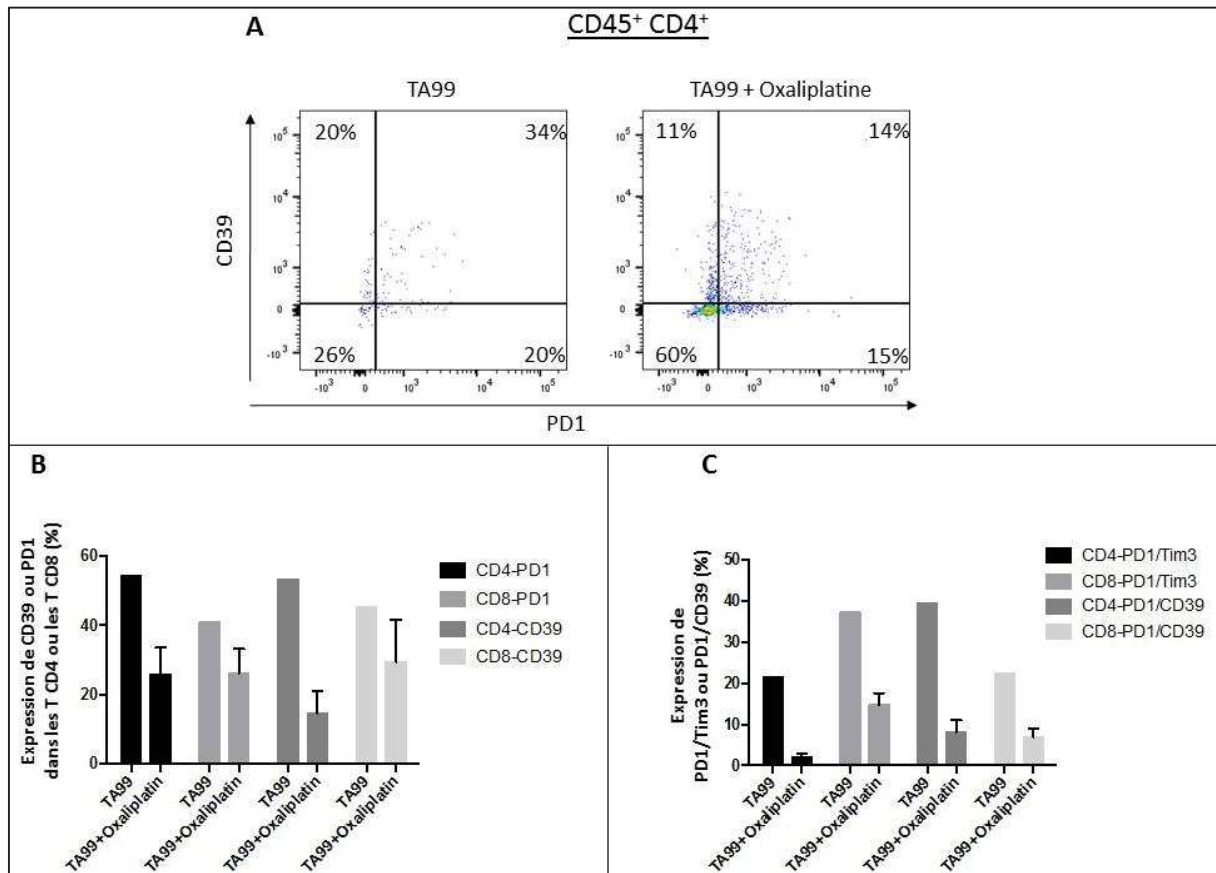


Figure 32 La combinaison de l'AcM TA99 et de l'oxaliplatine diminue le pourcentage de T CD4 et T CD8 exprimant CD39, PD-1 et Tim-3 dans la tumeur.

Les cellules immunitaires ont été isolées à partir de tumeurs de souris traitées avec le TA99 seul ou en association avec l'oxaliplatine. (A) Représentation DOT/PLOT de l'expression de CD39 et PD-1 dans la population CD45⁺ CD4⁺ de la tumeur chez des souris traitées au TA99 associé ou non à l'oxaliplatine. (B) Pourcentage d'expression de CD39 ou PD-1 dans l'infiltrat immunitaire T CD4⁺ et T CD8⁺ chez des souris traitées avec l'AcM TA99 associé ou non à l'oxaliplatine. (C) Pourcentage d'expression de PD-1/Tim-3 ou PD-1/CD39 dans l'infiltrat immunitaire T CD4⁺ et T CD8⁺ chez des souris traitées avec l'AcM TA99 associé ou non à l'oxaliplatine.

4. La combinaison diminue l'expression de PD-1, CD39 et Tim-3 dans l'infiltrat tumoral.

Afin de relier les effets cliniques observés à un phénotype particulier, nous avons caractérisé le profil des populations immunitaires à taille de tumeurs équivalentes (300mm³) selon les conditions de traitements. Les fréquences de LT CD4 et CD8 au sein de la tumeur ne sont pas modifiées par la combinaison (données non présentées). Cependant, les résultats montrent une diminution du pourcentage de cellules T CD4 et T CD8 exprimant PD-1 et CD39 dans les tumeurs de souris traitées avec la combinaison par rapport aux souris traitées avec l'AcM TA99 seul (**Figure 32** A et B). De plus, le pourcentage de CD4 et CD8 exprimant à la fois PD-1 et Tim-3 diminue avec l'oxaliplatine par rapport à l'immunothérapie seule (**Figure 32** A et C). Or la double expression PD-1/Tim-3 est associée à une fonctionnalité réduite de ces populations. Nous nous sommes donc intéressés par la suite à la fonctionnalité de l'infiltrat lymphocytaire.

5. La combinaison altère la fonctionnalité des LT CD4 et CD8 dans la tumeur.

Afin d'étudier la fonctionnalité des LT CD4 et LT CD8, nous avons mesuré la production d'IFN- γ après stimulation PMA-Ionomycine dans les tumeurs des souris traitées avec la combinaison. Le pourcentage d'IFN- γ produit par les lymphocytes T CD4 et T CD8 au sein de la tumeur est plus faible chez les souris traitées par la combinaison par rapport aux souris traitées en monothérapie avec l'AcM TA99 (**Figure 33** A). L'expression d'IFN- γ au sein du MET favorise l'expression de CMH-I (Bubeník 2004; Lin et al. 2017). Ainsi nous avons mis en évidence que l'AcM TA99 augmente l'expression de CMH-I au sein de la tumeur. Néanmoins, la combinaison semble diminuer cette expression (**Figure 33** B). Cette perte d'immunogénicité pourrait être responsable de l'absence d'effets sur le long-terme de l'oxaliplatine.

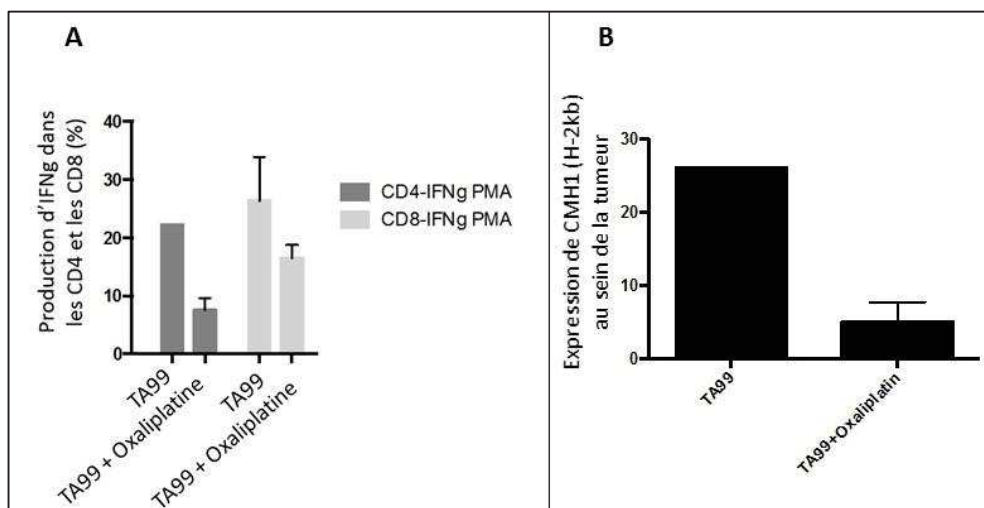


Figure 33 Diminution de l'immunogénicité et des fonctions effectrices des lymphocytes T CD4 et T CD8 dans les souris traitées avec la combinaison TA99 et oxaliplatine.

Lorsque les tumeurs des souris traitées par l'AcM TA99 seul ou en combinaison avec l'oxaliplatine ont atteint 300 à 400 mm³, l'expression de H-2kb (A) et la production d'IFN-γ dans les populations lymphocytaires T CD4 et T CD8 stimulées PMA-Ionomycine (PMA) a été analysée par cytométrie en flux.

C. Discussion et perspectives.

Notre étude concernant les effets potentialisateurs de l'oxaliplatine sur l'AcM TA99, dans des souris immunocompétentes greffées avec la lignée de mélanome B16F10, a permis de mettre en évidence un ralentissement de la croissance tumorale ainsi qu'une augmentation transitoire de la survie ne permettant pourtant pas d'améliorer le pourcentage de souris protégées sur le long-terme.

Nos résultats montrent une augmentation de la réponse humorale chez les souris traitées avec la combinaison par rapport à la monothérapie avec l'AcM TA99. La contribution de la réponse humorale dans les effets observés n'a pas été étudiée. La déplétion des LB 15 jours après la greffe de cellules B16F10 en SC (déplétion tardive), permettrait de caractériser la contribution de cette réponse humorale sur le ralentissement de la croissance tumorale et l'augmentation transitoire de la survie. Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier les effets d'une déplétion au

moment de la greffe (déplétion précoce) afin de mettre en évidence la contribution des LB en tant que CPA dans la réponse anti-tumorale. D'autre part l'analyse quantitative et qualitative de l'infiltrat immunitaire B intra-tumoral en fonction des traitements administrés pourrait apporter des informations intéressantes et complémentaires concernant les effets thérapeutiques. En effet, des études mettent en évidence une corrélation entre la densité d'infiltration des LB et l'activation des LT associé à une meilleure survie des patients. Par exemple, une étude menée sur une cohorte de patients de plus de 5 ans depuis la résection primaire du mélanome a révélé que l'infiltration initiale des lymphocytes B dans les tumeurs primitives des patients était corrélée à une survie sans maladie après un traitement anticancéreux (Erdag et al. 2012). Cependant leur rôle anti-tumoral est controversé et des études soulignent l'existence de sous-populations de lymphocytes B régulateurs (B_{reg}) favorisant l'expansion des Treg (Zhang et al. 2013; Tadmor et al. 2011). Les LB peuvent donc potentiellement contribuer à une grande variété de fonctions, y compris la présentation d'antigènes, pour favoriser l'auto-immunité ou le rejet de la tumeur soulignant l'intérêt de mieux caractériser son implication dans la réponse anti-tumorale.

De plus, nous mettons en évidence, contrairement à ce que nous pouvions attendre, une diminution de l'expression d'IFN- γ corrélé à une baisse d'immunogénicité tumorale. En effet, la diminution d'expression de CMH de classe I est une des stratégies d'échappement des cellules tumorales au SI (Seliger et al. 2001). Cette perte d'immunogénicité observée chez les souris traitées avec l'oxaliplatine pourrait expliquer l'effet limité de la combinaison sur la survie. Afin d'évaluer l'implication de la diminution d'expression du CMH-I, en collaboration avec le Dr. Bruno Segui qui travaille au sein de l'équipe de Nathalie Andrieu (Equipe 04 du CRCT, Métabolisme des sphingolipides, mort cellulaire et progression tumorale), nous avons obtenu la lignée de mélanome murin B16K1 surexprimant de façon stable le CMH de classe I H-2kb (Bertrand et al. 2015). In vivo, chez des souris immunocompétentes, les tumeurs issues d'une greffe de cellules B16K1 se développent plus lentement que les tumeurs B16F10 à quantité de cellules greffées égale, soulignant l'implication de l'immunogénicité tumorale dans

l'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale indépendamment de tout traitement. Nous avons confirmé des niveaux d'expression *in vitro* de TYRP-1, la cible de l'AcM TA99, similaires dans la lignée B16K1 et la lignée B16F10 (données non présentées). Utiliser la lignée B16K1 *in vivo* avec un protocole thérapeutique similaire aux expérimentations *in vivo* utilisant la lignée B16F10, permettrait de pallier les problèmes de faible immunogénicité des cellules B16F10 et de démontrer, ou non, l'implication de la diminution de CMH-I dans la faible réponse à la combinaison de l'AcM TA99 avec l'oxaliplatine dans ce modèle.

Cependant, l'analyse phénotypique de l'infiltrat immunitaire des tumeurs B16F10 montre une diminution de l'expression de CD39, CD73 et PD-1 dans les TILs. Comme nous l'avons vu, l'expression de ces marqueurs peut être en effet corrélée à une perte de fonctionnalité des TILs (cf p42). Dans ce contexte, une diminution de ces marqueurs pourrait révéler une meilleure fonctionnalité des LT présents dans la tumeur. Or nous avons mis en évidence une plus faible fonctionnalité des TILs mesurée par leur capacité à produire de l'IFN- γ en réponse à une stimulation PMA plus ionomycine. Nous faisons donc l'hypothèse que cette fonctionnalité altérée pourrait être attribuée à un effet toxique de l'oxaliplatine au moment de l'activation des cellules T. Il est donc nécessaire d'étudier la cinétique d'expression de PD-1 et la fonctionnalité des LT, en fonction de la dose et du moment d'injection de l'oxaliplatine, sur les LT chez ces souris, afin de confirmer, ou non, cette hypothèse.

Le traitement par l'oxaliplatine est associé à une perte de poids importante chez les animaux, conduisant au décès de moins de 10% des animaux. Plusieurs stratégies sont envisageables pour diminuer ces effets secondaires. Par exemple, favoriser une administration métronomique, c'est-à-dire, délivrer l'agent cytotoxique à faible dose sur une longue durée, permettrait de diminuer les effets secondaires tout en garantissant une efficacité thérapeutique de la drogue. En effet, une étude rétrospective sur 13 patients âgés (en moyenne 80 ans), atteints de mélanome avancé et traités quotidiennement pendant 3 à 4 semaines avec du cyclophosphamide, une chimiothérapie, qui, comme l'oxaliplatine, induit une ICD, a montré un contrôle de la maladie dans 46% des patients avec 1 réponse partielle et 5 stabilisations. Les

taux de réponses et la survie médiane de ces patients sont équivalents aux données recueillies avec la dacarbazine, la chimiothérapie de référence dans le mélanome métastatique (survie médiane de 6 à 9 mois) (Gogas, Kirkwood, et Sondak 2007). Cependant, l'avantage de cette administration métronomique orale est qu'elle ne présente pas de toxicité notable pour le patient. Actuellement de plus en plus d'études s'intéressent aux effets combinés de chimiothérapies utilisées comme adjuvants et administrées de manière métronomique. En ce sens, une étude rétrospective récente, sur des patients atteints de myélome, a évalué l'efficacité et la tolérabilité du cyclophosphamide, en association à la prednisone. Les résultats montrent un taux de réponse global (rémission complète, très bonne réponse partielle et réponse partielle) de 66,7% et une réponse dans un délai médian de 2 mois (Zhou et al. 2010). L'ensemble de ces données utilisant le cyclophosphamide, aux propriétés sur la mort immunogénique semblables à l'oxaliplatine, souligne l'intérêt potentiel de développer un protocole d'administration métronomique afin de mesurer les effets d'un tel protocole sur l'efficacité *in vivo* de la combinaison de l'oxaliplatine avec l'AcM TA99. En effet, nous avons observés une tendance à la diminution des T_{reg} avec la combinaison (données non présentées) mais aucune augmentation de l'infiltrat immunitaire. Une administration métronomique de l'oxaliplatine, de façon concomitante à l'immunothérapie par l'AcM TA99, permettrait peut-être de renforcer la diminution des T_{reg} et d'augmenter la quantité d'infiltrat immunitaire T CD4 et T CD8 comme cela est le cas pour le cyclophosphamide (Lutsiak et al. 2005; Ghiringhelli et al. 2007; Ercolini et al. 2005; Bracci et al. 2007; Griffith et al. 1989). Par ailleurs, mesurer les marqueurs caractéristiques de l'ICD, à savoir les niveaux de production d'ATP par spectrométrie de masse MALDI-TOF, l'expression membranaire de CRT par cytométrie en flux et la mesure de la production d'HMGB1, permettrait de suivre les effets de l'oxaliplatine tout en évaluant sa toxicité sur les animaux avec des mesures de formulation sanguine d'hématocrite et par pesée des animaux.

Une autre approche consistant à diminuer les effets non désirables systémiques (injection IP) de l'oxaliplatine serait de modifier le type d'administration. Dans la littérature, l'injection intra-

tumorale de paclitaxel, un antinéoplasique, démontre une efficacité dans des cancers bronchiques non à petites cellules non résécables de stade clinique III avec une toxicité acceptable (Lu et al. 2015). Il serait intéressant de mesurer l'efficacité, en monothérapie ou associée à l'AcM TA99, de l'oxaliplatine administrée en intra-tumoral ou péri-tumoral *versus* IP dans notre modèle d'étude.

Une autre stratégie consisterait à associer à l'AcM TA99 de façon précoce, une radiothérapie, afin d'exploiter son potentiel immunogénique (p60). De nombreuses études rapportent des effets abscopaux d'une combinaison radiothérapie et immunothérapies telles que le pembrolizumab (Tsui, Mihalciou, et Cury s. d.) ou l'ipilimumab (Chicas-Sett et al. 2018; Koller et al. 2016). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que l'utilisation de la radiothérapie dans le mélanome B16F10 augmente la génération d'Ags tumoraux (Lugade et al. 2005) et donc l'immunogénicité de la tumeur, ce qui semble faire défaut lors de la combinaison avec l'oxaliplatine. Ainsi, il nous paraît intéressant de tester un traitement par radiothérapie, administré de façon concomitante à l'AcM TA99 pour potentialiser les effets précoces de l'AcM TA99.

Une étude préclinique dans un modèle de mélanome B16-OVA démontre un effet vaccinal chez 100% des souris traitées, avec un agoniste des TLR1 et 2 (Diprovocim), suivie de 3 administrations d' α -PD-1 pour booster la réponse immunitaire. Le Diprovocim, utilisé ici en adjuvant, promeut la présentation antigénique et la réponse CTL. De la même façon que la chimiothérapie ou la radiothérapie, le Diprovocim pourrait permettre de potentialiser les effets de l'AcM TA99 en favorisant la mise en place d'une réponse sur le long-terme.

Les combinaisons thérapeutiques associant une chimiothérapie, une radiothérapie ou encore le Diprovocim, consistent à favoriser l'ICD et ainsi améliorer la présentation antigénique. Cependant, une autre stratégie de combinaison thérapeutique favorisant les effets précoces de l'AcM TA99 consisterait à lever des freins immunitaires mis en place lors de l'activation des LT, notamment à travers l'expression de CTLA-4 par les cellules présentatrices d'antigènes, pour favoriser la mise en place d'une réponse immunitaire efficace. Afin de renforcer le

rationnel d'utiliser un α -CTLA-4, il est nécessaire, comme nous l'avons fait pour la combinaison avec l' α -PD-1, de caractériser la cinétique d'expression de sa cible pour optimiser son administration en combinaison avec l'AcM TA99.

De manière générale, l'étude précise du phénotype des populations immunitaires et plus généralement d'autres populations cellulaires du MET, permettra de mettre en évidence de nouvelles cibles potentielles à associer à l'AcM TA99. L'étude de leur cinétique d'expression permettra de mieux rationaliser de futurs protocoles de thérapies combinées visant à la mise en place d'une réponse anti-tumorale protectrice sur le long-terme.

Conclusions et Perspectives.

Ce projet de thèse a permis de mettre en évidence pour la première fois, les effets immunomodulateurs de type vaccinal lors d'un traitement avec l'AcM α -TYRP-1 (TA99) dans un modèle de mélanome murin. De façon intéressante, trois types de réponses se distinguent chez les souris traitées par l'AcM TA99. Un premier groupe de souris (70% des souris traitées) échappent à l'immunothérapie de façon précoce. Un second groupe de souris répondent au traitement par l'AcM TA99 mais le contrôle de la tumeur primaire n'est pas associé à la mise en place d'une mémoire anti-tumorale suffisante pour être protectrice dans le contexte d'un challenge tumoral, et enfin, un groupe de souris répondent au traitement et mettent en place une réponse protectrice sur le long-terme. Ces différents profils peuvent se rapprocher des situations cliniques avec des répondeurs, des résistances innées et des résistances acquises à un traitement donné (cf p79). L'échappement aux thérapies des patients traités avec des AcM ciblant la tumeur reste à ce jour un problème majeur. De façon intéressante, notre modèle préclinique permet d'étudier ces mécanismes avec des échappements précoces et tardifs (challenge). Comprendre les raisons pour lesquelles ces tumeurs ne sont pas éliminées par le SI de l'hôte doit nous permettre de mettre en évidence de nouvelles voies impliquées dans cet échappement ouvrant ainsi des perspectives de nouvelles cibles thérapeutiques ou d'apporter le rationnel à des stratégies de thérapies combinées.

L'analyse de ces mécanismes d'échappement a permis de dessiner deux types de stratégies de combinaisons thérapeutiques pour potentialiser l'efficacité de l'AcM TA99. Une stratégie de combinaison concomitante au traitement par l'AcM TA99 afin d'améliorer l'immunogénicité, la présentation antigénique et l'activation des lymphocytes T. Une stratégie de combinaison séquentielle, afin de réactiver les effets immunomodulateurs de l'AcM TA99 en levant des freins immunitaires. Les combinaisons thérapeutiques avec l'oxaliplatine (administration concomitante) et l' α -PD-1 puis l' α -CD73 (administration séquentielle), ont permis d'améliorer la survie et de ralentir la croissance tumorale des souris traitées. Néanmoins, aucune des combinaisons ne permet d'augmenter le nombre de souris protégées soulignant la complexité de la réponse au traitement et les multiples paramètres à prendre en considération dans

l'élaboration de ce type de combinaisons. Ainsi, notre étude souligne la nécessité d'augmenter le nombre de cibles, en agissant sur des voies non redondantes impliquées dans l'oncogenèse et la réponse immunitaire, pour permettre de potentialiser les effets de l'AcM et d'initier une réponse anti-tumorale de type vaccinale. En ce sens, compléter les combinaisons thérapeutiques associant l'AcM anti-tumoral et des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires à des molécules qui éradiquent la cellule tumorale pour diminuer le volume tumoral et augmenter l'immunogénicité, pourrait permettre d'éliminer la tumeur et de protéger les souris sur le long-terme.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes principalement intéressés au compartiment immunitaire. Néanmoins, à la vue de la complexité de la réponse au traitement, de l'hétérogénéité du MET et de la dynamique des interactions entre les différents acteurs présents au sein de la tumeur, il apparaît nécessaire d'étudier les effets du traitement par l'AcM TA99 sur l'ensemble de ces acteurs. Une nouvelle plateforme de cytométrie de masse va prochainement se développer au sein de l'institut. La technologie CyTOF®, qui utilise des métaux rares conjugués à des Ac permettant d'analyser plus de 40 marqueurs à la fois, ouvrant ainsi la voie à des études hautement multiparamétriques, soit sur tumeurs dissociées avec le module Helios, soit sur coupe de tissus avec le module Hyperion. Identifier l'hétérogénéité cellulaire des tumeurs et mieux comprendre les interactions spatiales entre les différents acteurs du MET représente une étape importante pour l'identification de nouvelles cibles et de biomarqueurs pronostiques ou prédictifs de la réponse aux traitements. Ce type d'étude pourrait nous permettre aussi à travers l'analyse de la dynamique du MET, d'apporter le rationnel pour cibler de manière concomitante ou séquentielle les différents acteurs du MET et de mesurer les modifications apportées par une monothérapie ou des combinaisons thérapeutiques.

Parallèlement, la preuve de concept apportée par notre étude, concernant les effets de type vaccinal de l'AcM TA99, nécessite d'être élargie à d'autres modèles. En effet, étudier l'efficacité de l'AcM TA99 dans un autre modèle de cancer surexprimant TYRP-1, permettrait

d'évaluer l'influence d'un MET différent sur les effets immunomodulateurs de cet AcM. Un microenvironnement de nature différente pourrait influencer l'activité de l'AcM TA99 et mettre en évidence de nouvelles pistes concernant le rôle d'autres populations du MET. En clinique humaine, une étude récente s'intéresse aux effets thérapeutiques de l'association du pembrolizumab (α -PD-1) et du trastuzumab (α -HER2) chez les patientes atteintes d'un cancer du sein HER2-positif avancé résistant au trastuzumab. L'essai de phase Ib / II montre un taux de réponses objectives de 15% et un taux de contrôle de la maladie de 25% à 6 mois ou plus (S. Loi et al. 2017). Cependant, cet essai clinique ne caractérise pas les mécanismes impliqués dans les effets cliniques observés qui représentent pourtant un enjeu important pour améliorer l'efficacité de cette combinaison. Utiliser le modèle préclinique syngénique de cancer du sein (Cellules Tubo) avec l'AcM anti-tumoral α -HER2 utilisé par Park et al (S. Park et al. 2010) permettrait de caractériser les mécanismes mis en place dans les résistances observées et permettrait d'élaborer de nouveaux protocoles thérapeutiques pour potentialiser les effets de cette combinaison.

Le développement de combinaisons thérapeutiques soulève de nombreuses questions quant au rationnel des protocoles. Afin de mettre au point de ces protocoles efficaces, il est nécessaire de déterminer la cinétique et le lieu d'expression de chaque molécule ciblée par la combinaison. En effet, il est nécessaire de s'assurer dans un premier temps que la cible est bien exprimée au moment de l'administration de la thérapie mais au-delà, des études démontrent qu'une protéine peut avoir des fonctions différentes selon la population cellulaire qui l'exprime et/ou le stade de développement tumoral, impliquant des réponses au traitement variables. A titre d'exemple, des études mettent en évidence une expression précoce de PD-L1 sur les CPA et de PD-1 sur les LT, favorables et nécessaires à la phase d'expansion et de contraction de la réponse immunitaire alors qu'une expression plus tardive et maintenue de PD-1 sur les LT et de PD-L1 sur les cellules tumorales ou les CPA favorise l'épuisement des LT (Gibbons Johnson et Dong 2017). Ainsi, le blocage précoce de la voie PD-1/PD-L1 serait délétère pour l'activation des LT alors que le blocage de cette voie de façon tardive lèverait un

frein immunitaire et réactiverait la fonctionnalité des LT. Un autre exemple soulignant l'importance d'étudier le profil d'expression des cibles thérapeutiques et leurs effets sur les cellules qui l'expriment, concerne l'ectonucleotidase CD73. Une étude de biopsies de patients atteints de mélanomes métastatiques, met en évidence une expression de l'enzyme CD73 par l'endothélium, le stroma, la tumeur ou les cellules immunitaires (Monteiro et al. 2018). L'expression de CD73 dans les cellules tumorales est significativement corrélée à une diminution de la survie globale alors que l'expression de cette même enzyme dans les cellules mononuclées infiltrant la tumeur est significativement associée à une amélioration de la survie générale. Ces résultats soulignent la nécessité d'étudier l'implication des cibles selon leur lieu et leur cinétique d'expression pour élaborer les protocoles les plus adaptés. De plus, ces observations démontrent l'intérêt de caractériser l'expression de ces cibles avant et après des thérapies afin d'évaluer l'intérêt de les combiner à d'autres traitements pour améliorer les effets anti-tumoraux sur le long-terme.

Cependant, les combinaisons thérapeutiques soulèvent des questions liées à la toxicité des drogues utilisées et aux effets secondaires associés, comme cela a été le cas dans notre étude lors de la combinaison de l'AcM TA99 avec l'oxaliplatine. En effet, bien qu'efficaces, certaines thérapies induisent des effets secondaires sévères nécessitant l'arrêt du traitement chez certains patients (hypertension artérielle, troubles cutanés, troubles digestifs, leucopénie, neutropénie, lymphopénie, anémie, thrombopénie, fatigue, lésions buccales...). Dans ce contexte, de nombreuses études précliniques et cliniques s'intéressent à comparer l'efficacité des traitements selon différents protocoles de doses (thérapies métronomiques ou hypo/hyper fractionnées...) ou bien selon des sites d'administration différents (intra lésionnel, IV, IP...). Ce type de préoccupations doit être pris en compte pour les expérimentations à venir afin d'optimiser les associations thérapeutiques.

Pour conclure, notre étude a démontré que lever un frein immunitaire (α -PD-1) permet de réactiver les effets immunomodulateurs d'un AcM ciblant la cellule tumorale (AcM T99).

L'ensemble de nos résultats soulignent l'importance de développer des modèles précliniques afin de caractériser le MET et définir la cinétique d'expression des cibles utilisées et l'administration la plus adaptée pour développer des protocoles de thérapies combinées efficaces sur le long-terme. Nos résultats soulignent également la nécessité de multiplier les cibles impliquées dans des voies non redondantes de l'oncogenèse ou de la réponse immunitaire pour assurer une réponse anti-tumorale efficace sur le long-terme. L'étude de phase I de Khalil et al (Khalil et al. 2016) renforce la preuve de concept de notre étude et souligne l'intérêt de mesurer l'efficacité de la combinaison de l'IMC-20D7S (α -TYRP-1) avec un anti PD-1 (pembrolizumab) en essai clinique chez des patients atteints de mélanome.

Matériel et méthodes.

Tableau des combinaisons d'anticorps associés aux trois stratégies d'analyse de cellules murines présentées ci-après

**Analyse des
T CD4, T CD8 et T_{reg}**

Anticorps	Fluorochrome
PD-1	FITC
CD45	PerCP Vio700
Tim-3	PE
CD25	PE-Cy5
CD8	PE CY5.5
CD39	PE-Cy7
FoxP3	APC
IL-2	APC-Cy7
IFN- γ	BV421
L/D	AmCyan
CD73	BV605
CD4	BV650
CD3	BV711
CD107a	BV786

**Analyse des
LB, NK, T $\gamma\delta$**

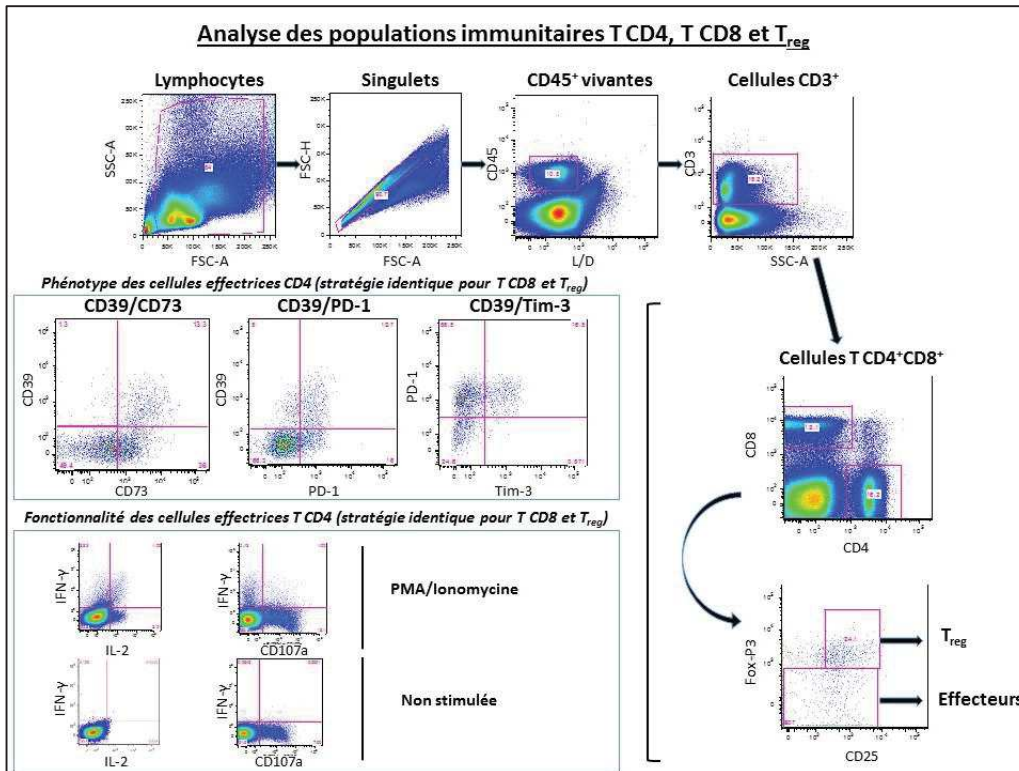
Anticorps	Fluorochrome
CD73	A488
CD45	PercPVio700
CD3	PE
CD39	PE-Cy7
IFN- γ	APC
CD19	AF700
IL-2	APC-Cy7
NKP46	BV421
L/D	AmCyan
TCR $\gamma\delta$	BV605
CD4	BV650
CD107a	BV786
PD1	BV711

**Analyse des
myéloïdes**

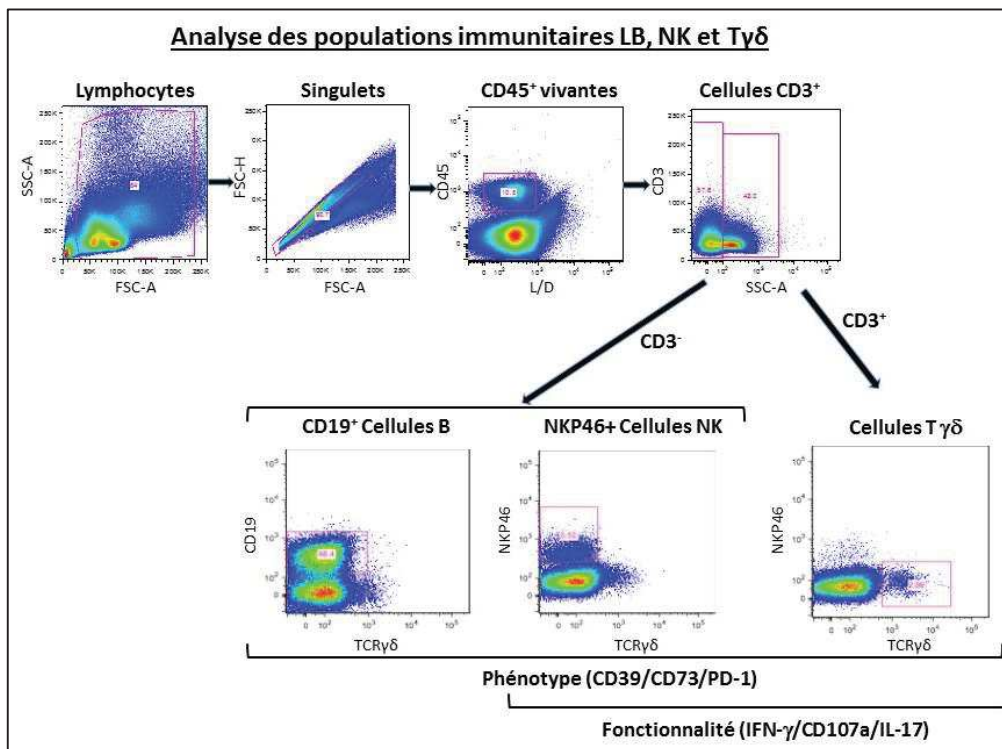
Anticorps	Fluorochrome
MHC-II	FITC
CD80	PerCP-Cy5.5
CD11c	PE
CD3	PE-Cy5
CD39	PE-Cy7
CD11b	APC
Gr1	AF700
F4/80	APCeF780
IL-12/23	V450
L/D	AmCyan
CD73	BV605
CD86	BV650
CD45	BV786

Les analyses sont effectuées suivant ces trois panels sur les cellules isolées de la rate et de la tumeur.

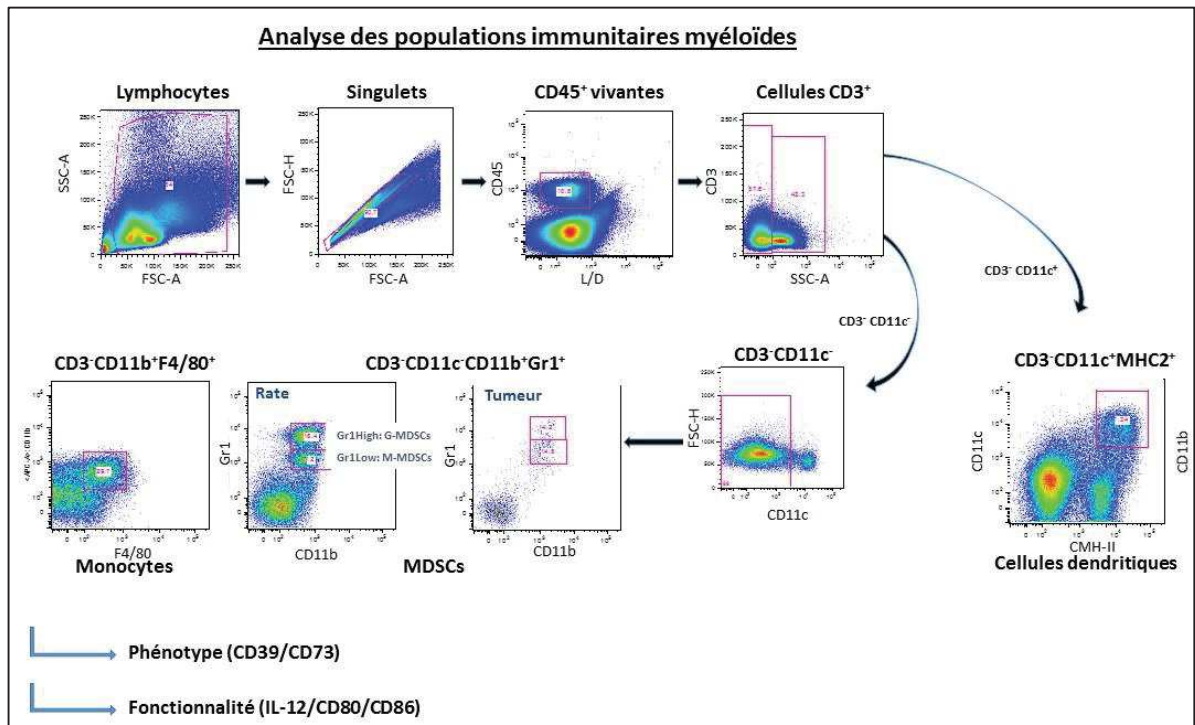
Stratégie d'analyse des populations immunitaires



Chacune de populations sélectionnées (T CD4, T CD8, T_{reg}) est analysée sur des critères phénotypiques (CD39, CD73, PD-1, Tim-3) et fonctionnels (IFN- γ , IL-2, CD107a).



Chacune de populations sélectionnées (LB, NK, T γ δ) est analysée sur des critères phénotypiques (CD39, CD73, PD-1) et fonctionnels (IFN- γ , CD107a).



Chacune de populations sélectionnées (DC, monocytes, MDSCs) est analysée sur des critères phénotypiques (CD39, CD73) et fonctionnels (IL-12, CD80, CD86).

Tableau des combinaisons d'anticorps associés aux stratégies d'analyse de cellules Humaines présentées ci-après.

Analyse T

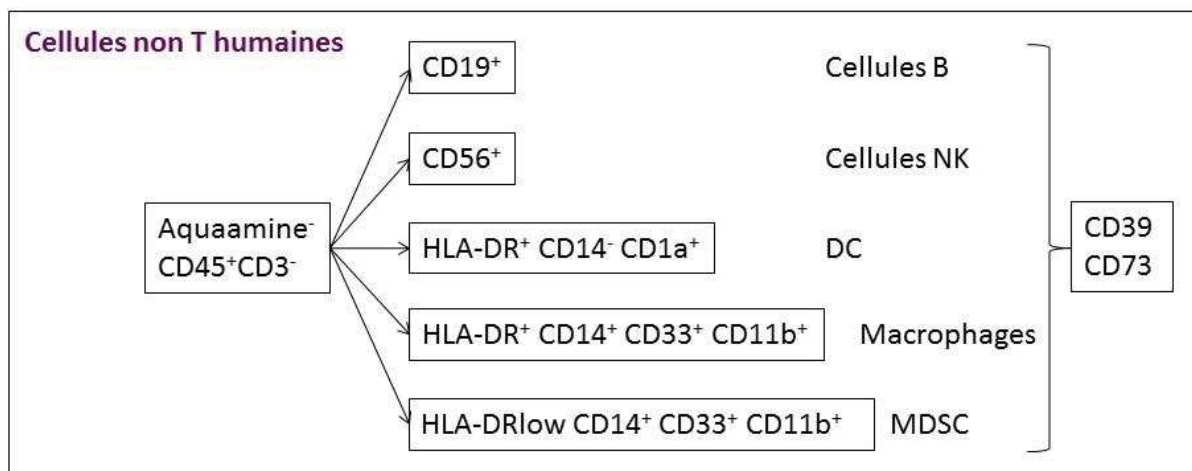
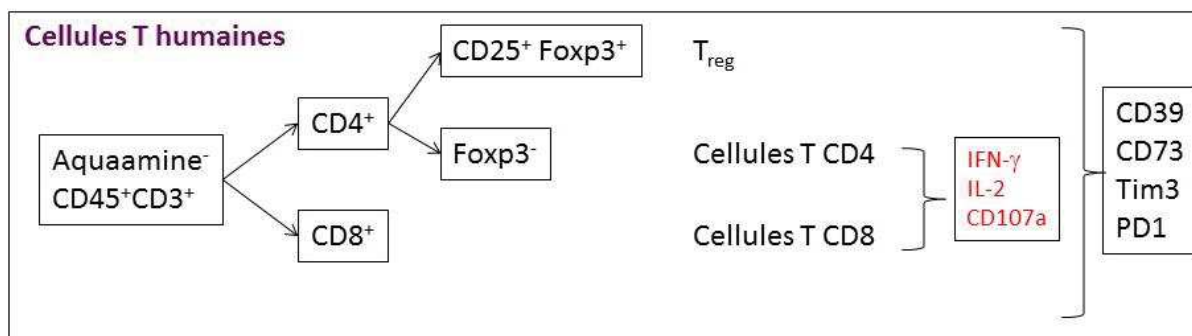
Anticorps	Fluorochrome
FoxP3	AF488
CD39	PerC-Cy5.5
IL-2	PE
CD45	PE-Cy5.5
IFN-γ	PE-Cy7
CD25	A700
CD107a	APC-H7
CD73	BV421
L/D	AmCyan
CD8	BV605
CD4	BV650
Tim-3	BV711
PD-1	BV786

Analyse des LB et myéloïdes

Anticorps	Fluorochrome
CD19	FITC
CD14	PerCP-CY5.5
CD56	PE
CD39	PE-Cy7
CD11b	APC
CD33	AF700
CD45	APC-Cy7
CD73	BV421
L/D	AmCyAN
HLA-DR	BV605
CD3	BV650
PD-1	BV711
CD1a	PE-Cy5

Les analyses sont effectuées suivant ces deux panels sur les cellules isolées du sang et de biopsies tumorales des patients.

Stratégie d'analyse des populations immunitaires Humaines.



Chacune de populations sélectionnées (T CD4, T CD8, LB, NK, DC, macrophages, MDSCs) est analysée sur des critères phénotypiques (CD39, CD73, PD-1, Tim-3) et fonctionnels (IL-2, IFN- γ , CD107a).

Productions scientifiques parallèles à la réalisation du doctorat.

L'IL-21 favorise le développement d'une population régulatrice de cellules T V γ 9V δ 2 positive pour CD73.

Au sein de l'équipe, le Docteur Lafont Virginie s'intéresse à une population de lymphocytes T non conventionnels : les lymphocytes T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$). Chez l'homme, les LT $\gamma\delta$ présents dans le sang expriment un TCR invariant composé des chaînes V γ 9 et V δ 2. Cette sous-population V γ 9V δ 2 participe à la réponse anti-tumorale en éliminant directement les cellules tumorales via une activité cytotoxique et en favorisant le recrutement et la stimulation d'autres effecteurs immunitaires via la production de cytokines (TNF- α , IFN- γ). Cependant, la présence des LT $\gamma\delta$ dans le microenvironnement tumoral a également été associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein, du colon et les cancers pancréatiques.

Par ailleurs, des études récentes ont montré que les LT $\gamma\delta$ possèdent une grande plasticité dépendante des signaux qu'ils reçoivent de leur environnement, en particulier de la présence de cytokines. De façon similaire à ce qui est connu pour les lymphocytes T CD4, il a récemment été démontré que les LT $\gamma\delta$ pouvaient développer des fonctions effectrices de type Th1, Th2, Th17, Tfh ou bien des fonctions régulatrices, ce qui suggère qu'ils peuvent influencer la réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale (Caccamo, 2012).

Au vu des propriétés plastiques des LT $\gamma\delta$, nous émettons l'hypothèse que la présence de cytokines impliquées dans les processus inflammatoires pourrait dans certains cas induire la différenciation des LT $\gamma\delta$ en cellules de type régulatrices/immunosuppressives et favoriser ainsi la progression tumorale. Parmi les cytokines retrouvées dans le MET, nous nous sommes intéressés à l'IL-21 car son implication a clairement été démontrée dans le cancer du côlon [21] mais également dans l'environnement de diverses tumeurs solides (cancer du sein, de l'ovaire) [22].

Les résultats de l'équipe indiquent que l'IL-21 peut impacter la différenciation des LT $\gamma\delta$ et modifier leurs propriétés fonctionnelles. Nous avons isolé et identifié, à partir de LT $\gamma\delta$ du sang de donneurs sains amplifiés en présence d'IL-21, une sous-population qui présente des fonctions régulatrices. Cette sous-population exprime l'ectonucléotidase CD73, et produit également de l'IL-10, deux molécules aux propriétés immunosuppressives. Cette population de LT $\gamma\delta$ est dotée de propriétés suppressives qui se traduisent par une inhibition de la

prolifération des lymphocytes $T\alpha\beta$ ainsi qu'une inhibition de la maturation des cellules dendritiques et de leur capacité à activer les lymphocytes T naïfs (Barjon, 2017).

Afin de valider ces observations dans un modèle *in vivo*, j'ai participé à une étude utilisant un modèle murin immunocompétent de souris C57BL/6N greffées avec la lignée tumorale TC1 (modèle de cancer du col exprimant de manière constitutive les protéines E6 et E7 de HPV). Les résultats montrent une augmentation des $LT\gamma\delta$ $CD73^+$ dans la rate des souris greffées et la présence de $LT\gamma\delta$ $CD73^+$ produisant de l'IL-10 au sein de la tumeur. L'ensemble de nos résultats suggèrent fortement l'existence de sous-populations de $LT\gamma\delta$ dotées de fonctions immunosuppressives (pro-tumorales).

A ce stade, une meilleure caractérisation de cette sous-population de $LT\gamma\delta$ suppressive est essentielle afin de déterminer leur contribution réelle dans le contrôle de la réponse anti-tumorale.

Dans cet objectif, il apparaît nécessaire de (1) identifier la signature phénotypique des $LT\gamma\delta$ régulateurs et leur(s) mécanisme(s) d'action, (2) identifier la signature transcriptomique des $LT\gamma\delta$ régulateurs et mettre en évidence, par des analyses computationnelles de transcriptome et de données scRNAseq provenant de biopsies tumorales, leur présence dans une large cohorte de patients cancéreux, (3) identifier, par imagerie par cytométrie de masse, au sein de biopsies tumorales (côlon et/ou pancréas) les principaux partenaires cellulaires des $LT\gamma\delta$ régulateurs et corrélérer leur présence dans un réseau cellulaire donné au stade tumoral.

En combinant des approches expérimentales et computationnelles innovantes et complémentaires, ces différentes études devraient apporter un nouvel éclairage sur l'existence, la génération et le rôle physiopathologique de sous-populations de $LT\gamma\delta$ régulatrices au sein du MET.

IL-21 promotes the development of a CD73-positive V γ 9V δ 2 T cell regulatory population

Clément Barjon¹, Henri-Alexandre Michaud^{1#}, Angeline Fages^{1#}, Cécile Dejou², Alexandre Zampieri¹, Laetitia They¹, Aurélie Gennetier¹, Françoise Sanchez¹, Laurent Gros¹, Jean-François Eliaou^{1,2}, Nathalie Bonnefoy^{1*} and Virginie Lafont^{1*§}

¹Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM); INSERM, U1194; Université Montpellier; Institut Régional du Cancer de Montpellier (ICM), Montpellier, F-34298, France

²OREGA Biotech, F-69130 Ecully, France

³Département d'Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier et Faculté de Médecine, Université de Montpellier, Hôpital Saint-Eloi, 34295 Montpellier cedex 5, France

co-second authors

* Co-last authors

§ Corresponding author: IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier; INSERM, U1194; Université Montpellier; Institut Régional du Cancer de Montpellier, F-34298 Montpellier, F-34298, France, virginie.lafont@inserm.fr

Abstract

V γ 9V δ 2 T cells contribute to the immune response against many tumor types through their direct cytotoxic activity and capacity to regulate the biological functions of other immune cells, such as dendritic cells and IFN- γ -producing CD8⁺ T cells. However, their presence in the tumor microenvironment has also been associated with poor prognosis in breast, colon and pancreatic cancers. Additionally, recent studies demonstrated that cytokines can confer some plasticity to V γ 9V δ 2 T cells and promote their differentiation into cells with regulatory functions. Here, we demonstrated that activation of V γ 9V δ 2 T cells isolated from healthy donors and cultured in the presence of IL-21 favors the emergence of a subpopulation of V γ 9V δ 2 T cells that express the ectonucleotidase CD73 and inhibits T cell proliferation in a CD73/adenosine-dependent manner. This subpopulation produces IL-10 and IL-8 and displays lower effector functions and cytotoxic activity than CD73-negative V γ 9V δ 2 T cells. We also showed, in a syngeneic mouse tumor model, the existence of a tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cell subpopulation that produces IL-10 and strongly expresses CD73. Moreover, maturation, IL-12 production and induction of antigen-specific T cell proliferation are impaired in DC co-cultured with IL-21-amplified V γ 9V δ 2 T cells. Altogether, these data indicate that IL-21 promotes V γ 9V δ 2 T cell regulatory functions by favoring the development of an immunosuppressive CD73⁺ subpopulation. Thus, when present in the tumor microenvironment, IL-21 might negatively impact $\gamma\delta$ T cell anti-tumor functions.

Keywords: $\gamma\delta$ T cells, regulatory functions, IL-21, tumor microenvironment, CD73, adenosine, IL-10

Grant support and acknowledgements: This work was supported by the Institute National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); Université Montpellier; the Institut Régional du Cancer de Montpellier (ICM), the Institut National du Cancer (INCa, # R14146NN) and the Ligue contre le Cancer. We acknowledge all the members of NB's team for their stimulating comments.

Introduction

$\gamma\delta$ T cells belong to the non-conventional or innate lymphocyte family. In human adults, most peripheral blood $\gamma\delta$ T cells express a specific T cell receptor (TCR) composed of $V\gamma9$ and $V\delta2$ chains. $V\gamma9V\delta2$ T cells share functional characteristics with conventional effector $\alpha\beta$ T cells. For instance, they display cytotoxic activity against infected or transformed cells and produce pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-17 (IL-17) and interferon- γ (IFN- γ)¹⁻³. However, they also display specific properties, such as the TCR-dependent recognition of non-peptidic phosphorylated antigens, called phosphoantigens. Natural phosphoantigens, such as (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate (HMBPP), are produced by many bacteria through the prokaryotic isoprenoid pathway (also called non-mevalonate isoprenoid pathway, or Rohmer pathway) and are extremely potent activators of human $V\gamma9V\delta2$ T cells^{4, 5}. Phosphoantigens can be produced also by eukaryotic cells (for instance, isopentenyl pyrophosphate⁶) via the mevalonate isoprenoid pathway that plays a key role in multiple cellular processes, such as membrane maintenance and hormone synthesis. Because of their increased metabolism and

extensive use of this pathway, tumor cells stimulate the overproduction that are sensed by V γ 9V δ 2 T cells as tumor-related antigens ⁶. Therefore, through their unique capacity to recognize phosphoantigens, V γ 9V δ 2 T cells play an essential role in anti-infection immunity and in tumor immune surveillance ^{7,8}.

Thanks to the availability of synthetic clinical-grade phosphoantigens or pharmacological inhibitors of the mevalonate pathway that can trigger V γ 9V δ 2 T cell proliferation and anti-tumor response, these cells have become an attractive therapeutic tool for anti-tumor therapies. Many clinical trials have been carried out based on the adoptive transfer of *ex vivo* stimulated V γ 9V δ 2 T cells or on their *in vivo* stimulation using clinical-grade agonists ^{9,10}. Clinical trials in small cohorts based on the *in vivo* stimulation and amplification of V γ 9V δ 2 T cells showed objective responses in 10 to 33% of patients with hematologic and solid malignancies ¹¹. In some cases, the lack of response to therapy could be attributed to deficient expansion of effector V γ 9V δ 2 T cells ¹²⁻¹⁴. However, many patients who did not respond to the treatment exhibited significant and sustained V γ 9V δ 2 T cell activation and proliferation. These results suggest that the current V γ 9V δ 2 T cell-based treatments are feasible and safe, but require a better understanding of the regulation of V γ 9V δ 2 T cell effector functions to improve their efficacy ¹¹.

Interestingly, recent *in vitro* and *in vivo* data highlighted some degree of plasticity of V γ 9V δ 2 T cells driven by environmental signals that can modify their anti-tumor function and limit their efficacy ¹². Specifically, it has been observed that $\gamma\delta$ T cells with pro-tumor effects produce IL-17 in mouse models of breast, hepatocellular and ovarian cancers ¹⁵⁻¹⁷, and also in human colorectal cancer ¹⁸. Moreover, $\gamma\delta$ T cells immunosuppressive functions have been associated with DC senescence induction in human breast cancer ¹⁹. More recently, Daley et al. showed that in murine and human pancreatic ductal adenocarcinoma, $\gamma\delta$ T cells directly

inhibit $\alpha\beta$ T-cell activation and infiltration via PD-L1 checkpoint ligation, thereby allowing tumor progression ²⁰. They also found that depletion or inhibition of $\gamma\delta$ T cells is markedly protective in this cancer type ²⁰. Overall, these data support the idea that $\gamma\delta$ T cells can be immunosuppressive in selected solid tumor types.

Therefore, much research efforts are currently focused on understanding the molecular mechanisms that govern the functional plasticity of V γ 9V δ 2 T cells as well as the role of cancer cells and cells from the tumor microenvironment in their recruitment, polarization and regulation. Because of their high plasticity, the tumor microenvironment could tilt effector V γ 9V δ 2 T cells towards a regulatory phenotype, or favor the recruitment and development of regulatory subsets.

IL-21 ^{21, 22, 23} is predominantly secreted by natural killer T (NKT) cells, T follicular helper (Tfh) cells and Th17 cells, and plays a role in the differentiation and proliferation of B cells and of CD4+ and CD8+ T lymphocytes ²¹⁻²³. Moreover, IL-21 exerts anti-tumor effects by inducing and expanding the pool of cytotoxic CD8+ T, NK and NKT cells, while suppressing FoxP3 expression and the expansion of regulatory T cells ²⁴⁻²⁷. In line with these observations, IL-21 has been associated with clinical antineoplastic activity ²¹. However, IL-21 is also involved in the generation of regulatory B cells that are found, together with IL-21-producing T cells, in the tumor microenvironment of several solid tumors ²⁸. Finally, IL-21 has been associated with opposing effects in hematological malignancies because it supports tumor cell proliferation in multiple myeloma, Hodgkin's lymphoma and Burkitt's lymphoma, but induces growth arrest or apoptosis of malignant lymphoid cells in non-Hodgkin B-cell lymphoma ²⁹.

IL-21 can promote various functional V γ 9V δ 2 T cell phenotypes. It has been reported that IL-21 potentiates the cytolytic activity and pro-inflammatory responses of long-term

cultured V γ 9V δ 2 T cells³⁰. It also favors the differentiation of a V γ 9V δ 2 T cell sub-population into B-helper T cells^{31, 32}. Moreover, the expression of inhibitory NK receptors (NKG2A, ILT2 and CD244) is increased and that of costimulatory NK receptors (NKG2D) is reduced in IL-21-amplified V γ 9V δ 2 T cells. However, the functional significance of these phenotypic alterations is still unclear³⁰.

As it was suggested that IL-21 could be a good candidate to improve V γ 9V δ 2 T cell-based treatments, a better knowledge of its effects on V γ 9V δ 2 T cells is required. In this study, we investigated the long-term effects of IL-21 on V γ 9V δ 2 T cells. We demonstrated that activation of V γ 9V δ 2 T cells isolated from healthy donors and cultured in the presence of IL-21 amplified a subpopulation of V γ 9V δ 2 T cells that expresses the CD73 ectonucleotidase and generates adenosine. This subpopulation also produces IL-10 and IL-8 and displays lower effector functions and cytotoxic activity than CD73-negative V γ 9V δ 2 T cells. Furthermore, we showed that DC maturation and functions are impaired when they are co-cultured with IL-21-amplified V γ 9V δ 2 T cells. Finally, in the presence of AMP, supernatants from IL-21-amplified V γ 9V δ 2 T cells impaired conventional T cell proliferation in a CD73/adenosine-dependent manner. Altogether, these data indicate that IL-21 promotes V γ 9V δ 2 T cell regulatory functions by favoring the development of an immunosuppressive CD73-positive subpopulation. Thus, IL-21, which can be present in the microenvironment of some tumors, might negatively influence the anti-tumor immune response by promoting regulatory V γ 9V δ 2 T cells.

Results

Functional expression of the IL-21 receptor in V γ 9V δ 2 T cells

Several studies reported^{30, 33} that IL-21 receptors (IL-21R) are weakly expressed in non-activated V γ 9V δ 2 T cells, and are transiently up-regulated following TCR activation, but nothing is known about IL-21R expression after TCR-activation and long-term culture in the presence of IL-21. Here, we confirmed that IL-21R was weakly expressed in V γ 9V δ 2 T cells freshly isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (Figure 1A, left panel). Moreover, its expression level did not change after TCR activation by HMBPP followed by 15 days of culture in the presence or not (control) of IL-21 (Figure 1A, right panel).

Through its receptor, IL-21 can activate the JAK-STAT pathway, and specifically STAT3 in T cells²³. We thus studied IL-21R functionality in V γ 9V δ 2 T cells by analyzing STAT3 phosphorylation. To this aim, after 15 days of culture, we added recombinant human IL-21 in V γ 9V δ 2 T cells starved of cytokines for the last 24h (Fig 1B). We observed STAT3 phosphorylation at 10 and 20min after IL-21 addition in both IL-21-cultured and control V γ 9V δ 2 T cells (Fig 1B). These results indicate that long-term culture in the presence of IL-21 did not affect IL-21R expression and functionality in V γ 9V δ 2 T cells.

As previously described³⁰, long-term culture with IL-21 alone did not induce sustained proliferation of V γ 9V δ 2 T cells and did not modify the expansion of V γ 9V δ 2 T cells induced by IL-2 present in the culture medium (data not shown). Moreover, IL-21 did not modify V γ 9V δ 2 T cell differentiation as indicated by the finding that at day 15 of culture most cells (control and IL-21-cultured) displayed an effector memory phenotype (CD27⁻/CD45RA⁻) (supplementary Fig S1).

IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells express CD73

Extracellular ATP and adenosine act as positive and negative regulators, respectively, of the immune response. It has been recently reported that ectonucleoside triphosphate diphosphorylase 1 (ENTPD1 or CD39), which catalyzes the phosphohydrolysis of extracellular ATP into ADP and of ADP into AMP, is expressed by V γ 9V δ 2 T cells only after TCR activation. Conversely, the ecto-5'-nucleotidase CD73, which completes AMP dephosphorylation into adenosine, is expressed by circulating naive V γ 9V δ 2 T cells, but silenced upon cell activation³⁴.

In agreement, we found that after TCR activation, most V γ 9V δ 2 T cells expressed CD39 and its expression was not affected by IL-21 (Fig 2A). Conversely, less than 3% of V γ 9V δ 2 T cells (control) expressed CD73, but this fraction increased up to 20% among IL-21-cultured cells (Fig 2B). RT-qPCR analysis showed similar CD39 mRNA levels in control and IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells, while CD73 mRNA was detectable only in IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells (supplementary Fig S2). Moreover, the co-expression of CD39 and CD73 by a significant percentage of IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells compared with control (Fig 2C) suggests that they might mediate the entire phosphohydrolysis process from ATP to adenosine. To address this hypothesis, we quantified AMP and adenosine levels by MALDI-TOF mass spectrometry. Control and IL-21-amplified V γ 9V δ 2 T cells produced the same amount of AMP in the presence of ATP (data not shown), whereas only IL-21-amplified cells generated adenosine in the presence of AMP (Fig 2D). These results demonstrate that, when cultured in the presence of IL-21, V γ 9V δ 2 T cells express CD73 and suggest that they could act as immunosuppressive cells.

To determine whether IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells could inhibit T cell proliferation through a CD73/adenosine-dependent pathway, we collected supernatants from IL-21-amplified V γ 9V δ 2 T cells after incubation (or not) with AMP for 30min to allow the

generation of adenosine. Then, we evaluated proliferation of CFSE-labeled T cells grown in the presence of immobilized anti-CD3 monoclonal antibodies and V γ 9V δ 2 T cell supernatants. T cell proliferation was reduced by \approx 50% when CD3-activated T cells were cultured with supernatants collected after incubation with AMP (AMP) compared with control (supernatant without AMP) (Fig 2E). Pre-treating IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells with the CD73 inhibitor APCP (AMP+ APCP) efficiently reversed this effect (Fig 2E). Conversely, we observed no difference in proliferation when T cells were cultured with supernatants from control V γ 9V δ 2 T cells with/without AMP and APCP (data not shown). Overall, these results demonstrate that IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells display regulatory functions that affect the proliferative capacity of other immune cells, such as T cells, through the CD73/adenosine pathway.

IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells produce IL-10 and IL-8

Analysis of cytokine production by V γ 9V δ 2 T cells showed that the percentage of IFN- γ ⁺ and TNF- α ⁺ cells and the release of these two cytokines were comparable in control and IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells (supplementary Fig S3).

We then asked whether IL-21-amplified V γ 9V δ 2 T cells could also produce regulatory cytokines, such as IL-10 and TGF- β . In the absence of activation by HMBPP, we detected both IL-10 mRNA expression (data not shown) and IL-10 protein (Fig 3A) in IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells, but not in control cells. Moreover, in IL-21-amplified V γ 9V δ 2 T cells, IL-10 basal production was further increased upon incubation with HMBPP (Fig 3A). In contrast, we did not detect TGF- β in any of the tested conditions (data not shown).

In cancer, IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells also produce IL-8 and have been described as immunosuppressive cells ¹⁸. We thus analyzed IL-17A and IL-8 expression in long-term

cultured V γ 9V δ 2 T cells. We did not detect IL-17A mRNA or protein expression in both control and IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells (data not shown). Conversely, we found a significantly higher expression of IL-8 mRNA (data not shown) and protein (Fig 3B) in IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells compared with control cells. As observed for IL-10, IL-8 basal production by IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells was further increased following specific activation by HMBPP. Incubation with HMBPP also induced IL-8 production by control V γ 9V δ 2 T cells, although to a lower extent than in activated IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells (Fig 3B). These results suggest that through the secretion of IL-10 and IL-8, IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells could contribute to create a tumor microenvironment that favors tumor development and growth.

IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells impair DC maturation and functions

Several reports indicate that V γ 9V δ 2 T cells modulate DC activity by favoring DC maturation and IL-12 production ³⁵ and also restore DC functions that have been impaired during pathogen infection ³⁶. To compare the effect of control and IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells on DC maturation and activity, we co-cultured monocyte-derived DC with HMBPP-activated V γ 9V δ 2 T cells. Analysis of DC maturation by quantification of CD83 (Fig 4A) and CD86 expression (Fig 4B) after 48h of co-culture showed that co-culture with control V γ 9V δ 2 T cells increased both the expression (MFI) of CD83 and CD86 and the percentage of - positive DC compared with DC cultured alone. Conversely, co-culture with activated IL-21-amplified V γ 9V δ 2 T cells did not upregulate the expression of these two maturation markers (Fig 4A and 4B).

To investigate whether this effect correlated with a modification of DC functional properties, we assessed DC antigen-uptake activity (by analyzing the endocytosis of FITC-

conjugated dextran) and IL-12 production. As control, we first showed that immature DC (high MFI peak), but not LPS-treated mature DC (low MFI peak, Fig 4C, left panel) could endocytose dextran. When co-cultured with activated control V γ 9V δ 2 T cells, about 70% of DC lost this capacity, suggesting their maturation (Fig 4C, middle panel). In contrast, when co-cultured with IL-21-amplified V γ 9V δ 2 T cells, most DC could still uptake dextran (about 60% high dextran peak). Furthermore, only 10% of DC co-cultured with IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells expressed IL-12, compared with 25-30% of DC co-cultured with control V γ 9V δ 2 T cells (Fig 4D).

DC maturation is associated with an increase of their antigen presentation capacity and the induction of naive T cell proliferation. Therefore, we pre-incubated DC with control or IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells for 18h, and then loaded them with a pool of CMV and EBV peptides before adding CFSE-stained autologous T cells. After 6 days, analysis of the CFSE-staining of T cells by flow cytometry showed that the percentage of proliferating T cells was significantly higher when peptide-loaded DC were incubated with control than with IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells (Fig 4E).

These results demonstrate that DC maturation and cytokine production as well as DC-mediated T cell proliferation are impaired by IL-21-cultured than control V γ 9V δ 2 T cells.

CD73⁺ V γ 9V δ 2 T cells display regulatory activities

As all the previous results were obtained using bulk IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells, we wanted to know whether the entire population or a specific subpopulation displayed such regulatory functions. As only a small portion of V γ 9V δ 2 T cells co-expressed CD39 and CD73 (Fig 2C), we focused our investigation on FACS-sorted CD73⁺ V γ 9V δ 2 T cells. As expected, the

CD73⁺ subpopulation generated more adenosine than CD73⁻ cells or the bulk population (Fig 5A). Moreover, the CD73⁺ subpopulation constitutively expressed higher amounts of IL-10 mRNA (Fig 5B) and secreted more IL-10 than CD73⁻ V γ 9V δ 2 T cells (Fig 5C). IL-10 secretion by CD73⁺ cells was further increased following HMBPP stimulation, while it remained very low in activated CD73⁻ V γ 9V δ 2 T cells. Conversely, CD73⁺ V γ 9V δ 2 T cells were less efficient as cytotoxic effectors. Indeed, fewer CD73⁺ cells were IFN- γ ⁺ and TNF- α ⁺ (Fig 5D) and they displayed lower cytotoxic activity against Daudi lymphoma cells, as revealed by their lower CD107a expression, compared with CD73⁻ cells (Fig 5E).

These results suggest that IL-21 favors the development of a V γ 9V δ 2 T cell subset that expresses CD73 and displays regulatory functions.

Evidence of a CD73⁺ $\gamma\delta$ T cell population with a regulatory phenotype in tumor-bearing mice

To assess the *in vivo* relevance of our findings obtained in human $\gamma\delta$ T cells, we used a syngeneic cancer tumor model in which C57Bl/6 mice were grafted with mouse TC1 cells. Comparison of the expression of CD73, IFN- γ , and IL-10 in tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells and in splenic $\gamma\delta$ T cells isolated from non-grafted (naive) and tumor-bearing mice showed that \approx 70% of splenic $\gamma\delta$ T cells expressed CD73 in both naive and grafted mice. This percentage was significantly higher for tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells (up to 95% of CD73⁺ $\gamma\delta$ T cells in some tumors) (Fig 6A). We could detect IL-21 mRNA expression in the spleen and tumors of grafted mice, but not in the spleen of naive mice. Moreover, IL-21 mRNA level was higher in tumors than in spleens (Fig 6B). Analysis of IL-10 expression in splenic and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ and CD4⁺ T cells showed that upon activation with PMA and ionomycin (PMA), the percentage of IL-10⁺ $\gamma\delta$ T cells was higher in spleen cells from tumor-bearing than from naive mice and this percentage was significantly increased in the tumors (Fig 6C). Conversely, the

percentage of IL-10⁺ CD4⁺ T cells was highest in control spleens than in spleens and tumors from grafted mice (Fig 6D). Finally, we found that the tumor to spleen ratio for CD73 expression was equal to 1 for IFN- γ ⁺ $\gamma\delta$ T cells and significantly higher for IL-10⁺ $\gamma\delta$ T cells, indicating that CD73 expression was higher in tumor-infiltrating IL-10⁺ $\gamma\delta$ T cells. In comparison, in CD4⁺ T cells the ratio was 1 for both IFN- γ ⁺ and IL-10⁺ cells. Overall, these data suggest that tumor development may promote the expansion in spleen and tumors of a regulatory subpopulation of $\gamma\delta$ T cells that strongly expresses CD73 and produces IL-10.

Discussion

In this study, we assessed the role of IL-21 in V γ 9V δ 2 T cell polarization (i.e. effector *versus* regulatory functions) and found that it promotes V γ 9V δ 2 T cell regulatory functions by favoring the development of an immunosuppressive CD73⁺ subpopulation. Specifically, we demonstrated that, when cultured in the presence of IL-21, V γ 9V δ 2 T cells express CD73 (a negative regulator of the immune response) and display regulatory functions that affect the proliferative capacity of other immune cells, such as T cells, through the CD73/adenosine pathway. Moreover, IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells secrete IL-10 and IL-8 cytokines, and induce DC maturation and DC-mediated T cell proliferation less efficiently than control V γ 9V δ 2 T cells (no IL-21). Finally, data obtained in a syngeneic tumor model suggest that tumor development could promote the expansion of a regulatory subpopulation of $\gamma\delta$ T cells that strongly express CD73 and produce IL-10.

The CD39/CD73/adenosine pathway is a crucial actor of tumor development and tumor escape to immune surveillance^{37, 38}. Recently, Gruenbacher et al. demonstrated that CD39, but not CD73, is expressed by V γ 9V δ 2 T cells following TCR activation³⁴. Here, we found that IL-21 does not modify CD39 expression. However, in the presence of IL-21 we

observed that a subset of V γ 9V δ 2 T cells also expresses CD73 and generates adenosine. These data bring a molecular rationale to the recent work of Hu and colleagues who reported an important infiltration of CD39⁺ $\gamma\delta$ T lymphocytes in human colorectal cancer tissues and highlighted their regulatory action through their capacity to produce adenosine³⁹. Indeed, high quantities of IL-21 are found in the microenvironment of colorectal cancers and they could influence CD73 expression by $\gamma\delta$ T cells.

We also demonstrated that CD73-positive V γ 9V δ 2 T cells produce IL-10 and secrete less pro-inflammatory cytokines, such as IFN- γ and TNF- α , than CD73-negative cells, suggesting that CD73 could be a marker of a regulatory V γ 9V δ 2T cell subpopulation. We did not detect the expression of other main suppressive molecules, such as TGF- β or IDO (data not shown), or of the regulatory T cell-associated *FOXP3* gene in IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells (data not shown). While IL-10 is known as one of the most potent immunosuppressive cytokines, several studies, in both mouse and human cancer models, reported that $\gamma\delta$ T cells display pro-tumor activity in an IL-17A-dependent manner. For example, in a hepatocellular carcinoma mouse model, $\gamma\delta$ T cells through IL-17A production are involved in the recruitment of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) to the tumor site in a CXCL5/CXCR2-dependent pathway¹⁶. In another murine model, IL-17A-producing V γ 6⁺ $\gamma\delta$ T cells promote ovarian cancer growth via mobilization of small peritoneal pro-tumor macrophages¹⁷. In our experimental conditions, we never detected IL-17A mRNA or protein in IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells. Interestingly, in human colorectal cancer, $\gamma\delta$ T cells are the main source of IL-17A, but also secrete other cytokines, including IL-8 that attracts polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSCs) in the tumor and sustains local immunosuppression¹⁸. Other recent data reported a pro-tumor function for IL-8 through promotion of MDSC recruitment and induction of epithelial-mesenchymal

transition¹⁸. Based on our finding that IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells, but not control cells, secrete significant amounts of IL-8, we propose that besides adenosine and IL-10, IL-8 production could also be part of V γ 9V δ 2 T cell immunosuppressive arsenal that will favor tumor development.

It is likely that CD73 expression does not identify a strictly immunosuppressive V γ 9V δ 2 T cell subpopulation because a part of these cells still produce pro-inflammatory cytokines. Further studies, such as transcriptomic analysis of the CD73⁺ V γ 9V δ 2 T cell subpopulation, should determine more precisely the signature of these cells that could then be used for bioinformatics analysis of tumor microarrays⁴⁰. Although IL-21 promotes the expansion of the CD73⁺ sub-population, it would also be interesting to determine whether IL-21 is required for the acquisition of regulatory features by the CD73⁺ V γ 9V δ 2 subpopulation or whether IL-21 promotes the expansion of a pre-existing suppressive subpopulation. Another pending question is the degree of reversibility of this regulatory phenotype.

One of the major challenges associated with the characterization of the CD73⁺ subpopulation resides in assessing its existence *in vivo* as well as its relevance in pathologies, such as cancer. We used here a syngeneic mouse tumor model to analyze the phenotype of tumor-infiltrating lymphocytes. We demonstrated the existence of a $\gamma\delta$ T cell subpopulation that expresses CD73 and produces IL-10 both in the spleen and the tumor of tumor-bearing mice. Moreover, in the tumor, CD73 expression was significantly higher in $\gamma\delta$ T cells that produce IL-10 than in those that produce IFN- γ , and IL-21 mRNA was expressed in the tumors. Although results in murine $\gamma\delta$ T cells cannot be directly transposed to human $\gamma\delta$ T cells, they are encouraging and suggest that the tumor microenvironment could favor a suppressive CD73⁺ subpopulation among the tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells.

Overall, we demonstrated that long-term exposure of V γ 9V δ 2 T cells to IL-21 promotes their regulatory properties and suppressive capacities, both directly through production of adenosine and IL-10 by the CD73⁺ subset, and indirectly through their effect on DC. Our study highlights new molecular mechanisms associated with V γ 9V δ 2 T cell regulatory functions and bring evidence of their possible favorable effect on tumor development.

Material and methods

Antigens, antibodies and reagents

HMBPP ((E)-4 hydroxy -3 methyl -but -2 enyl -pyrophosphate) was a generous gift from J.L. Montero (Institut des Biomolécules Max Mousseron, CNRS UMR 5247, Montpellier, France). Rat anti-human IL-10 monoclonal antibody and its isotype control were purchased from Biolegend and all other anti-human and their isotypically matched control mouse antibodies were from BD Biosciences (San Jose, CA, USA): anti-CD1a, anti-CD3, anti-CD27, anti-CD39, anti-CD45RA, anti-CD73, anti-CD83, anti-CD86, anti-CD107a, anti-IFN- γ , anti-IL-12, anti-TNF- α and anti- γ 9 TCR. Recombinant human GM-CSF and IL-4 from ImmunoTools (Friesoyte, Germany) were used at a concentration of 15 ng/ml and 10 ng/ml respectively. Recombinant human IL-2 (rhIL-2) was from Novartis Pharma (Rueil-Malmaison, France) and recombinant IL-21 (rhIL-21) was from Miltenyi Biotec (Paris, France).

Cell culture

PBMC were obtained by density centrifugation on Ficoll-Paque (Eurobio, Les Ulis, France) from the blood of healthy donors provided by the Etablissement Français du Sang (EFS).

CD14⁺ monocytes were purified from PBMC by magnetic positive separation using magnetic beads (Miltenyi Biotec). Total $\gamma\delta$ T cells were isolated from the remaining cells using pan $\gamma\delta$ T cell magnetic beads according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Purified $\gamma\delta$ T cells were stimulated with 10nM HMBPP, resulting in the specific amplification of V γ 9V δ 2 T cells. They were expanded in RPMI 1640/Glutamax medium supplemented with 5% human AB serum and 5% fetal calf serum (FCS) in the presence of IL-2 or IL-2 + IL-21 at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. $\gamma\delta$ T cells were cultured for 3 weeks before phenotyping and functional analysis. Monocytes (0.7×10⁶ cells/ml) were further differentiated into immature DC in complete culture medium (RPMI 1640/Glutamax) supplemented with 10% FCS in the presence of 15 ng/ml GM-CSF and 10 ng/ml IL-4 for 6 days. Fresh medium plus cytokines were added every two days and cell cultures contained >90% of immature (CD1a⁺/CD14⁻) DC as assessed by flow cytometry analysis at day 6. Raji and Daudi cells were cultured in RPMI 1640/Glutamax medium supplemented with 10% FCS at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. TC1 cells were cultured in RPMI 1640/Glutamax medium supplemented with 10% FCS, 1 mM pyruvate, 0.1mM minimal essential medium with nonessential amino acids at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

Flow cytometry analysis

Cells were incubated with antibodies at 4°C in PBS/2% FCS for 30min, washed and fixed in 1% PFA, or fixed and permeabilized at 4°C with BD FixPerm Kit for 30min (BD Biosciences), and then incubated with antibodies at 4°C for 30min for intracellular staining. Golgi PLUG (BD Biosciences) was used for the detection of IFN- γ and TNF- α and Golgi STOP for the detection of IL-8, IL-10, and IL-12. Data were acquired with a Cytoflex cytometer (Beckman-Coulter) and analyzed with the FlowJo software.

Total cell extract preparation and western blot analysis

$\gamma\delta$ T cells were cytokine-starved for 24h and stimulated with rhIL-21. At various time points, cells were lysed and proteins extracted with the NuPage Kit (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. Proteins were separated on SDS-PAGE gradient gels (4-12%), transferred to nitrocellulose membranes (Millipore), and detected with the anti-phosphorylated STAT3 (1:1000) and anti-STAT3 (1:1000) antibodies (Cell Signaling Technology). A horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:2000) was used for detection and immunoreactive bands were visualized with the chemiluminescence western blotting and PXI image analysis system (Syngene).

ELISA

2.10^6 $\gamma\delta$ T cells/ml were grown in fresh medium without cytokines in the presence or not of 10nM HMBPP for 6h and then supernatants were collected. IFN- γ , TNF- α , IL-8 and IL-10 were assessed using the BD Biosciences Opteia Kits. The mean values of duplicate samples from the same experiment are shown for each data point with their standard error of the mean (SEM).

RNA isolation and quantitative RT-PCR

$\gamma\delta$ T cells (2.10^6 cells/ml) were stimulated or not with HMBPP for 6h. RNA was extracted from cell pellets using the RNA Extraction Kit from Qiagen. The quality and concentration of RNA samples were assessed using a Nanodrop device (Thermofisher). After DNase inactivation, RNA was reverse transcribed (RT) using qScript XLT cDNA Super Mix (Quanta Biosciences), according to the manufacturer's instructions. Quantification by real-time

polymerase chain reaction (PCR) was carried out with the LightCycler 480 II System (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) using the SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) Kit (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). The forward and reverse primers used for the PCR reaction were as follow: GUS-forward 5'-GATTGCCAATGAAACCAGGTATCC-3', GUS-reverse 5'-ACACGCAGGTGGTATCAGTCTTG-3', IL-8-forward 5'- ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC-3', IL-8-reverse 5'- AACCTCTGCACCCAGTTTTTC-3', IL-10-forward 5'-ACAAGAGCAAGGCCGTGGAG-3', IL-10-reverse 5'-GTCGCCACCCTGATGTCTCA-3', INF- γ -forward 5'-TCATCCAAGTGATGGCTGAA-3', INF- γ -reverse 5'-ATATTGCAGGCAGGACAACC-3', TNF- α -forward 5'-AGCCCATGTTGTAGCAAACC-3', TNF- α -reverse 5'-TGAGGTACAGGCCCTCTGAT-3', CD39-forward 5'-GACTCTTCCATTCCAGCAGTTTCAAATCC-3', CD39-reverse 5'-TGATGGCATTGTTGATAGTTTCCAATACCC-3' and CD73-forward 5'-GACTGATCGAGCCACTCCTC-3', CD73-reverse 5'- ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC-3'.

Adenosine measurement by Maldi TOF spectrometry

$\gamma\delta$ T cells (2×10^6 cells/mL) were washed in cold PBS and resuspended in PBS supplemented with 50 μ M AMP at 4°C for 30min. After centrifugation, adenosine levels in cell supernatants were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry, as previously described by Bastid et al.⁴¹.

T cell proliferation

$\alpha\beta$ T cells (1×10^7 cells/mL) were incubated with 0.75 μ mol/L CFSE (Molecular Probes) at 37°C for 12min. For experiments with supernatants, $\gamma\delta$ T cells (2×10^7 cells/mL) were washed and resuspended in complete medium supplemented or not with 50 μ M AMP at 4°C for

30min. After centrifugation, $\gamma\delta$ T cell supernatants and CFSE-labeled $\alpha\beta$ T cells were added to flat-bottom plates in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ immobilized anti-CD3 antibody (clone UCHT1). Proliferation of $\alpha\beta$ T cells was analyzed by flow cytometry at day 4. For antigen presentation experiments, monocyte-derived DC were co-cultured with $\gamma\delta$ T cells (ratio 1:1) for 18 hours, and then loaded with a peptide cocktail of 0.3 nM EBV and 0.3 nM CMV (Miltenyi). CFSE-labeled autologous $\alpha\beta$ T cells (1×10^6 cells/mL) were then added to the culture. Proliferation of $\alpha\beta$ T cells was analyzed by flow cytometry at day 6.

In vivo tumor-infiltrating lymphocyte phenotyping

C57Bl/6 mice were grafted subcutaneously with 0.5×10^6 TC1 cells. After three weeks, tumor and spleen were isolated and dissociated to obtain a single-cell suspension. Cells were stimulated or not with 20 ng/ml PMA and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ionomycin in RPMI/10% FCS in the presence of Golgi PLUG and Golgi STOP for 6 hours. Then, cells were incubated with anti-CD45, -CD3, -CD4 and $-\gamma\delta$ TCR antibodies (extracellular staining) before fixation and permeabilization with the BD FixPerm Kit and intracellular staining for IFN- γ and IL-10. Data were acquired on a Cytoflex cytometer (Beckman Coulter) and results were analyzed using the FlowJo software.

Statistical analysis

Results were compared using the paired Wilcoxon test. A P value <0.05 was considered as statistically significant. Analyses of statistical significance were performed using the Prism software (GraphPad Software).

1. O'Brien RL, Roark CL, Born WK. IL-17-producing gammadelta T cells. *European journal of immunology* 2009; 39:662-6.
2. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature reviews Immunology* 2010; 10:467-78.
3. Hayday AC. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annual review of immunology* 2000; 18:975-1026.
4. Hintz M, Reichenberg A, Altincicek B, Bahr U, Gschwind RM, Kollas AK, et al. Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in *Escherichia coli*. *FEBS letters* 2001; 509:317-22.
5. Altincicek B, Moll J, Campos N, Foerster G, Beck E, Hoeffler JF, et al. Cutting edge: human gamma delta T cells are activated by intermediates of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J Immunol* 2001; 166:3655-8.
6. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *The Journal of experimental medicine* 2003; 197:163-8.
7. Bonneville M, Scotet E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Current opinion in immunology* 2006; 18:539-46.
8. Riganti C, Massaia M, Davey MS, Eberl M. Human gammadelta T-cell responses in infection and immunotherapy: common mechanisms, common mediators? *European journal of immunology* 2012; 42:1668-76.
9. Catros V, Toutirais O, Bouet F, Cabillic F, Desille M, Fournie JJ. [Tgammadelta lymphocytes in oncology: unconventional killer lymphocytes]. *Medecine sciences : M/S* 2010; 26:185-91.

10. Buccheri S, Guggino G, Caccamo N, Li Donni P, Dieli F. Efficacy and safety of gammadelta T cell-based tumor immunotherapy: a meta-analysis. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 2014; 28:81-90.
11. Gomes AQ, Martins DS, Silva-Santos B. Targeting gammadelta T lymphocytes for cancer immunotherapy: from novel mechanistic insight to clinical application. *Cancer research* 2010; 70:10024-7.
12. Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, Caccamo N, Meraviglia S, Cicero G, et al. Targeting human {gamma}delta T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research* 2007; 67:7450-7.
13. Meraviglia S, Eberl M, Vermijlen D, Todaro M, Buccheri S, Cicero G, et al. In vivo manipulation of Vgamma9Vdelta2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clinical and experimental immunology* 2010; 161:290-7.
14. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, Reimer P, Weissinger F, Ruediger T, et al. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003; 102:200-6.
15. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau CS, et al. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* 2015; 522:345-8.
16. Ma S, Cheng Q, Cai Y, Gong H, Wu Y, Yu X, et al. IL-17A produced by gammadelta T cells promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Cancer research* 2014; 74:1969-82.
17. Rei M, Goncalves-Sousa N, Lanca T, Thompson RG, Mensurado S, Balkwill FR, et al. Murine CD27(-) Vgamma6(+) gammadelta T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014; 111:E3562-70.
18. Wu P, Wu D, Ni C, Ye J, Chen W, Hu G, et al. gammadelta T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity* 2014; 40:785-800.

19. Peng G, Wang HY, Peng W, Kiniwa Y, Seo KH, Wang RF. Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity* 2007; 27:334-48.
20. Daley D, Zambirinis CP, Seifert L, Akkad N, Mohan N, Werba G, et al. gammadelta T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining alphabeta T Cell Activation. *Cell* 2016; 166:1485-99 e15.
21. Croce M, Rigo V, Ferrini S. IL-21: a pleiotropic cytokine with potential applications in oncology. *Journal of immunology research* 2015; 2015:696578.
22. Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annual review of immunology* 2008; 26:57-79.
23. Leonard WJ, Wan CK. IL-21 Signaling in Immunity. *F1000Research* 2016; 5.
24. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 2000; 408:57-63.
25. Zeng R, Spolski R, Finkelstein SE, Oh S, Kovanen PE, Hinrichs CS, et al. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *The Journal of experimental medicine* 2005; 201:139-48.
26. Coquet JM, Kyparissoudis K, Pellicci DG, Besra G, Berzins SP, Smyth MJ, et al. IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production. *Journal of immunology* 2007; 178:2827-34.
27. Fantini MC, Rizzo A, Fina D, Caruso R, Becker C, Neurath MF, et al. IL-21 regulates experimental colitis by modulating the balance between Treg and Th17 cells. *European journal of immunology* 2007; 37:3155-63.
28. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TF, et al. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res*; 73:2468-79.
29. Ma J, Ma D, Ji C. The role of IL-21 in hematological malignancies. *Cytokine* 2011; 56:133-9.

30. Thedrez A, Harly C, Morice A, Salot S, Bonneville M, Scotet E. IL-21-mediated potentiation of antitumor cytolytic and proinflammatory responses of human V gamma 9V delta 2 T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunol* 2009; 182:3423-31.
31. Eberl M, Engel R, Beck E, Jomaa H. Differentiation of human gamma-delta T cells towards distinct memory phenotypes. *Cellular immunology* 2002; 218:1-6.
32. Caccamo N, Todaro M, La Manna MP, Sireci G, Stassi G, Dieli F. IL-21 regulates the differentiation of a human gammadelta T cell subset equipped with B cell helper activity. *PLoS One* 2012; 7:e41940.
33. Bansal RR, Mackay CR, Moser B, Eberl M. IL-21 enhances the potential of human gammadelta T cells to provide B-cell help. *European journal of immunology* 2012; 42:110-9.
34. Gruenbacher G, Gander H, Rahm A, Idzko M, Nussbaumer O, Thurnher M. Ecto-ATPase CD39 Inactivates Isoprenoid-Derived Vgamma9Vdelta2 T Cell Phosphoantigens. *Cell reports* 2016; 16:444-56.
35. Ismaili J, Olislagers V, Poupot R, Fournie JJ, Goldman M. Human gamma delta T cells induce dendritic cell maturation. *Clinical immunology* 2002; 103:296-302.
36. Ni M, Martire D, Scotet E, Bonneville M, Sanchez F, Lafont V. Full restoration of Brucella-infected dendritic cell functionality through Vgamma9Vdelta2 T helper type 1 crosstalk. *PLoS One* 2012; 7:e43613.
37. Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene* 2013; 32:1743-51.
38. Bonnefoy N, Bastid J, Alberici G, Bensussan A, Eliaou JF. CD39: A complementary target to immune checkpoints to counteract tumor-mediated immunosuppression. *Oncoimmunology* 2015; 4:e1003015.
39. Hu G, Wu P, Cheng P, Zhang Z, Wang Z, Yu X, et al. Tumor-infiltrating CD39+gammadeltaTregs are novel immunosuppressive T cells in human colorectal cancer. *Oncoimmunology* 2017; 6:e1277305.

40. Tosolini M, Pont F, Poupot M, Vergez F, Nicolau-Travers ML, Vermijlen D, et al. Assessment of tumor-infiltrating TCRVgamma9Vdelta2 gammadelta lymphocyte abundance by deconvolution of human cancers microarrays. *Oncoimmunology* 2017; 6:e1284723.
41. Bastid J, Regairaz A, Bonnefoy N, Dejou C, Giustiniani J, Laheurte C, et al. Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity. *Cancer immunology research* 2015; 3:254-65.

Figure legends

Figure 1. Expression of IL-21R in V γ 9V δ 2 T cells and induction of STAT3 phosphorylation by IL-21. (A) Representative histograms showing IL-21R expression in freshly isolated V γ 9V δ 2 T cells (left panel) and after 2 weeks of culture in the presence of IL-21 or not (control) (right panel). Overlay of isotype control (solid grey), control V γ 9V δ 2 T cells (black line) and IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells (grey line). (B) Western blot analysis of STAT3 phosphorylation induced by IL-21 and total STAT3 in control (Ctrl) and IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells (IL-21). Data are representative of two independent experiments performed with cells from different donors.

Figure S1. Differentiation of V γ 9V δ 2 T cells. (A) Representative dot plots of CD45RA and CD27 expression in freshly isolated V γ 9V δ 2 T cells (D0) and 2 weeks after culture with (IL-21) or without (Ctrl) IL-21 (D15). (B) Contingency histograms showing the distribution of V γ 9V δ 2 T cells according to their differentiation status at D0 and D15 after culture with or without IL-21: naive cells: CD45RA⁺/CD27⁺; central memory (CM): CD45RA⁻/CD27⁺; T effector memory (TEM): CD45RA⁻/CD27⁻; and T effector memory re-expressing CD45RA (TEMRA): CD45RA⁺ CD27⁻. Representative images of one of four experiments performed with cells from different donors.

Figure 2. Expression of CD39 and CD73 in V γ 9V δ 2 T cells and adenosine production. Graphs show the percentage of CD39⁺ (A), CD73⁺ (B) and CD39⁺/CD73⁺ (C) control (Ctrl) and IL-21-cultured (IL-21) V γ 9V δ 2 T cells. (D) Production of adenosine by control (Ctrl) and IL-21-cultured (IL-21) V γ 9V δ 2 T cells assessed by MALDI TOF mass spectrometry. *p<0.05 and ***p<0.001 (paired Wilcoxon test). (E) Representative flow cytometry histogram showing CFSE staining of T cells grown in the presence of immobilized anti-CD3 monoclonal antibody and the supernatant from IL-21-amplified V γ 9V δ 2 T cells cultured with or without AMP and APCP (CD73 inhibitor) (left panel) for 4 days. The proliferation index was calculated relative to T cell proliferation in medium alone and is represented as the mean of two experiments performed with cells from different donors (right panel).

Figure S2. Relative CD39 and CD73 mRNA expression in V γ 9V δ 2 T cells. Relative quantification (rq) of CD39 mRNA (A) and CD73 mRNA (B) in V γ 9V δ 2T cells (Ctrl) and IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells (IL-21); * p <0.05 (paired Wilcoxon test).

Figure S3. Expression and production of IFN- γ and TNF- α by V γ 9V δ 2 T cells. Graphs show the percentage of IFN- γ ⁺ (A) and TNF- α ⁺ (B) in control (Ctrl) and IL-21-cultured (IL-21) V γ 9V δ 2T cells after activation by HMBPP for 5 hours. Secretion of IFN- γ (C) and TNF- α (D) by control (Ctrl) and IL-21-cultured (IL-21) V γ 9V δ 2 T cells activated or not with HMBPP was assessed in the supernatants by ELISA. No statistical difference was observed between control and IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells.

Figure 3. Production of IL-10 and IL-8 by V γ 9V δ 2 T cells. Quantification of IL-10 (A) and IL-8 (B) by ELISA in the supernatant of control (Ctrl) and IL-21-cultured (IL-21) V γ 9V δ 2 T cells activated or not with HMBPP for 6h; * p <0.05 and ** p <0.01 (paired Wilcoxon test).

Figure 4. Effect of IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells on dendritic cells. Monocyte-derived DC were co-cultured with control (Ctrl) or IL-21-cultured (IL-21) V γ 9V δ 2 T cells for 48 hours. Then, expression of CD83 (A) and CD86 (B) in DC was assessed by flow cytometry analysis. Both the percentage of positive DC (right panels) and the MFI (left panels) are shown. (C) Representative flow cytometry histograms of FITC-conjugated dextran endocytosis by DC with or without LPS (left panel) and by DC co-cultured with HMBPP-activated control (Ctrl, medium panel) and IL-21-cultured (IL-21, right panel) V γ 9V δ 2 T cells for 48h. Each analysis

was repeated twice and performed each time with cells from different donors. (D) Percentages of IL-12⁺ DC following 18h of co-culture with control (Ctrl) and IL-21-amplified (IL-21) V γ 9V δ 2 T cells activated or not with HMBPP. (E) Analysis of T cell proliferation induced by DC loaded or not with CMV and EBV (peptides) after co-culture with control (Ctrl) or IL-21-amplified (IL-21) V γ 9V δ 2 T cells for 18h. Proliferation was assessed at day 6. This experiment was repeated three times and performed each time with cells from different donors. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 (paired Wilcoxon test).

Figure 5. Characterization of CD73⁺ V γ 9V δ 2 T cells. (A) Adenosine production by control (Ctrl), bulk IL-21-cultured (IL-21), CD73⁻ IL-21-cultured (CD73⁻) and CD73⁺ (CD73⁺) IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells was measured by MALDI-TOF mass spectrometry. Representative results of one of four experiments performed each time with cells from different donors.

(B) Relative quantification of IL-10 mRNA in Ctrl, CD73⁻ and CD73⁺ V γ 9V δ 2 T cells. This experiment was performed twice, each time with cells from different donors. (C) IL-10 production by Ctrl, CD73⁻, CD73⁺ V γ 9V δ 2 T cells, stimulated or not with HMBPP. This experiment was performed twice, each time with cells from different donors. (D) Graphs show the percentage of IFN- γ ⁺ (left panel) and TNF- α ⁺ (right panel) cells in the CD73⁻ and CD73⁺ subpopulations of IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells. (E) Analysis of CD107a membrane expression in CD73⁻ and CD73⁺ IL-21-cultured V γ 9V δ 2 T cells after HMBPP stimulation or co-cultured with Daudi cells for 6h. This experiment was performed three times, each time with cells from different donors; **p<0.01 and ***p<0.001 (paired Wilcoxon test).

Figure 6. Analysis of $\gamma\delta$ T cell populations in naive or TC1-grafted mice. (A) Percentage of CD73⁺ $\gamma\delta$ T cells from the spleen of naive and from the spleen and tumor of TC1-grafted

C57Bl/6 mice. (B) Relative quantification of IL-21 mRNA in total cells from the spleen of naive mice and from the spleen and tumor of TC1-grafted C57Bl/6 mice. Results were normalized to CD45 mRNA level. (C) Percentage of IL-10⁺ $\gamma\delta$ T cells and (D) of IL-10⁺ CD4⁺ T cells from the spleen of naive and TC1-grafted C57Bl/6 mice and from TC1 tumors, after cell activation or not with PMA and ionomycin. (E) CD73 expression (Geo mean) by IFN- γ - and IL-10-producing $\gamma\delta$ T cells and CD4⁺ T cells calculated as the ratio between the expression in tumor-infiltrating cells and in splenocytes of TC1-grafted mice. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 (paired Wilcoxon test).

Figure 1

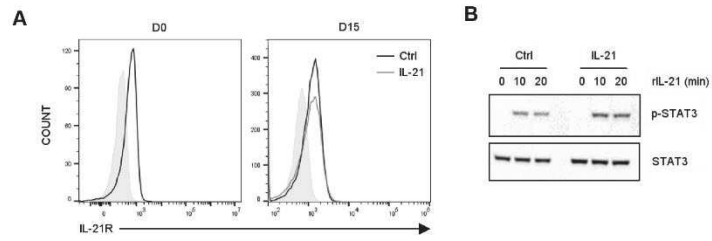


Figure S1

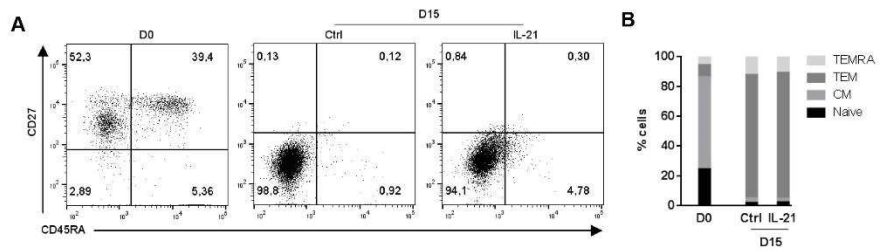


Figure 2

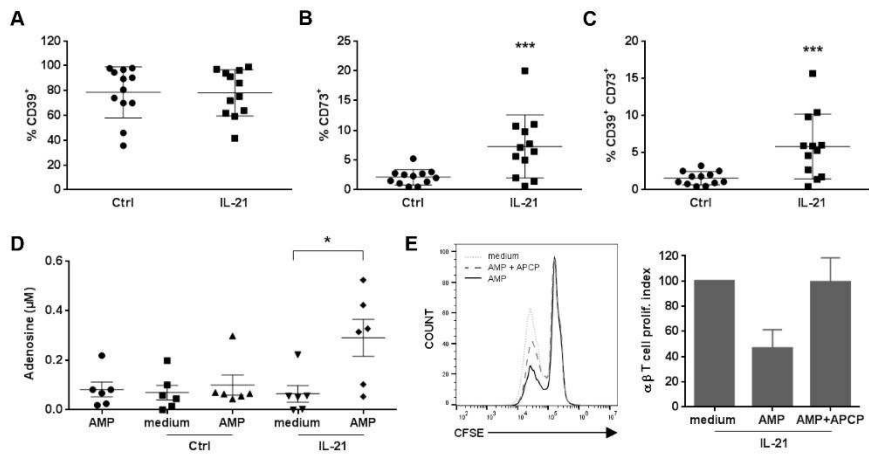


Figure S2

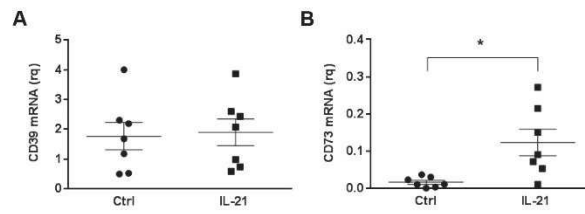


Figure S3

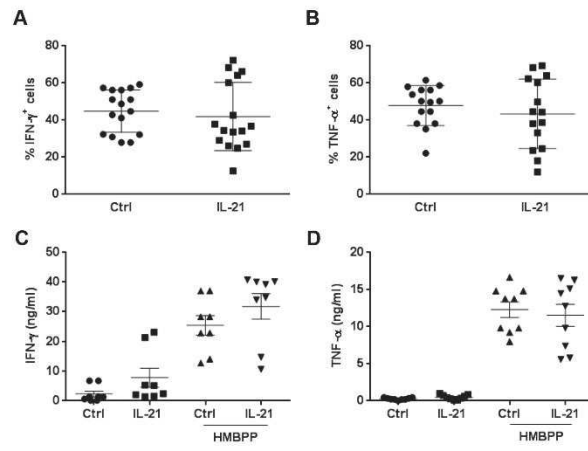


Figure 3

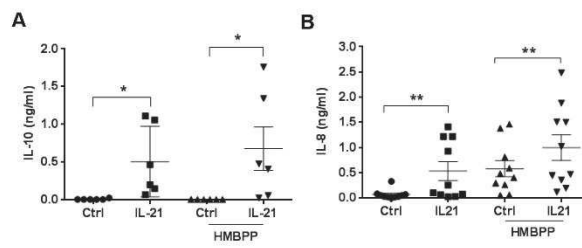


Figure 4

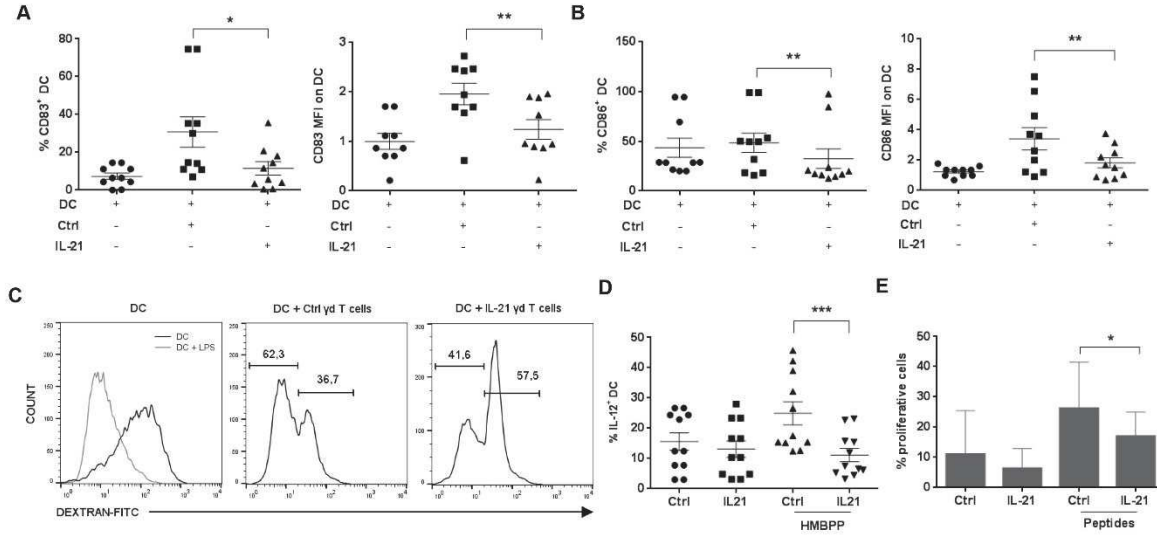


Figure 5

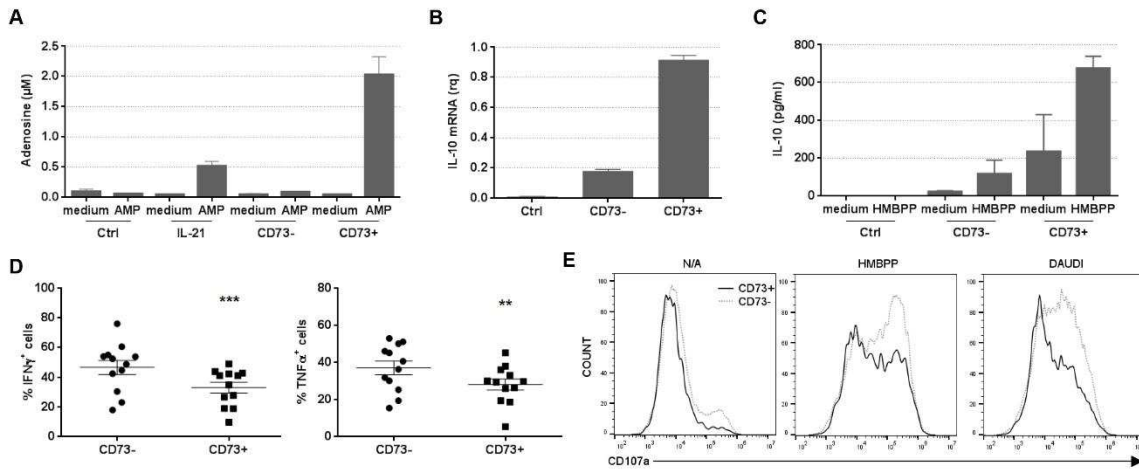
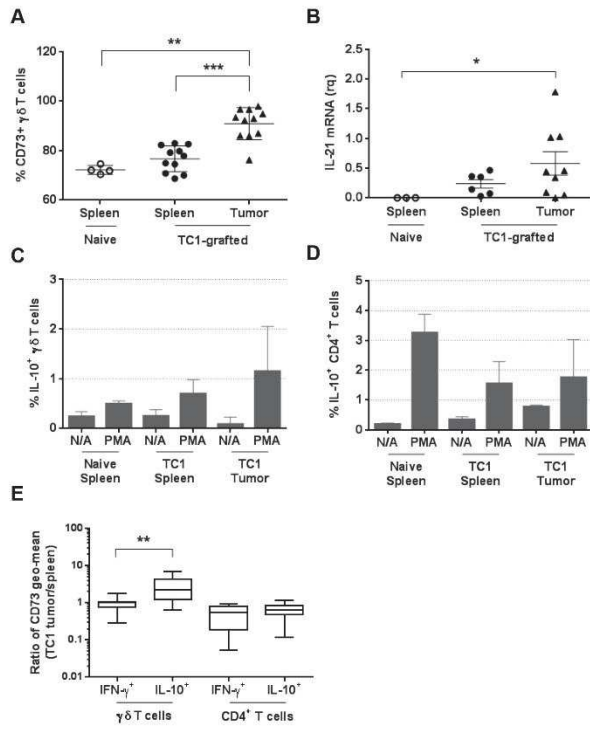


Figure 6



Publications Internationales à comité de lecture.

« PD-1 Blockade at the Time of Tumor Escape Potentiates the Immune-Mediated Antitumor Effects of a Melanoma-Targeting Monoclonal Antibody » **Laetitia They**, Henri-Alexandre Michaud, Ondine Becquart, Virginie Lafont, Bernard Guillot, Florence Boissière-Michot, Marta Jarlier, et al. 2017.

Oncoimmunology 6 (10): e1353857. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1353857>.

« IL-21 Promotes the Development of a CD73-Positive V γ 9V δ 2 T Cell Regulatory Population ».

Barjon, Clément, Henri-Alexandre Michaud, Angeline Fages, Cécile Dejou, Alexandre Zampieri, **Laetitia They**, Aurélie Gennetier, et al. 2017.

Oncoimmunology 7 (1): e1379642. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1379642>.

« C57BL/6 and Swiss Webster Mice Display Differences in Mobility, Gliosis, Microcavity Formation and Lesion Volume After Severe Spinal Cord Injury ».

Noristani, Harun Najib, **Laetitia They**, et Florence Evelyne Perrin. 2018.

Frontiers in Cellular Neuroscience 12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00173>.

Communications orales.

Présentation aux retraites du Labex MAbImprove :

2016: Strengthening the immunomodulatory effects of anti-tumor monoclonal antibody: Study of potentiating effects of combined therapies and analysis of the mechanisms involved.

2017: Strengthening the immunomodulatory effects of anti-tumor monoclonal antibody using an anti-immune checkpoint inhibitor in melanoma.

2018: Potentiation of immunomodulatory effects of an anti-tumor monoclonal antibody.

Présentation aux Journées des Etudiants en Thèse de l'IRCM (JET)

2016: The immunomodulatory effects of an anti-tumor monoclonal antibody in melanoma.

2018: Potentiation of immunomodulatory effects of an anti-tumor monoclonal antibody.

Séminaire interne à l'IRCM

2018: Potentiation of immunomodulatory effects of an anti-tumor monoclonal antibody.

Présentation à la Journée de l'Ecole Doctorale CBS2 (CBS2 Day)

2018: Potentiation of immunomodulatory effects of an anti-tumor monoclonal antibody.

Communications par posters.

Présentation à la Journée de l'Ecole Doctorale CBS2 (CBS2 Day)

2016: Characterization of long-term protective immunity after anti-tumor-based immunotherapy in melanoma.

Présentation à la 12^{ème} Journée Cancéropôle Grand Sud-Ouest (GSO)

2016: PD-1 blockade potentiates immunomodulatory functions of a tumor antigen targeting monoclonal antibody. - Prix du meilleur poster, Fondation SILAB Jean-Paufique.

Présentation aux Journées des Etudiants en Thèse de l'IRCM (JET)

2017: PD-1 blockade potentiates immunomodulation functions of an anti-tumoral monoclonal antibody.

Organisations d'évènements scientifiques.

Participation à l'organisation des journées scientifiques de l'ED CBS2 des éditions 2016, 2017 et 2018.

Participation à l'organisation de la Journée des Etudiants en Thèse de l'IRCM (JET) édition 2017.

Bénévole et participante (table ronde) au 17^{ème} colloque de Femmes & Sciences édition 2017.

Formations complémentaires

Conception et réalisation de projets et de procédures expérimentales (rongeurs). (*Biocampus*)

Statistiques pour expérimentateurs. (*ED CBS2*)

Atelier : Développement d'un médicament en cancérologie : anticorps thérapeutique et immunothérapie. (*GSO*)

Atelier : Design de panel multi-couleurs en cytométrie de flux. (*BD Horizon tour*)

Comment avoir une pédagogie innovante ? (*ED CBS2*)

Pitch et PECHA KUCHA. (*ED CBS2*)

Valorisation de la recherche et stratégies de publication : quels outils pour un jeune chercheur ? (*ED CBS2*)

Atelier : Outils pour le réseau. (*APEC et Femmes et Sciences*)

Atelier : Entretien d'embauche dans le privé. (*J-P. Hermann et Femmes et Sciences*)

Activité d'enseignement.

En complément de mon activité de recherche, j'ai eu été retenue pour effectuer un contrat d'enseignant-moniteur d'une durée de 64 heures par an (équivalent TD) durant ma 2^{ème} et ma 3^{ème} année de thèse. L'ensemble de ces enseignements a été réalisé à l'UFR Sciences de Montpellier sous la forme de travaux pratiques et de travaux dirigés pour des étudiants de Licence 1 à Licence 2. Au cours de mes enseignements j'ai pu participer à des enseignements dans les domaines de la biologie cellulaire ainsi que la neurobiologie.

Durant ma deuxième année de doctorat, j'ai encadré Marine Cahen, une étudiante de Master 1 de l'université Montpellier dans le cadre de son stage d'étude de deux mois.

Bibliographie.

- Abès, Riad, Emmanuelle Gélizé, Wolf Herman Fridman, et Jean-Luc Teillaud. 2010. « Long-Lasting Antitumor Protection by Anti-CD20 Antibody through Cellular Immune Response ». *Blood* 116 (6): 926-34. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-248609>.
- Acerbi, I, L Cassereau, I Dean, Q Shi, A Au, C Park, YY Chen, J Liphardt, ES Hwang, et VM Weaver. 2015. « Human Breast Cancer Invasion and Aggression Correlates with ECM Stiffening and Immune Cell Infiltration ». *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro* 7 (10): 1120-34. <https://doi.org/10.1039/c5ib00040h>.
- Adams, J. M., et S. Cory. 2007. « The Bcl-2 Apoptotic Switch in Cancer Development and Therapy ». *Oncogene* 26 (9): 1324-37. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210220>.
- Ahmadzadeh, Mojgan, Laura A. Johnson, Bianca Heemskerk, John R. Wunderlich, Mark E. Dudley, Donald E. White, et Steven A. Rosenberg. 2009. « Tumor Antigen-Specific CD8 T Cells Infiltrating the Tumor Express High Levels of PD-1 and Are Functionally Impaired ». *Blood* 114 (8): 1537-44. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195792>.
- Akhurst, R. J., et R. Derynck. 2001. « TGF-Beta Signaling in Cancer--a Double-Edged Sword ». *Trends in Cell Biology* 11 (11): S44-51.
- Albregues, J., G. Meneguzzi, et C. Gaggioli. 2014. « [Carcinoma-associated fibroblasts in cancer: the great escape]. » *Medecine sciences: M/S* 30 (4): 391-97. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143004012>.
- Aliagas, Elisabet, August Vidal, Laura Teixidó, Jordi Ponce, Enric Condom, et Mireia Martín-Satué. 2014. « High Expression of Ecto-Nucleotidases CD39 and CD73 in Human Endometrial Tumors ». Research article. *Mediators of Inflammation*. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/509027>.
- Alici, E. 2010. « IPH-2101, a Fully Human Anti-NK-Cell Inhibitory Receptor MAb for the Potential Treatment of Hematological Cancers. » *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 12 (6): 724-33.
- Allard, Bertrand, Sandra Pommey, Mark J. Smyth, et John Stagg. 2013. « Targeting CD73 Enhances the Antitumor Activity of Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 MAbs ». *Clinical Cancer Research*, août. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0545>.
- Amable, Lauren. 2016. « Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine ». *Pharmacological Research* 106 (avril): 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.001>.
- Amin, Asim, David H. Lawson, April K.S. Salama, Henry B. Koon, Troy Guthrie, Sajeve S. Thomas, Steven J. O'Day, et al. 2016. « Phase II study of vemurafenib followed by ipilimumab in patients with previously untreated BRAF-mutated metastatic melanoma ». *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 4 (1): 44. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0148-7>.
- Andreae, Susanne, Fabienne Piras, Nicolas Burdin, et Frédéric Triebel. 2002. « Maturation and Activation of Dendritic Cells Induced by Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223) ». *The Journal of Immunology* 168 (8): 3874-80. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.8.3874>.
- Andrews, Lawrence P., Ariel E. Marciscano, Charles G. Drake, et Dario A. A. Vignali. 2017. « LAG3 (CD223) as a Cancer Immunotherapy Target ». *Immunological Reviews* 276 (1): 80-96. <https://doi.org/10.1111/imr.12519>.

- Antonioli, Luca, Gennady G. Yegutkin, Pál Pacher, Corrado Blandizzi, et György Haskó. 2016. « Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities ». *Trends in cancer* 2 (2): 95-109. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.01.003>.
- Apetoh, Lionel, François Ghiringhelli, Antoine Tesniere, Michel Obeid, Carla Ortiz, Alfredo Criollo, Grégoire Mignot, et al. 2007. « Toll-like Receptor 4–Dependent Contribution of the Immune System to Anticancer Chemotherapy and Radiotherapy ». *Nature Medicine* 13 (9): 1050-59. <https://doi.org/10.1038/nm1622>.
- Aris, Mariana, María Marcela Barrio, et José Mordoh. 2012. « Lessons from Cancer Immunoediting in Cutaneous Melanoma ». Research article. *Journal of Immunology Research*. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/192719>.
- Aroca, P., F. Solano, J. C. Garcia-Borrón, et J. A. Lozano. 1991. « Specificity of Dopachrome Tautomerase and Inhibition by Carboxylated Indoles. Considerations on the Enzyme Active Site ». *The Biochemical Journal* 277 (Pt 2) (juillet): 393-97.
- Ascierto, P. A., P. Bono, S. Bhatia, I. Melero, M. S. Nyakas, I.-M. Svane, J. Larkin, et al. 2017. « LBA18Efficacy of BMS-986016, a Monoclonal Antibody That Targets Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3), in Combination with Nivolumab in Pts with Melanoma Who Progressed during Prior Anti–PD-1/PD-L1 Therapy (Mel Prior IO) in All-Comer and Biomarker-Enriched Populations ». *Annals of Oncology* 28 (suppl_5). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx440.011>.
- Atkins, M. B., M. T. Lotze, J. P. Dutcher, R. I. Fisher, G. Weiss, K. Margolin, J. Abrams, et al. 1999. « High-Dose Recombinant Interleukin 2 Therapy for Patients with Metastatic Melanoma: Analysis of 270 Patients Treated between 1985 and 1993 ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 17 (7): 2105-16. <https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.7.2105>.
- Atkins, Michael B. 1998. « IMMUNOTHERAPY AND EXPERIMENTAL APPROACHES FOR METASTATIC MELANOMA ». *Hematology/Oncology Clinics of North America* 12 (4): 877-902. [https://doi.org/10.1016/S0889-8588\(05\)70029-0](https://doi.org/10.1016/S0889-8588(05)70029-0).
- Balatoni, Tímea, Anita Mohos, Eszter Papp, Tímea Sebestyén, Gabriella Liskay, Judit Oláh, Anita Varga, et al. 2018. « Tumor-Infiltrating Immune Cells as Potential Biomarkers Predicting Response to Treatment and Survival in Patients with Metastatic Melanoma Receiving Ipilimumab Therapy ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 67 (1): 141-51. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2072-1>.
- Baratelli, Felicita, Ying Lin, Li Zhu, Seok-Chul Yang, Nathalie Heuzé-Vourc'h, Gang Zeng, Karen Reckamp, Mariam Dohadwala, Sherven Sharma, et Steven M. Dubinett. 2005. « Prostaglandin E2 Induces FOXP3 Gene Expression and T Regulatory Cell Function in Human CD4+ T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (3): 1483-90.
- Barsoum, I. B., C. A. Smallwood, D. R. Siemens, et C. H. Graham. 2014. « A Mechanism of Hypoxia-Mediated Escape from Adaptive Immunity in Cancer Cells ». *Cancer Research* 74 (3): 665-74. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0992>.
- Bastid, Jeremy, Anne Regairaz, Nathalie Bonnefoy, Cécile Déjou, Jérôme Giustiniani, Caroline Laheurte, Stéphanie Cochaud, et al. 2015. « Inhibition of CD39 Enzymatic Function at the Surface of Tumor Cells Alleviates Their Immunosuppressive Activity ». *Cancer Immunology Research* 3 (3): 254-65. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0018>.

- Beavis, Paul A., Upulie Divisekera, Christophe Paget, Melvyn T. Chow, Liza B. John, Christel Devaud, Karen Dwyer, John Stagg, Mark J. Smyth, et Phillip K. Darcy. 2013. « Blockade of A_{2A} Receptors Potently Suppresses the Metastasis of CD73⁺ Tumors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (36): 14711-16. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308209110>.
- Benson, Don M., Courtney E. Bakan, Shuhong Zhang, Shauna M. Collins, Jing Liang, Shivani Srivastava, Craig C. Hofmeister, et al. 2011. « IPH2101, a Novel Anti-Inhibitory KIR Antibody, and Lenalidomide Combine to Enhance the Natural Killer Cell versus Multiple Myeloma Effect ». *Blood* 118 (24): 6387-91. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-360255>.
- Benzaquen, J., C. -H. Marquette, N. Glaichenhaus, S. Leroy, P. Hofman, et M. Ilié. 2018. « Rationnel biologique de l'immunothérapie des cancers ». *Revue des Maladies Respiratoires* 35 (2): 206-22. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2017.11.008>.
- Bergers, Gabriele, et Steven Song. 2005. « The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance ». *Neuro-Oncology* 7 (4): 452-64. <https://doi.org/10.1215/S1152851705000232>.
- Bertrand, Florie, Julia Rochotte, Céline Colacios, Anne Montfort, Anne-Françoise Tilkin-Mariamé, Christian Touriol, Philippe Rochaix, et al. 2015. « Blocking Tumor Necrosis Factor α Enhances CD8 T-Cell-Dependent Immunity in Experimental Melanoma ». *Cancer Research*, mai. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2524>.
- Bid, Hemant Kumar. 2015. « Re: Bacillus Calmette-Guérin Strain Differences Have an Impact on Clinical Outcome in Bladder Cancer Immunotherapy ». *European Urology* 67 (2): 351. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.11.022>.
- Bilzer, M., et A. L. Gerbes. 2002. « Verminderung der experimentellen Hepatitis durch den G-Protein-gekoppelten Adenosin-A₂-Rezeptor ». *Zeitschrift für Gastroenterologie* 40 (07): 543-44. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32802>.
- Birkeland, Sven A., Hans H. Storm, Lars U. Lamm, Lotti Barlow, Ingemar Blohmé, Bjorn Forsberg, Bjorn Eklund, et al. s. d. « Cancer Risk after Renal Transplantation in the Nordic Countries, 1964–1986 ». *International Journal of Cancer* 60 (2): 183-89. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910600209>.
- Blackburn, Shawn D., Haina Shin, W. Nicholas Haining, Tao Zou, Creg J. Workman, Antonio Polley, Michael R. Betts, Gordon J. Freeman, Dario A. A. Vignali, et E. John Wherry. 2009. « Coregulation of CD8⁺ T Cell Exhaustion by Multiple Inhibitory Receptors during Chronic Viral Infection ». *Nature Immunology* 10 (1): 29-37. <https://doi.org/10.1038/ni.1679>.
- Boissier, R., et E. Gross. 2012. « La radiothérapie hypofractionnée dans le traitement du cancer de prostate : irradier moins pour traiter plus ». *Progrès en Urologie* 22 (6): 326-30. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2012.03.003>.
- Borghaei, H., C. J. Langer, S. Gadgeel, V. A. Papadimitrakopoulou, A. Patnaik, S. F. Powell, R. D. Gentzler, et al. 2017. « LBA49Updated Results from KEYNOTE-021 Cohort G: A Randomized, Phase 2 Study of Pemetrexed and Carboplatin (PC) with or without Pembrolizumab (Pembro) as First-Line Therapy for Advanced Nonsquamous NSCLC ». *Annals of Oncology* 28 (suppl_5). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx440.052>.
- Bozec, Aline, Mario M. Zaiss, Rosebeth Kagwiria, Reinhard Voll, Manfred Rauh, Zhu Chen, Sandra Mueller-Schmucker, et al. 2014. « T Cell Costimulation Molecules CD80/86 Inhibit Osteoclast Differentiation by Inducing the IDO/Tryptophan Pathway ». *Science Translational Medicine* 6 (235): 235ra60-235ra60. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007764>.

- Bracci, Laura, Federica Moschella, Paola Sestili, Valentina La Sorsa, Mara Valentini, Irene Canini, Sara Baccarini, et al. 2007. « Cyclophosphamide Enhances the Antitumor Efficacy of Adoptively Transferred Immune Cells through the Induction of Cytokine Expression, B-Cell and T-Cell Homeostatic Proliferation, and Specific Tumor Infiltration ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13 (2 Pt 1): 644-53. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1209>.
- Brichard, V., A. Van Pel, T. Wölfel, C. Wölfel, E. De Plaen, B. Lethé, P. Coulie, et T. Boon. 1993. « The Tyrosinase Gene Codes for an Antigen Recognized by Autologous Cytolytic T Lymphocytes on HLA-A2 Melanomas ». *The Journal of Experimental Medicine* 178 (2): 489-95.
- Brignone, Chrystelle, Bernard Escudier, Caroline Grygar, Manon Marcu, et Frédéric Triebel. 2009. « A Phase I Pharmacokinetic and Biological Correlative Study of IMP321, a Novel MHC Class II Agonist, in Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15 (19): 6225-31. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0068>.
- Brignone, Chrystelle, Caroline Grygar, Manon Marcu, Gaëlle Perrin, et Frédéric Triebel. 2007. « IMP321 (SLAG-3), an Immunopotentiator for T Cell Responses against a HBsAg Antigen in Healthy Adults: A Single Blind Randomised Controlled Phase I Study ». *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines* 5 (mars): 5. <https://doi.org/10.1186/1476-8518-5-5>.
- Bruggen, P. van der, C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, et T. Boon. 1991. « A Gene Encoding an Antigen Recognized by Cytolytic T Lymphocytes on a Human Melanoma ». *Science* 254 (5038): 1643-47. <https://doi.org/10.1126/science.1840703>.
- Brunet, J. F., F. Denizot, M. F. Luciani, M. Roux-Dosseto, M. Suzan, M. G. Mattei, et P. Golstein. 1987. « A New Member of the Immunoglobulin Superfamily--CTLA-4 ». *Nature* 328 (6127): 267-70. <https://doi.org/10.1038/328267a0>.
- Bubeník, Jan. 2004. « MHC Class I Down-Regulation: Tumour Escape from Immune Surveillance? (Review) ». *International Journal of Oncology* 25 (2): 487-91.
- Burnet, Macfarlane. 1957. « Cancer—A Biological Approach ». *British Medical Journal* 1 (5022): 779-86.
- Calugaru, Valentin, Nicolas Magné, Joel Héroult, Sylvie Bonvalot, Christophe Le Tourneau, et Juliette Thariat. 2015. « Nanoparticules et radiothérapie ». *Bulletin du Cancer* 102 (1): 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2014.10.002>.
- Cameron, D A, M C Cornbleet, R M Mackie, J A A Hunter, M Gore, B Hancock, et J F Smyth. 2001. « Adjuvant interferon alpha 2b in high risk melanoma – the Scottish study ». *British Journal of Cancer* 84 (9): 1146-49. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1623>.
- Campo, A. B. del, J. Carretero, N. Aptsiauri, et F. Garrido. 2012. « Targeting HLA Class I Expression to Increase Tumor Immunogenicity ». *Tissue Antigens* 79 (3): 147-54. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2011.01831.x>.
- Cartron, Guillaume, Hervé Watier, Josée Golay, et Philippe Solal-Celigny. 2004. « From the Bench to the Bedside: Ways to Improve Rituximab Efficacy ». *Blood* 104 (9): 2635-42. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1110>.

- Casares, Noelia, Marie O. Pequignot, Antoine Tesniere, François Ghiringhelli, Stéphan Roux, Nathalie Chaput, Elise Schmitt, et al. 2005. « Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death ». *The Journal of Experimental Medicine* 202 (12): 1691-1701. <https://doi.org/10.1084/jem.20050915>.
- Cauwels, Anje, Sandra Van Lint, Franciane Paul, Geneviève Garcin, Stefaan De Koker, Alexander Van Parys, Thomas Wueest, et al. 2018. « Delivering Type I Interferon to Dendritic Cells Empowers Tumor Eradication and Immune Combination Treatments ». *Cancer Research* 78 (2): 463-74. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1980>.
- Cavallo, Federica, Carla De Giovanni, Patrizia Nanni, Guido Forni, et Pier-Luigi Lollini. 2011. « 2011: The Immune Hallmarks of Cancer ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 60 (3): 319-26. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>.
- Chapman, Paul B., Axel Hauschild, Caroline Robert, John B. Haanen, Paolo Ascierto, James Larkin, Reinhard Dummer, et al. 2011. « Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation ». *New England Journal of Medicine* 364 (26): 2507-16. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782>.
- Chen, Lieping, et Xue Han. 2015. « Anti-PD-1/PD-L1 Therapy of Human Cancer: Past, Present, and Future ». *The Journal of Clinical Investigation* 125 (9): 3384-91. <https://doi.org/10.1172/JCI80011>.
- Chevolet, I., R. Speeckaert, M. Haspeslagh, B. Neyns, V. Krüse, M. Schreuer, M. Van Gele, N. Van Geel, et L. Brochez. 2014. « Peritumoral Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Melanoma: An Early Marker of Resistance to Immune Control? ». *The British Journal of Dermatology* 171 (5): 987-95. <https://doi.org/10.1111/bjd.13100>.
- Chicas-Sett, Rodolfo, Ignacio Morales-Orue, Delvys Rodriguez-Abreu, et Pedro Lara-Jimenez. 2018. « Combining radiotherapy and ipilimumab induces clinically relevant radiation-induced abscopal effects in metastatic melanoma patients: A systematic review ». *Clinical and Translational Radiation Oncology* 9 (février): 5-11. <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2017.12.004>.
- Coates, A., S. Abraham, S. B. Kaye, T. Sowerbutts, C. Frewin, R. M. Fox, et M. H. Tattersall. 1983. « On the Receiving End--Patient Perception of the Side-Effects of Cancer Chemotherapy ». *European Journal of Cancer & Clinical Oncology* 19 (2): 203-8.
- Coley, William B. 1910. « The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus) ». *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 3 (Surg Sect): 1-48.
- Coussens, Lisa M., et Zena Werb. 2002. « Inflammation and Cancer ». Special Features. *Nature*. 19 décembre 2002. <https://doi.org/10.1038/nature01322>.
- Curti, Brendan D., Magdalena Kovacsovics-Bankowski, Nicholas Morris, Edwin Walker, Lana Chisholm, Kevin Floyd, Joshua Walker, et al. 2013. « OX40 Is a Potent Immune-Stimulating Target in Late-Stage Cancer Patients ». *Cancer Research* 73 (24): 7189-98. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4174>.
- Davies, Helen, Graham R. Bignell, Charles Cox, Philip Stephens, Sarah Edkins, Sheila Clegg, Jon Teague, et al. 2002. « Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer ». *Nature* 417 (6892): 949-54. <https://doi.org/10.1038/nature00766>.

- Davis, Zachary B., Martin Felices, Michael R. Verneris, et Jeffrey S. Miller. 2015. « Natural Killer Cell Adoptive Transfer Therapy: Exploiting the First Line of Defense Against Cancer ». *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 21 (6): 486-91. <https://doi.org/10.1097/PPO.000000000000156>.
- Delbridge, A. R. D., et A. Strasser. 2015. « The BCL-2 Protein Family, BH3-Mimetics and Cancer Therapy ». *Cell Death and Differentiation* 22 (7): 1071-80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.50>.
- Dewan, M. Zahidunnabi, Ashley E. Galloway, Noriko Kawashima, J. Keith Dewyngaert, James S. Babb, Silvia C. Formenti, et Sandra Demaria. 2009. « Fractionated but Not Single-Dose Radiotherapy Induces an Immune-Mediated Abscopal Effect When Combined with Anti-CTLA-4 Antibody ». *Clinical Cancer Research* 15 (17): 5379-88. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0265>.
- Di Francesco, A. M., A. Ruggiero, et R. Riccardi. 2002. « Cellular and Molecular Aspects of Drugs of the Future: Oxaliplatin ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 59 (11): 1914-27.
- Dias, Lara Paro, Ângela C. Malheiros Luzo, Bruno B. Volpe, Marcela Durán, Sofia E. M. Galdames, Luiz A. B. Ferreira, Nelson Durán, et Wagner J. Fávaro. 2018. « Effects of intravesical therapy with platelet-rich plasma (PRP) and Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in non-muscle invasive bladder cancer ». *Tissue and Cell* 52 (juin): 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.03.011>.
- DiLillo, David J., Koichi Yanaba, et Thomas F. Tedder. 2010. « B Cells Are Required for Optimal CD4+ and CD8+ T Cell Tumor Immunity: Therapeutic B Cell Depletion Enhances B16 Melanoma Growth in Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184 (7): 4006-16. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903009>.
- Dilruba, Shahana, et Ganna V. Kalayda. 2016. « Platinum-Based Drugs: Past, Present and Future ». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 77 (6): 1103-24. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-2976-z>.
- Dimova, Ivanka, Georgi Popivanov, et Valentin Djonov. 2014. « Angiogenesis in Cancer - General Pathways and Their Therapeutic Implications ». *JBUON* 19: 15-21. <https://doi.org/10.7892/boris.83821>.
- Dong, Haidong, Scott E. Strome, Diva R. Salomao, Hideto Tamura, Fumiya Hirano, Dallas B. Flies, Patrick C. Roche, et al. 2002. « Tumor-Associated B7-H1 Promotes T-Cell Apoptosis: A Potential Mechanism of Immune Evasion ». *Nature Medicine* 8 (8): 793-800. <https://doi.org/10.1038/nm730>.
- Dosset, Magalie, Thaiz Rivera Vargas, Anaïs Lagrange, Romain Boidot, Frédérique Végran, Aurélie Roussey, Fanny Chalmin, et al. 2018. « PD-1/PD-L1 Pathway: An Adaptive Immune Resistance Mechanism to Immunogenic Chemotherapy in Colorectal Cancer ». *OncolImmunology* 7 (6): e1433981. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1433981>.
- Du, Shisuo, Neal McCall, Kyewon Park, Qing Guan, Paolo Fontina, Adam Ertel, Tingting Zhan, Adam P. Dicker, et Bo Lu. 2018. « Blockade of Tumor-Expressed PD-1 Promotes Lung Cancer Growth ». *Oncoimmunology* 7 (4): e1408747. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1408747>.

- Dummer, Reinhard, Paolo A. Ascierto, Helen J. Gogas, Ana Arance, Mario Mandala, Gabriella Liszkay, Claus Garbe, et al. 2018. « Encorafenib plus Binimetinib versus Vemurafenib or Encorafenib in Patients with BRAF-Mutant Melanoma (COLUMBUS): A Multicentre, Open-Label, Randomised Phase 3 Trial ». *The Lancet Oncology* 19 (5): 603-15. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30142-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30142-6).
- Dunn, Gavin P., Allen T. Bruce, Hiroaki Ikeda, Lloyd J. Old, et Robert D. Schreiber. 2002. « Cancer Immunoediting: From Immunosurveillance to Tumor Escape ». *Nature Immunology* 3 (11): 991-98. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>.
- Dunn, Gavin P., Lloyd J. Old, et Robert D. Schreiber. 2004. « The Three Es of Cancer Immunoediting ». *Annual Review of Immunology* 22 (1): 329-60. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>.
- Edin, Sofia, Maria L. Wikberg, Anna M. Dahlin, Jörgen Rutegård, Åke Öberg, Per-Arne Oldenborg, et Richard Palmqvist. 2012. « The Distribution of Macrophages with a M1 or M2 Phenotype in Relation to Prognosis and the Molecular Characteristics of Colorectal Cancer ». *PLOS ONE* 7 (10): e47045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047045>.
- Elia, Angela Rita, Sara Caputo, et Matteo Bellone. 2018. « Immune Checkpoint-Mediated Interactions Between Cancer and Immune Cells in Prostate Adenocarcinoma and Melanoma ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01786>.
- Eltzschig, Holger K., Michail V. Sitkovsky, et Simon C. Robson. 2012. « Purinergic Signaling during Inflammation ». *New England Journal of Medicine* 367 (24): 2322-33. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1205750>.
- Ercolini, Anne M., Brian H. Ladle, Elizabeth A. Manning, Lukas W. Pfannenstiel, Todd D. Armstrong, Jean-Pascal H. Machiels, Joan G. Bieler, Leisha A. Emens, R. Todd Reilly, et Elizabeth M. Jaffee. 2005. « Recruitment of Latent Pools of High-Avidity CD8(+) T Cells to the Antitumor Immune Response ». *The Journal of Experimental Medicine* 201 (10): 1591-1602. <https://doi.org/10.1084/jem.20042167>.
- Erdag, Gulsun, Jochen T. Schaefer, Mark E. Smolkin, Donna H. Deacon, Sofia M. Shea, Lynn T. Dengel, James W. Patterson, et Craig L. Slingluff. 2012. « Immunotype and Immunohistologic Characteristics of Tumor Infiltrating Immune Cells are Associated with Clinical Outcome in Metastatic Melanoma ». *Cancer Research* 72 (5): 1070-80. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3218>.
- Estlack, Larry E., Caleb C. Roth, Gary L. Thompson, William A. Lambert, et Bennett L. Ibey. 2014. « Nanosecond Pulsed Electric Fields Modulate the Expression of Fas/CD95 Death Receptor Pathway Regulators in U937 and Jurkat Cells ». *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 19 (12): 1755-68. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-1041-9>.
- Fang, D., J. Hallman, N. Sangha, T. E. Kute, J. A. Hammarback, W. L. White, et V. Setaluri. 2001. « Expression of Microtubule-Associated Protein 2 in Benign and Malignant Melanocytes: Implications for Differentiation and Progression of Cutaneous Melanoma ». *The American Journal of Pathology* 158 (6): 2107-15. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64682-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64682-2).
- Festino, Lucia, Vito Vanella, Claudia Trojaniello, et Paolo A. Ascierto. 2018. « Selecting Immuno-Oncology-Based Drug Combinations - What Should We Be Considering? » *Expert Review of Clinical Pharmacology*, septembre, 1-15. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1518713>.

Fidler, I. J. 1975. « Biological Behavior of Malignant Melanoma Cells Correlated to Their Survival in Vivo ». *Cancer Research* 35 (1): 218-24.

Foerster, Friedrich, Sebastian Boegel, Rosario Heck, Geetha Pickert, Nina Rüssel, Sebastian Rosigkeit, Matthias Bros, et al. 2018. « Enhanced protection of C57 BL/6 vs Balb/c mice to melanoma liver metastasis is mediated by NK cells ». *Oncolimmunology* 7 (4): e1409929. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1409929>.

Foon, K. A. 1982. « Treatment of B-Cell Lymphoma with Monoclonal Anti-Idiotypic Antibody ». *The New England Journal of Medicine* 307 (11): 686-87. <https://doi.org/10.1056/NEJM198209093071118>.

Forte, Giovanni, Rosalinda Sorrentino, Antonella Montinaro, Antonio Luciano, Ian M. Adcock, Piera Maiolino, Claudio Arra, Carla Cicala, Aldo Pinto, et Silvana Morello. 2012. « Inhibition of CD73 Improves B Cell-Mediated Anti-Tumor Immunity in a Mouse Model of Melanoma ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 189 (5): 2226-33. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200744>.

Fourcade, Julien, Zhaojun Sun, Mourad Benallaoua, Philippe Guillaume, Immanuel F. Luescher, Cindy Sander, John M. Kirkwood, Vijay Kuchroo, et Hassane M. Zarour. 2010. « Upregulation of Tim-3 and PD-1 Expression Is Associated with Tumor Antigen-Specific CD8+ T Cell Dysfunction in Melanoma Patients ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (10): 2175-86. <https://doi.org/10.1084/jem.20100637>.

Fourcade, Julien, Zhaojun Sun, Ornella Pagliano, Joe-Marc Chauvin, Cindy Sander, Bratislav Janjic, Ahmad A. Tarhini, et al. 2014. « PD-1 and Tim-3 Regulate the Expansion of Tumor Antigen-Specific CD8+ T Cells Induced by Melanoma Vaccines ». *Cancer Research* 74 (4): 1045-55. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2908>.

Fourcade, Julien, Zhaojun Sun, Ornella Pagliano, Philippe Guillaume, Immanuel F. Luescher, Cindy Sander, John M. Kirkwood, Daniel Olive, Vijay Kuchroo, et Hassane M. Zarour. 2012. « CD8(+) T Cells Specific for Tumor Antigens Can Be Rendered Dysfunctional by the Tumor Microenvironment through Upregulation of the Inhibitory Receptors BTLA and PD-1 ». *Cancer Research* 72 (4): 887-96. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2637>.

Frumento, Guido, Rita Rotondo, Michela Tonetti, Gianluca Damonte, Umberto Benatti, et Giovanni Battista Ferrara. 2002. « Tryptophan-derived Catabolites Are Responsible for Inhibition of T and Natural Killer Cell Proliferation Induced by Indoleamine 2,3-Dioxygenase ». *The Journal of Experimental Medicine* 196 (4): 459-68. <https://doi.org/10.1084/jem.20020121>.

Fujimura, Taku, Sabine Ring, Viktor Umansky, Karsten Mahnke, et Alexander H. Enk. 2012. « Regulatory T Cells Stimulate B7-H1 Expression in Myeloid-Derived Suppressor Cells in ret Melanomas ». *Journal of Investigative Dermatology* 132 (4): 1239-46. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.416>.

Fukumura, Dai, et Rakesh K. Jain. 2008. « Imaging Angiogenesis and the Microenvironment ». *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 116 (7-8): 695-715. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2008.01148.x>.

Gaggioli, Cedric, Steven Hooper, Cristina Hidalgo-Carcedo, Robert Grosse, John F. Marshall, Kevin Harrington, et Erik Sahai. 2007. « Fibroblast-Led Collective Invasion of Carcinoma Cells with Differing Roles for RhoGTPases in Leading and Following Cells ». *Nature Cell Biology* 9 (12): 1392-1400. <https://doi.org/10.1038/ncb1658>.

- Galluzzi, Lorenzo, Aitziber Buqué, Oliver Kepp, Laurence Zitvogel, et Guido Kroemer. 2015. « Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents ». *Cancer Cell* 28 (6): 690-714. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.10.012>.
- Galon, Jérôme, Anne Costes, Fatima Sanchez-Cabo, Amos Kirilovsky, Bernhard Mlecnik, Christine Lagorce-Pagès, Marie Tosolini, et al. 2006. « Type, Density, and Location of Immune Cells within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome ». *Science (New York, N.Y.)* 313 (5795): 1960-64. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>.
- Galon, Jérôme, Bernhard Mlecnik, Gabriela Bindea, Helen K. Angell, Anne Berger, Christine Lagorce, Alessandro Lugli, et al. s. d. « Towards the Introduction of the 'Immunoscore' in the Classification of Malignant Tumours ». *The Journal of Pathology* 232 (2): 199-209. <https://doi.org/10.1002/path.4287>.
- Gangadhar, Tara C., Bryan J. Schneider, Todd Michael Bauer, Jeffrey S. Wasser, Alexander I. Spira, Sandip P. Patel, Ani Sarkis Balmanoukian, et al. 2017. « Efficacy and safety of epacadostat plus pembrolizumab treatment of NSCLC: Preliminary phase I/II results of ECHO-202/KEYNOTE-037. » *Journal of Clinical Oncology* 35 (15_suppl): 9014-9014. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.9014.
- Garcin, Geneviève, Franciane Paul, Markus Staufenbiel, Yann Bordat, José Van der Heyden, Stephan Wilmes, Guillaume Cartron, et al. 2014. « High Efficiency Cell-Specific Targeting of Cytokine Activity ». *Nature Communications* 5: 3016. <https://doi.org/10.1038/ncomms4016>.
- Gatti, R. A., et R. A. Good. 1971. « Occurrence of Malignancy in Immunodeficiency Diseases. A Literature Review ». *Cancer* 28 (1): 89-98.
- Gerosa, Franca, Barbara Baldani-Guerra, Carla Nisii, Viviana Marchesini, Giuseppe Carra, et Giorgio Trinchieri. 2002. « Reciprocal Activating Interaction between Natural Killer Cells and Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 195 (3): 327-33.
- Ghanem, Ghanem, et Journé Fabrice. 2011. « Tyrosinase Related Protein 1 (TYRP1/Gp75) in Human Cutaneous Melanoma ». *Molecular Oncology* 5 (2): 150-55. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2011.01.006>.
- Ghiringhelli, François, et Mélanie Bruchard. 2017. « Les nouvelles combinaisons thérapeutiques ». *Innovations & Thérapeutiques en Oncologie* 3 (3): 177-85. <https://doi.org/10.1684/ito.2017.0091>.
- Ghiringhelli, François, Cedric Menard, Pierre Emmanuel Puig, Sylvain Ladoire, Stephan Roux, François Martin, Eric Solary, Axel Le Cesne, Laurence Zitvogel, et Bruno Chauffert. 2007. « Metronomic Cyclophosphamide Regimen Selectively Depletes CD4+CD25+ Regulatory T Cells and Restores T and NK Effector Functions in End Stage Cancer Patients ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 56 (5): 641-48. <https://doi.org/10.1007/s00262-006-0225-8>.
- Giannakis, Marios, Xinmeng Jasmine Mu, Sachet A. Shukla, Zhi Rong Qian, Ofir Cohen, Reiko Nishihara, Samira Bahl, et al. 2016. « Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma ». *Cell Reports* 15 (4): 857-65. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.075>.
- Gibbons Johnson, Rachel M., et Haidong Dong. 2017. « Functional Expression of Programmed Death-Ligand 1 (B7-H1) by Immune Cells and Tumor Cells ». *Frontiers in Immunology* 8: 961. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00961>.

Gogas, Helen J., John M. Kirkwood, et Vernon K. Sondak. 2007. « Chemotherapy for Metastatic Melanoma: Time for a Change? » *Cancer* 109 (3): 455-64. <https://doi.org/10.1002/cncr.22427>.

Golden, Encouse B., Sandra Demaria, Peter B. Schiff, Abraham Chachoua, et Silvia C. Formenti. 2013. « An Abscopal Response to Radiation and Ipilimumab in a Patient with Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer ». *Cancer Immunology Research* 1 (6): 365-72. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0115>.

Gomes, Fausto Gueths, Fernanda Nedel, Alessandro Menna Alves, Jacques Eduardo Nör, et Sandra Beatriz Chaves Tarquinio. 2013. « Tumor Angiogenesis and Lymphangiogenesis: Tumor/Endothelial Crosstalk and Cellular/Microenvironmental Signaling Mechanisms ». *Life Sciences* 92 (2): 101-7. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.10.008>.

Goodman, Louis S., Maxwell M. Wintrobe, William Dameshek, Morton J. Goodman, Alfred Gilman, et Margaret T. McLennan. 1984. « Nitrogen Mustard Therapy: Use of Methyl-Bis(Beta-Chloroethyl)Amine Hydrochloride and Tris(Beta-Chloroethyl)Amine Hydrochloride for Hodgkin's Disease, Lymphosarcoma, Leukemia and Certain Allied and Miscellaneous Disorders ». *JAMA* 251 (17): 2255-61. <https://doi.org/10.1001/jama.1984.03340410063036>.

Gordon, Sydney R., Roy L. Maute, Ben W. Dulken, Gregor Hutter, Benson M. George, Melissa N. McCracken, Rohit Gupta, et al. 2017. « PD-1 Expression by Tumour-Associated Macrophages Inhibits Phagocytosis and Tumour Immunity ». *Nature* 545 (7655): 495-99. <https://doi.org/10.1038/nature22396>.

Govindan, Ramaswamy, Aleksandra Szczesna, Myung-Ju Ahn, Claus-Peter Schneider, Pablo Fernando Gonzalez Mella, Fabrice Barlesi, Baohui Han, et al. 2017. « Phase III Trial of Ipilimumab Combined With Paclitaxel and Carboplatin in Advanced Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (30): 3449-57. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.7629>.

Granier, Clémence, Charles Dariane, Pierre Combe, Virginie Verkarre, Saik Urien, Cecile Badoual, Hélène Roussel, et al. 2016. « Tim-3 Expression on Tumor-Infiltrating PD-1+CD8+T Cells Correlates with Poor Clinical Outcome in Renal Cell Carcinoma ». *Cancer Research*, janvier, canres.0274.2016. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0274>.

Griffith, K. D., E. J. Read, J. A. Carrasquillo, C. S. Carter, J. C. Yang, B. Fisher, P. Aebersold, B. S. Packard, M. Y. Yu, et S. A. Rosenberg. 1989. « In Vivo Distribution of Adoptively Transferred Indium-111-Labeled Tumor Infiltrating Lymphocytes and Peripheral Blood Lymphocytes in Patients with Metastatic Melanoma ». *Journal of the National Cancer Institute* 81 (22): 1709-17.

Grimaldi, Antonio M., Ester Simeone, Diana Giannarelli, Paolo Muto, Sara Falivene, Valentina Borzillo, Francesca Maria Giugliano, et al. 2014. « Abscopal effects of radiotherapy on advanced melanoma patients who progressed after ipilimumab immunotherapy ». *Oncolimmunology* 3 (5): e28780. <https://doi.org/10.4161/onci.28780>.

Gros, Laurent, Hanna Dreja, Anne Laure Fiser, Marc Plays, Mireia Pelegrin, et Marc Piechaczyk. 2005. « Induction of Long-Term Protective Antiviral Endogenous Immune Response by Short Neutralizing Monoclonal Antibody Treatment ». *Journal of Virology* 79 (10): 6272-80. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.10.6272-6280.2005>.

Gros, Laurent, Mireia Pelegrin, Henri-Alexandre Michaud, Stéphanie Bianco, Javier Hernandez, Chantal Jacquet, et Marc Piechaczyk. 2008. « Endogenous Cytotoxic T-Cell

Response Contributes to the Long-Term Antiretroviral Protection Induced by a Short Period of Antibody-Based Immunotherapy of Neonatally Infected Mice ». *Journal of Virology* 82 (3): 1339-49. <https://doi.org/10.1128/JVI.01970-07>.

Grosso, Joseph F., Cristin C. Kelleher, Timothy J. Harris, Charles H. Maris, Edward L. Hipkiss, Angelo De Marzo, Robert Anders, et al. 2007. « LAG-3 Regulates CD8+ T Cell Accumulation and Effector Function in Murine Self- and Tumor-Tolerance Systems ». *The Journal of Clinical Investigation* 117 (11): 3383-92. <https://doi.org/10.1172/JCI31184>.

Guillebon, E. de, et E. Tartour. 2015. « Immunité antitumorale (mécanismes, <Emphasis Type="Italic">immunoediting</Emphasis>, immunosurveillance) ». *Oncologie* 17 (9): 337-44. <https://doi.org/10.1007/s10269-015-2542-z>.

Haeuw, Jean-François, Véronique Caussanel, et Alain Beck. 2009. « Les immunoconjugués, anticorps « armés » pour combattre le cancer ». *médecine/sciences* 25 (12): 1046-52. <https://doi.org/10.1051/medsci/200925121046>.

Halama, Niels, Sara Michel, Matthias Kloor, Inka Zoernig, Axel Benner, Anna Spille, Thora Pommerencke, et al. 2011. « Localization and Density of Immune Cells in the Invasive Margin of Human Colorectal Cancer Liver Metastases Are Prognostic for Response to Chemotherapy ». *Cancer Research* 71 (17): 5670-77. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0268>.

Hamid, Omid, Todd Michael Bauer, Alexander I. Spira, David C. Smith, Anthony J. Olszanski, Ahmad A. Tarhini, Primo Lara, et al. 2017. « Safety of epacadostat 100 mg bid plus pembrolizumab 200 mg Q3W in advanced solid tumors: Phase 2 data from ECHO-202/KEYNOTE-037. » *Journal of Clinical Oncology* 35 (15_suppl): 3012-3012. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.3012.

Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2000. « The Hallmarks of Cancer ». *Cell* 100 (1): 57-70.

Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The Next Generation ». *Cell* 144 (5): 646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Harrington, K J, L J Billingham, T B Brunner, N G Burnet, C S Chan, P Hoskin, R I Mackay, et al. 2011. « Guidelines for preclinical and early phase clinical assessment of novel radiosensitisers ». *British Journal of Cancer* 105 (5): 628-39. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.240>.

Haskó, György, Joel Linden, Bruce Cronstein, et Pál Pacher. 2008. « Adenosine Receptors: Therapeutic Aspects for Inflammatory and Immune Diseases ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 7 (9): 759-70. <https://doi.org/10.1038/nrd2638>.

Hato, Stanleyson V., Andrea Khong, I. Jolanda M. de Vries, et W. Joost Lesterhuis. 2014. « Molecular Pathways: The Immunogenic Effects of Platinum-Based Chemotherapeutics ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20 (11): 2831-37. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3141>.

Hauck, Fabian, Rebecca Voss, Christian Urban, et Markus G. Seidel. 2018. « Intrinsic and extrinsic causes of malignancies in patients with primary immunodeficiency disorders ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 141 (1): 59-68.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.06.009>.

Häusler, Sebastian Fm, Itsaso Montalbán Del Barrio, Joachim Diessner, Roland G. Stein, Jenny Strohschein, Arnd Höning, Johannes Dietl, et Jörg Wischhusen. 2014. « Anti-CD39 and Anti-CD73 Antibodies A1 and 7G2 Improve Targeted Therapy in Ovarian Cancer by Blocking Adenosine-Dependent Immune Evasion ». *American Journal of Translational Research* 6 (2): 129-39.

He, Yayi, Sangtian Liu, Jane Mattei, Paul A. Bunn, Caicun Zhou, et Daniel Chan. 2018. « The Combination of Anti-KIR Monoclonal Antibodies with Anti-PD-1/PD-L1 Monoclonal Antibodies Could Be a Critical Breakthrough in Overcoming Tumor Immune Escape in NSCLC ». *Drug Design, Development and Therapy* 12: 981-86. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S163304>.

Hebb, Jonathan P. O., Adriane R. Mosley, Felipe Vences-Catalán, Narendiran Rajasekaran, Anna Rosén, Peter Ellmark, et Dean W. Felsher. 2018. « Administration of Low-Dose Combination Anti-CTLA4, Anti-CD137, and Anti-OX40 into Murine Tumor or Proximal to the Tumor Draining Lymph Node Induces Systemic Tumor Regression ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 67 (1): 47-60. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2059-y>.

Hingorani, Sunil R., Lei Zheng, Andrea J. Bullock, Tara E. Seery, William P. Harris, Darren S. Sigal, Fadi Braiteh, et al. 2018. « HALO 202: Randomized Phase II Study of PEGPH20 Plus Nab-Paclitaxel/Gemcitabine Versus Nab-Paclitaxel/Gemcitabine in Patients With Untreated, Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma ». *Journal of Clinical Oncology* 36 (4): 359-66. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.9564>.

Hiniker, Susan M., Sunil A. Reddy, Holden T. Maecker, Priyanka B. Subrahmanyam, Yael Rosenberg-Hasson, Susan M. Swetter, Saurabh Saha, Lei Shura, et Susan J. Knox. 2016. « A Prospective Clinical Trial Combining Radiation Therapy with Systemic Immunotherapy in Metastatic Melanoma ». *International journal of radiation oncology, biology, physics* 96 (3): 578-88. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2016.07.005>.

Hodi, F. Stephen, Steven J. O'Day, David F. McDermott, Robert W. Weber, Jeffrey A. Sosman, John B. Haanen, Rene Gonzalez, et al. 2010. « Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma ». *The New England Journal of Medicine* 363 (8): 711-23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>.

Holtzhausen, Alisha, Fei Zhao, Kathy Evans, Masahito Tsutsui, Ciriana Orabona, Douglas S. Tyler, et Brent A. Hanks. 2015. « Melanoma-Derived Wnt5a Promotes Local Dendritic-Cell Expression of IDO and Immunotolerance: Opportunities for Pharmacologic Enhancement of Immunotherapy ». *Cancer Immunology Research*, juin, canimm.0167.2014. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0167>.

Hoskin, David W., Jamie S. Mader, Suzanne J. Furlong, David M. Conrad, et Jonathan Blay. 2008. « Inhibition of T Cell and Natural Killer Cell Function by Adenosine and Its Contribution to Immune Evasion by Tumor Cells (Review) ». *International Journal of Oncology* 32 (3): 527-35.

Huang, Ching-Tai, Creg J. Workman, Dallas Flies, Xiaoyu Pan, Aimee L. Marson, Gang Zhou, Edward L. Hipkiss, et al. 2004. « Role of LAG-3 in Regulatory T Cells ». *Immunity* 21 (4): 503-13. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.08.010>.

Huard, B., P. Gaulard, F. Faure, T. Hercend, et F. Triebel. 1994. « Cellular Expression and Tissue Distribution of the Human LAG-3-Encoded Protein, an MHC Class II Ligand ». *Immunogenetics* 39 (3): 213-17. <https://doi.org/10.1007/BF00241263>.

- Huard, B., P. Prigent, M. Tournier, D. Bruniquel, et F. Triebel. 1995. « CD4/Major Histocompatibility Complex Class II Interaction Analyzed with CD4- and Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3)-Ig Fusion Proteins ». *European Journal of Immunology* 25 (9): 2718-21. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250949>.
- Hurwitz, Herbert I., Louis Fehrenbacher, John D. Hainsworth, William Heim, Jordan Berlin, Eric Holmgren, Julie Hambleton, William F. Novotny, et Fairouz Kabbinavar. 2005. « Bevacizumab in Combination with Fluorouracil and Leucovorin: An Active Regimen for First-Line Metastatic Colorectal Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (15): 3502-8. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.10.017>.
- Hwu, P., M. X. Du, R. Lapointe, M. Do, M. W. Taylor, et H. A. Young. 2000. « Indoleamine 2,3-Dioxygenase Production by Human Dendritic Cells Results in the Inhibition of T Cell Proliferation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (7): 3596-99.
- Iannone, Raffaella, Lucio Miele, Piera Maiolino, Aldo Pinto, et Silvana Morello. 2014. « Adenosine limits the therapeutic effectiveness of anti-CTLA4 mAb in a mouse melanoma model ». *American Journal of Cancer Research* 4 (2): 172-81.
- Ji, Rui-Cheng. 2014. « Hypoxia and lymphangiogenesis in tumor microenvironment and metastasis ». *Cancer Letters* 346 (1): 6-16. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.12.001>.
- Jin, Dachuan, Jie Fan, Long Wang, Linda F. Thompson, Aijie Liu, Benjamin J. Daniel, Tahiro Shin, Tyler J. Curiel, et Bin Zhang. 2010. « CD73 on Tumor Cells Impairs Antitumor T-Cell Responses: A Novel Mechanism of Tumor-Induced Immune Suppression ». *Cancer Research*, février, 0008-5472.CAN-09-3109. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3109>.
- Kanda, S., K. Goto, H. Shiraishi, E. Kubo, A. Tanaka, H. Utsumi, K. Sunami, et al. 2016. « Safety and Efficacy of Nivolumab and Standard Chemotherapy Drug Combination in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Four Arms Phase Ib Study ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 27 (12): 2242-50. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw416>.
- Kaplan, D. H., V. Shankaran, A. S. Dighe, E. Stockert, M. Aguet, L. J. Old, et R. D. Schreiber. 1998. « Demonstration of an Interferon Gamma-Dependent Tumor Surveillance System in Immunocompetent Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (13): 7556-61.
- Kaplan, Hélène, et Janice M. Reichert. 2018. « Antibodies to Watch in 2018 ». *MAbs* 10 (2): 183-203. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1415671>.
- Kareva, Irina, et Philip Hahnfeldt. 2013. « The Emerging “Hallmarks” of Metabolic Reprogramming and Immune Evasion: Distinct or Linked? ». *Cancer Research*, février, canres.3696.2012. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3696>.
- Karzmark, C. J., et N. C. Pering. 1973. « Electron Linear Accelerators for Radiation Therapy: History, Principles and Contemporary Developments ». *Physics in Medicine and Biology* 18 (3): 321-54.
- Kast, Karin, Olaf Schoffer, Theresa Link, Almuth Forberger, Andrea Petzold, Antje Niedostatek, Carmen Werner, et al. 2017. « Trastuzumab and Survival of Patients with Metastatic Breast Cancer ». *Archives of Gynecology and Obstetrics* 296 (2): 303-12. <https://doi.org/10.1007/s00404-017-4421-x>.

- Kawakami, Hisato, Isamu Okamoto, Kimio Yonesaka, Kunio Okamoto, Kiyoko Shibata, Yume Shinkai, Haruka Sakamoto, et al. 2014. « The Anti-HER3 Antibody Patritumab Abrogates Cetuximab Resistance Mediated by Heregulin in Colorectal Cancer Cells ». *Oncotarget* 5 (23): 11847-56. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2663>.
- Khalil, Danny N., Michael A. Postow, Nageatte Ibrahim, Dale L. Ludwig, Jan Cosaert, Siva Rama Prasad Kambhampati, Shande Tang, et al. 2016. « An Open-label, Dose-Escalation Phase 1 Study of anti-TYRP1 monoclonal antibody IMC-20D7S for patients with relapsed or refractory melanoma ». *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 22 (21): 5204-10. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1241>.
- Kim, Jennifer E., Mira A. Patel, Antonella Mangraviti, Eileen S. Kim, Debebe Theodros, Esteban Velarde, Ann Liu, et al. 2016. « Combination Therapy with Anti-PD-1, Anti-TIM-3, and Focal Radiation Results in Regression of Murine Gliomas ». *Clinical Cancer Research*, juin. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1535>.
- Kirkwood, J. M., M. H. Strawderman, M. S. Ernstoff, T. J. Smith, E. C. Borden, et R. H. Blum. 1996. « Interferon Alfa-2b Adjuvant Therapy of High-Risk Resected Cutaneous Melanoma: The Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684 ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 14 (1): 7-17. <https://doi.org/10.1200/JCO.1996.14.1.7>.
- Kisielow, Malgorzata, Jan Kisielow, Giuseppina Capoferri-Sollami, et Klaus Karjalainen. 2005. « Expression of Lymphocyte Activation Gene 3 (LAG-3) on B Cells Is Induced by T Cells ». *European Journal of Immunology* 35 (7): 2081-88. <https://doi.org/10.1002/eji.200526090>.
- Kleffel, Sonja, Christian Posch, Steven R. Barthel, Hansgeorg Mueller, Christoph Schlapbach, Emmanuella Guenova, Christopher P. Elco, et al. 2015. « Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth ». *Cell* 162 (6): 1242-56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.052>.
- Klocke, Katrin, Rikard Holmdahl, et Kajsa Wing. 2017. « CTLA-4 Expressed by FOXP3+ Regulatory T Cells Prevents Inflammatory Tissue Attack and Not T-Cell Priming in Arthritis ». *Immunology* 152 (1): 125-37. <https://doi.org/10.1111/imm.12754>.
- Koebel, Catherine M., William Vermi, Jeremy B. Swann, Nadeen Zerafa, Scott J. Rodig, Lloyd J. Old, Mark J. Smyth, et Robert D. Schreiber. 2007. « Adaptive Immunity Maintains Occult Cancer in an Equilibrium State ». *Nature* 450 (7171): 903-7. <https://doi.org/10.1038/nature06309>.
- Kolb, Armin, Jörg Kleeff, Nichole Arnold, Nathalia A. Giese, Thomas Giese, Murray Korc, et Helmut Friess. 2007. « Expression and Differential Signaling of Heregulins in Pancreatic Cancer Cells ». *International Journal of Cancer* 120 (3): 514-23. <https://doi.org/10.1002/ijc.22360>.
- Koller, Kristian Michael, Heath B. Mackley, Henry Wagner, Giampaolo Talamo, Todd Schell, Colette Pameijer, Rogerio Izar Neves, et al. 2016. « Overall survival in patients with metastatic melanoma treated with concurrent ipilimumab and radiotherapy. » *Journal of Clinical Oncology* 34 (15_suppl): 3023-3023. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.3023.
- Koszalka, Patrycja, Monika Gołńska, Marcin Stanisławowski, Aleksandra Urban, Grzegorz Stasiłojć, Marceł Majewski, Piotr Wierzbicki, Andrzej C. Składanowski, et Jacek Bigda. 2015. « CD73 on B16F10 Melanoma Cells in CD73-Deficient Mice Promotes Tumor Growth,

Angiogenesis, Neovascularization, Macrophage Infiltration and Metastasis ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 69 (décembre): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.10.003>.

Kroemer, Guido, Lorenzo Galluzzi, Oliver Kepp, et Laurence Zitvogel. 2013. « Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy ». *Annual Review of Immunology* 31 (1): 51-72. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008>.

Krysko, Dmitri V., Abhishek D. Garg, Agnieszka Kaczmarek, Olga Krysko, Patrizia Agostinis, et Peter Vandenabeele. 2012. « Immunogenic Cell Death and DAMPs in Cancer Therapy ». *Nature Reviews Cancer* 12 (12): 860-75. <https://doi.org/10.1038/nrc3380>.

Künzli, Beat M., Maria-Isabell Bernlochner, Stephan Rath, Samuel Käser, Eva Csizmadia, Keiichi Enjyoji, Peter Cowan, et al. 2011. « Impact of CD39 and Purinergic Signalling on the Growth and Metastasis of Colorectal Cancer ». *Purinergic Signalling* 7 (2): 231-41. <https://doi.org/10.1007/s11302-011-9228-9>.

Ladle, Brian H., Maggie J. Phillips, Colburn Yu, et Christopher J. Gamper. 2017. « Immune Modulatory Effects of Chemotherapy Increase the Effectiveness of Anti-PD1 Immunotherapy in a Poorly Immunogenic Murine Model of Osteosarcoma ». *The Journal of Immunology* 198 (1 Supplement): 204.15-204.15.

Langer, Corey J., Shirish M. Gadgeel, Hossein Borghaei, Vassiliki A. Papadimitrakopoulou, Amita Patnaik, Steven F. Powell, Ryan D. Gentzler, et al. 2016. « Carboplatin and Pemetrexed with or without Pembrolizumab for Advanced, Non-Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer: A Randomised, Phase 2 Cohort of the Open-Label KEYNOTE-021 Study ». *The Lancet Oncology* 17 (11): 1497-1508. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30498-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30498-3).

Lanier, Lewis L. 2008. « Up on the Tightrope: Natural Killer Cell Activation and Inhibition ». *Nature Immunology* 9 (5): 495-502. <https://doi.org/10.1038/ni1581>.

Lapeyre-Prost, A., M. Terme, S. Pernot, A. -L. Pointet, T. Voron, E. Tartour, et J. Taieb. 2017. « Chapter Seven - Immunomodulatory Activity of VEGF in Cancer ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, édité par Lorenzo Galluzzi, 330:295-342. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.09.007>.

Latchman, Y., C. R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, et al. 2001. « PD-L2 Is a Second Ligand for PD-1 and Inhibits T Cell Activation ». *Nature Immunology* 2 (3): 261-68. <https://doi.org/10.1038/85330>.

Lee, Peter P., Cassian Yee, Peter A. Savage, Lawrence Fong, Dirk Brockstedt, Jeffrey S. Weber, Denise Johnson, et al. 1999. « Characterization of Circulating T Cells Specific for Tumor-Associated Antigens in Melanoma Patients ». *Nature Medicine* 5 (6): 677-85. <https://doi.org/10.1038/9525>.

Lee, S. M., D. C. Betticher, et N. Thatcher. 1995. « Melanoma: Chemotherapy ». *British Medical Bulletin* 51 (3): 609-30.

Legat, Amandine, Hélène Maby-El Hajjami, Petra Baumgaertner, Laurène Cagnon, Samia Abed Maillard, Christine Geldhof, Emanuela M. Iancu, et al. 2016. « Vaccination with LAG-3Ig (IMP321) and Peptides Induces Specific CD4 and CD8 T-Cell Responses in Metastatic Melanoma Patients—Report of a Phase I/IIa Clinical Trial ». *Clinical Cancer Research* 22 (6): 1330-40. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1212>.

- Levy, Antonin, Christophe Massard, Jean-Charles Soria, et Eric Deutsch. 2016. « Concurrent Irradiation with the Anti-Programmed Cell Death Ligand-1 Immune Checkpoint Blocker Durvalumab: Single Centre Subset Analysis from a Phase 1/2 Trial ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 68: 156-62. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.09.013>.
- Li, Hui, Xiaoqiang Li, Shuang Liu, Lei Guo, Bo Zhang, Jubo Zhang, et Qinghai Ye. 2017. « Programmed Cell Death-1 (PD-1) Checkpoint Blockade in Combination with a Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Restrains Hepatocellular Carcinoma Growth Induced by Hepatoma Cell-Intrinsic PD-1 ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 66 (6): 1920-33. <https://doi.org/10.1002/hep.29360>.
- Li, Qingsheng, Jamie L. Harden, Charles D. Anderson, et Nejat K. Egilmez. 2016. « Tolerogenic Phenotype of IFN- γ -Induced IDO+ Dendritic Cells Is Maintained via an Autocrine IDO-Kynurenine/AhR-IDO Loop ». *The Journal of Immunology*, juin, 1502615. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502615>.
- Lin, Chiou-Feng, Chih-Ming Lin, Kang-Yun Lee, Szu-Yuan Wu, Po-Hao Feng, Kuan-Yuan Chen, Hsiao-Chi Chuang, et al. 2017. « Escape from IFN- γ -dependent immunosurveillance in tumorigenesis ». *Journal of Biomedical Science* 24 (février). <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0317-0>.
- Lisoni, P., F. Malugani, A. Bonfanti, R. Bucovec, S. Secondino, F. Brivio, A. Ferrari-Bravo, et al. 2001. « Abnormally Enhanced Blood Concentrations of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Metastatic Cancer Patients and Their Relation to Circulating Dendritic Cells, IL-12 and Endothelin-1. » *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 15 (2): 140-44.
- Liu, Hanzhong, Li Liu, Kaifeng Liu, Peyman Bizargity, Wayne W. Hancock, et Gary A. Visner. 2009. « Reduced Cytotoxic Function of Effector CD8+ T Cells Is Responsible for Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Dependent Immune Suppression ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (2): 1022-31. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900408>.
- Loi, S., A. Giobbie-Hurder, A. Gombos, T. Bachelot, R. Hui, G. Curigliano, M. Campone, et al. 2017. « Phase Ib/II Study Evaluating Safety and Efficacy of Pembrolizumab and Trastuzumab in Patients with Trastuzumab-Resistant HER2-Positive Advanced Breast Cancer: Results from the PANACEA Study (IBCSG 45-13/BIG 4-13/KEYNOTE-014) », décembre. <https://orbi.uliege.be/handle/2268/221416>.
- Loi, Sherene, Sandra Pommey, Benjamin Haibe-Kains, Paul A. Beavis, Phillip K. Darcy, Mark J. Smyth, et John Stagg. 2013. « CD73 Promotes Anthracycline Resistance and Poor Prognosis in Triple Negative Breast Cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (27): 11091-96. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222251110>.
- Lokshin, Anna, Tatiana Raskovalova, Xiaojun Huang, Lefteris C. Zacharia, Edwin K. Jackson, et Elieser Gorelik. 2006. « Adenosine-Mediated Inhibition of the Cytotoxic Activity and Cytokine Production by Activated Natural Killer Cells ». *Cancer Research* 66 (15): 7758-65. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0478>.
- Long, Georgina V., Reinhard Dummer, Antoni Ribas, Igor Puzanov, Ari VanderWalde, Robert Hans Ingemar Andtbacka, Olivier Michielin, et al. 2016. « Efficacy analysis of MASTERKEY-265 phase 1b study of talimogene laherparepvec (T-VEC) and pembrolizumab (pembro) for unresectable stage IIIB-IV melanoma. » *Journal of Clinical Oncology* 34 (15_suppl): 9568-9568. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.9568.

- Lotze, Michael T., Alfred E. Chang, Claudia A. Seipp, Colleen Simpson, John T. Vetto, et Steven A. Rosenberg. 1986. « High-Dose Recombinant Interleukin 2 in the Treatment of Patients With Disseminated Cancer: Responses, Treatment-Related Morbidity, and Histologic Findings ». *JAMA* 256 (22): 3117-24. <https://doi.org/10.1001/jama.1986.03380220083027>.
- Lu, Bei, Lixin Sun, Xi Yan, Zhenzhong Ai, et Jinzhi Xu. 2015. « Intratumoral Chemotherapy with Paclitaxel Liposome Combined with Systemic Chemotherapy: A New Method of Neoadjuvant Chemotherapy for Stage III Unresectable Non-Small Cell Lung Cancer ». *Medical Oncology* 32 (1): 345. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0345-5>.
- Lugade, Amit A., James P. Moran, Scott A. Gerber, Robert C. Rose, John G. Frelinger, et Edith M. Lord. 2005. « Local Radiation Therapy of B16 Melanoma Tumors Increases the Generation of Tumor Antigen-Specific Effector Cells That Traffic to the Tumor ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (12): 7516-23.
- Lui, Yuan, et Simon J. Davis. 2018. « LAG-3: A Very Singular Immune Checkpoint ». *Nature Immunology* 19 (12): 1278. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0257-1>.
- Lutsiak, M. E. Christine, Roshanak T. Semnani, Roberto De Pascalis, Syed V. S. Kashmiri, Jeffrey Schlom, et Helen Sabzevari. 2005. « Inhibition of CD4(+)25+ T Regulatory Cell Function Implicated in Enhanced Immune Response by Low-Dose Cyclophosphamide ». *Blood* 105 (7): 2862-68. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2410>.
- Ly, Long V., Marjolein Sluijter, Sjoerd H. van der Burg, Martine J. Jager, et Thorbald van Hall. 2013. « Effective Cooperation of Monoclonal Antibody and Peptide Vaccine for the Treatment of Mouse Melanoma ». *The Journal of Immunology* 190 (1): 489-96. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200135>.
- Lynch, Thomas J., Igor Bondarenko, Alexander Luft, Piotr Serwatowski, Fabrice Barlesi, Raju Chacko, Martin Sebastian, et al. 2012. « Ipilimumab in Combination with Paclitaxel and Carboplatin as First-Line Treatment in Stage IIIB/IV Non-Small-Cell Lung Cancer: Results from a Randomized, Double-Blind, Multicenter Phase II Study ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (17): 2046-54. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.4032>.
- Maçon-Lemaître, Laëtitia, et Frédéric Triebel. 2005. « The Negative Regulatory Function of the Lymphocyte-Activation Gene-3 Co-Receptor (CD223) on Human T Cells ». *Immunology* 115 (2): 170-78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02145.x>.
- Malik, Ruchi, Peter I. Lelkes, et Edna Cukierman. 2015. « Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer ». *Trends in Biotechnology* 33 (4): 230-36. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.01.004>.
- Mandai, Masaki, Junzo Hamanishi, Kaoru Abiko, Noriomi Matsumura, Tsukasa Baba, et Ikuo Konishi. 2016. « Dual Faces of IFN- γ in Cancer Progression: A Role of PD-L1 Induction in the Determination of pro- and Anti-Tumor Immunity ». *Clinical Cancer Research*, janvier, clincanres.0224.2016. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0224>.
- Manzano, José Luís, Laura Layos, Cristina Bugés, María de los Llanos Gil, Laia Vila, Eva Martínez-Balibrea, et Anna Martínez-Cardús. 2016. « Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma ». *Annals of Translational Medicine* 4 (12). <https://doi.org/10.21037/atm.2016.06.07>.

- Marmol, V. del, et F. Beermann. 1996. « Tyrosinase and Related Proteins in Mammalian Pigmentation ». *FEBS Letters* 381 (3): 165-68.
- Mathé, G., J. L. Amiel, L. Schwarzenberg, M. Schneider, A. Cattan, J. R. Schlumberger, M. Hayat, et F. De Vassal. 1969. « Active Immunotherapy for Acute Lymphoblastic Leukaemia ». *Lancet (London, England)* 1 (7597): 697-99.
- Matsuzaki, Junko, Sacha Gnjatic, Paulette Mhaweck-Fauceglia, Amy Beck, Austin Miller, Takemasa Tsuji, Cheryl Eppolito, et al. 2010. « Tumor-Infiltrating NY-ESO-1-Specific CD8+ T Cells Are Negatively Regulated by LAG-3 and PD-1 in Human Ovarian Cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (17): 7875-80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003345107>.
- Medema, J. P., J. de Jong, L. T. Peltenburg, E. M. Verdegaal, A. Gorter, S. A. Bres, K. L. Franken, et al. 2001. « Blockade of the Granzyme B/Perforin Pathway through Overexpression of the Serine Protease Inhibitor PI-9/SPI-6 Constitutes a Mechanism for Immune Escape by Tumors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (20): 11515-20. <https://doi.org/10.1073/pnas.201398198>.
- Mellor, Andrew L., et David H. Munn. 2004. « Ido Expression by Dendritic Cells: Tolerance and Tryptophan Catabolism ». *Nature Reviews Immunology* 4 (10): 762-74. <https://doi.org/10.1038/nri1457>.
- Merwe, P. Anton van der, Dale L. Bodian, Susan Daenke, Peter Linsley, et Simon J. Davis. 1997. « CD80 (B7-1) Binds Both CD28 and CTLA-4 with a Low Affinity and Very Fast Kinetics ». *Journal of Experimental Medicine* 185 (3): 393-404. <https://doi.org/10.1084/jem.185.3.393>.
- Micalizzi, Douglas S., Susan M. Farabaugh, et Heide L. Ford. 2010. « Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression ». *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 15 (2): 117-34. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9178-9>.
- Michaud, Henri-Alexandre, Jean-François Eliaou, Virginie Lafont, Nathalie Bonnefoy, et Laurent Gros. 2014. « Tumor antigen-targeting monoclonal antibody-based immunotherapy: Orchestrating combined strategies for the development of long-term antitumor immunity ». *Oncoimmunology* 3 (9). <https://doi.org/10.4161/21624011.2014.955684>.
- Michaud, Henri-Alexandre, Tiphonie Gomard, Laurent Gros, Kevin Thiolon, Roudaina Nasser, Chantal Jacquet, Javier Hernandez, Marc Piechaczyk, et Mireia Pelegrin. 2010. « A Crucial Role for Infected-Cell/Antibody Immune Complexes in the Enhancement of Endogenous Antiviral Immunity by Short Passive Immunotherapy ». *PLoS Pathogens* 6 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000948>.
- Mingari, Maria Cristina, Gabriella Pietra, et Lorenzo Moretta. 2005. « Human Cytolytic T Lymphocytes Expressing HLA Class-I-Specific Inhibitory Receptors ». *Current Opinion in Immunology* 17 (3): 312-19. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.03.006>.
- Minor, David R., Igor Puzanov, Margaret K. Callahan, Bruce A. Hug, et Axel Hoos. 2015. « Severe gastrointestinal toxicity with administration of trametinib in combination with dabrafenib and ipilimumab ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 28 (5): 611-12. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12383>.

Mittal, Deepak, Arabella Young, Kimberley Stannard, Michelle Yong, Michele W. L. Teng, Bertrand Allard, John Stagg, et Mark J. Smyth. 2014. « Antimetastatic Effects of Blocking PD-1 and the Adenosine A2A Receptor ». *Cancer Research*, juillet. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0957>.

Mohammed, M. Q., et S. Retsas. 2000. « Oxaliplatin Is Active in Vitro against Human Melanoma Cell Lines: Comparison with Cisplatin and Carboplatin ». *Anti-Cancer Drugs* 11 (10): 859-63.

Mondanelli, Giada, Stefano Ugel, Ursula Grohmann, et Vincenzo Bronte. 2017. « The immune regulation in cancer by the amino acid metabolizing enzymes ARG and IDO ». *Current Opinion in Pharmacology, • Cancer • Tribute to Norman Bowery*, 35 (août): 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.05.002>.

Monney, Laurent, Catherine A. Sabatos, Jason L. Gaglia, Akemi Ryu, Hanspeter Waldner, Tatyana Chernova, Stephen Manning, et al. 2002. « Th1-Specific Cell Surface Protein Tim-3 Regulates Macrophage Activation and Severity of an Autoimmune Disease ». *Nature* 415 (6871): 536-41. <https://doi.org/10.1038/415536a>.

Monteiro, Inês, Selena Vigano, Mohamed Faouzi, Isabelle Treilleux, Olivier Michielin, Christine Ménétrier-Caux, Christophe Caux, Pedro Romero, et Laurence de Leval. 2018. « CD73 expression and clinical significance in human metastatic melanoma ». *Oncotarget* 9 (42): 26659-69. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25426>.

Morello, Silvana, Mariaelena Capone, Claudia Sorrentino, Diana Giannarelli, Gabriele Madonna, Domenico Mallardo, Antonio M. Grimaldi, Aldo Pinto, et Paolo Antonio Ascierto. 2017. « Soluble CD73 as biomarker in patients with metastatic melanoma patients treated with nivolumab ». *Journal of Translational Medicine* 15 (décembre). <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1348-8>.

Moynihan, Kelly D., Cary F. Opel, Gregory L. Szeto, Alice Tzeng, Eric F. Zhu, Jesse M. Engreitz, Robert T. Williams, et al. 2016. « Eradication of Large Established Tumors in Mice by Combination Immunotherapy That Engages Innate and Adaptive Immune Responses ». *Nature Medicine* 22 (12): 1402-10. <https://doi.org/10.1038/nm.4200>.

Munn, David H., et Andrew L. Mellor. 2013. « Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses ». *Trends in immunology* 34 (3): 137-43. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.10.001>.

Nasser, Roudaina, Mireia Pelegrin, Henri-Alexandre Michaud, Marc Plays, Marc Piechaczyk, et Laurent Gros. 2010. « Long-Lasting Protective Antiviral Immunity Induced by Passive Immunotherapies Requires both Neutralizing and Effector Functions of the Administered Monoclonal Antibody ». *Journal of Virology* 84 (19): 10169-81. <https://doi.org/10.1128/JVI.00568-10>.

Nasser, Roudaina, Mireia Pelegrin, Marc Plays, Laurent Gros, et Marc Piechaczyk. 2013. « Control of Regulatory T Cells Is Necessary for Vaccine-like Effects of Antiviral Immunotherapy by Monoclonal Antibodies ». *Blood* 121 (7): 1102-11. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-432153>.

Ngiow, Shin Foong, Bianca von Scheidt, Hisaya Akiba, Hideo Yagita, Michele W. L. Teng, et Mark J. Smyth. 2011. « Anti-TIM3 Antibody Promotes T Cell IFN- γ -Mediated Antitumor Immunity and Suppresses Established Tumors ». *Cancer Research*, mars. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0096>.

- Nirschl, Christopher J., et Charles G. Drake. 2013. « Molecular Pathways: Coexpression of Immune Checkpoint Molecules: Signaling Pathways and Implications for Cancer Immunotherapy ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (18): 4917-24. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1972>.
- Obeid, Michel, Antoine Tesniere, François Ghiringhelli, Gian Maria Fimia, Lionel Apetoh, Jean-Luc Perfettini, Maria Castedo, et al. 2007. « Calreticulin Exposure Dictates the Immunogenicity of Cancer Cell Death ». *Nature Medicine* 13 (1): 54-61. <https://doi.org/10.1038/nm1523>.
- O'Donnell, Jake S., Georgina V. Long, Richard A. Scolyer, Michele W. L. Teng, et Mark J. Smyth. 2017. « Resistance to PD1/PDL1 Checkpoint Inhibition ». *Cancer Treatment Reviews* 52 (janvier): 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.11.007>.
- Ogier, Charline, Pierre-Emmanuel Colombo, Corinne Bousquet, Lucile Canterel-Thouennon, Pierre Sicard, Véronique Garambois, Gaëlle Thomas, et al. 2018. « Targeting the NRG1/HER3 Pathway in Tumor Cells and Cancer-Associated Fibroblasts with an Anti-Neuregulin 1 Antibody Inhibits Tumor Growth in Pre-Clinical Models of Pancreatic Cancer ». *Cancer Letters* 432 (septembre): 227-36. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.06.023>.
- Ohta, Akio, Elieser Gorelik, Simon J. Prasad, Franca Ronchese, Dmitriy Lukashev, Michael K. K. Wong, Xiaojun Huang, et al. 2006. « A2A Adenosine Receptor Protects Tumors from Antitumor T Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (35): 13132-37. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605251103>.
- Ohta, Akio, et Michail Sitkovsky. 2014. « Extracellular Adenosine-Mediated Modulation of Regulatory T Cells ». *Frontiers in Immunology* 5: 304. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00304>.
- Olivares, Concepcion, et Francisco Solano. 2009. « New Insights into the Active Site Structure and Catalytic Mechanism of Tyrosinase and Its Related Proteins ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 22 (6): 750-60. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00636.x>.
- Özdemir, Berna C., Tsvetelina Pentcheva-Hoang, Julienne L. Carstens, Xiaofeng Zheng, Chinchia Wu, Tyler Simpson, Hanane Laklai, et al. 2014. « Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Diminished Survival ». *Cancer cell* 25 (6): 719-34. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.005>.
- Pardoll, Drew M. 2012. « The Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy ». *Nature Reviews Cancer* 12 (4): 252-64. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>.
- Park, Jang-June, Ryusuke Omiya, Yumiko Matsumura, Yukimi Sakoda, Atsuo Kuramasu, Mathew M. Augustine, Sheng Yao, et al. 2010. « B7-H1/CD80 Interaction Is Required for the Induction and Maintenance of Peripheral T Cell Tolerance ». *Blood*, janvier, blood-2010-01-265975. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-265975>.
- Park, SaeGwang, Zhujun Jiang, Eric D. Mortenson, Liufu Deng, Olga Radkevich-Brown, Xuanming Yang, Husain Sattar, et al. 2010. « The Therapeutic Effect of Anti-HER2/Neu Antibody Depends on Both Innate and Adaptive Immunity ». *Cancer Cell* 18 (2): 160-70. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.06.014>.
- Parry, Richard V., Jens M. Chemnitz, Kenneth A. Frauwirth, Anthony R. Lanfranco, Inbal Braunstein, Sumire V. Kobayashi, Peter S. Linsley, Craig B. Thompson, et James L. Riley. 2005. « CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms ».

Molecular and Cellular Biology 25 (21): 9543-53. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.21.9543-9553.2005>.

Passarelli, Anna, Francesco Mannavola, Luigia Stefania Stucci, Marco Tucci, et Francesco Silvestris. 2017. « Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape ». *Oncotarget* 8 (62): 106132-42. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22190>.

Patel, Dipa, Rajiv Bassi, Andrea T. Hooper, Haijun Sun, James Huber, Daniel J. Hicklin, et Xiaoqiang Kang. 2008. « Enhanced Suppression of Melanoma Tumor Growth and Metastasis by Combined Therapy with Anti-VEGF Receptor and Anti-TYRP-1/Gp75 Monoclonal Antibodies ». *Anticancer Research* 28 (5A): 2679-86.

Paz-Ares, L., J. Brahmer, M. D. Hellmann, M. Reck, K. O'Byrne, H. Borghaei, W. J. Geese, H. Lu, F. E. Nathan, et S. Ramalingam. 2017. « 144TIPCheckMate 227: A Randomized, Open-Label Phase 3 Trial of Nivolumab, Nivolumab plus Ipilimumab, or Nivolumab plus Chemotherapy versus Chemotherapy in Chemotherapy-Naïve Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) ». *Annals of Oncology* 28 (suppl_2). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx091.064>.

Pearce, Alison, Marion Haas, Rosalie Viney, Sallie-Anne Pearson, Philip Haywood, Chris Brown, et Robyn Ward. 2017. « Incidence and Severity of Self-Reported Chemotherapy Side Effects in Routine Care: A Prospective Cohort Study ». *PLOS ONE* 12 (10): e0184360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184360>.

Penn, I. 1995. « Primary Kidney Tumors before and after Renal Transplantation. » *Transplantation* 59 (4): 480-85.

Petrizzo, Annacarmen, Angela Mauriello, Antonio Luciano, Domenica Rea, Antonio Barbieri, Claudio Arra, Piera Maiolino, et al. 2017. « Inhibition of tumor growth by cancer vaccine combined with metronomic chemotherapy and anti-PD-1 in a pre-clinical setting ». *Oncotarget* 9 (3): 3576-89. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23181>.

Piconese, Silvia, Barbara Valzasina, et Mario P. Colombo. 2008. « OX40 Triggering Blocks Suppression by Regulatory T Cells and Facilitates Tumor Rejection ». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (4): 825-39. <https://doi.org/10.1084/jem.20071341>.

Pitt, Jonathan M., Marie Vétizou, Romain Daillère, María Paula Roberti, Takahiro Yamazaki, Bertrand Routy, Patricia Lepage, et al. 2016. « Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors ». *Immunity* 44 (6): 1255-69. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.06.001>.

Postow, Michael A., Margaret K. Callahan, Christopher A. Barker, Yoshiya Yamada, Jianda Yuan, Shigehisa Kitano, Zhenyu Mu, et al. 2012. « Immunologic Correlates of the Abscopal Effect in a Patient with Melanoma ». *The New England Journal of Medicine* 366 (10): 925-31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1112824>.

Postow, Michael A., Margaret K. Callahan, et Jedd D. Wolchok. 2015. « Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (17): 1974-82. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4358>.

Practitioners, The Royal Australian College of General. s. d. « RACGP - Immunotherapy of Cancer ». Consulté le 22 juin 2018. <https://www.racgp.org.au/afp/2017/april/immunotherapy-of-cancer/>.

- Prasanna, Anish, Mansoor M. Ahmed, Mohammed Mohiuddin, et C. Norman Coleman. 2014. « Exploiting sensitization windows of opportunity in hyper and hypo-fractionated radiation therapy ». *Journal of Thoracic Disease* 6 (4): 287-302. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2014.01.14>.
- Puyraimond-Zemmour, D., et S. Vignot. 2013. « Le métabolisme de la cellule tumorale : l'effet Warburg ». *Oncologie* 15 (9): 435-40. <https://doi.org/10.1007/s10269-013-2318-2>.
- Puzanov, Igor, Mohammed M. Milhem, David Minor, Omid Hamid, Ai Li, Lisa Chen, Michael Chastain, et al. 2016. « Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab in Previously Untreated, Unresectable Stage IIIB-IV Melanoma ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 34 (22): 2619-26. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.1529>.
- Qian, Guoqing, Ning Jiang, Dongsheng Wang, Scott Newman, Sungjin Kim, Zhengjia Chen, Gabriela Garcia, et al. 2015. « Heregulin and HER3 Are Prognostic Biomarkers in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma ». *Cancer* 121 (20): 3600-3611. <https://doi.org/10.1002/cncr.29549>.
- Qureshi, Omar S., Yong Zheng, Kyoko Nakamura, Kesley Attridge, Claire Manzotti, Emily M. Schmidt, Jennifer Baker, et al. 2011. « Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4 ». *Science* 332 (6029): 600-603. <https://doi.org/10.1126/science.1202947>.
- Rajabi, Mehdi, et Shaker A. Mousa. 2017. « The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment ». *Biomedicines* 5 (2): 34. <https://doi.org/10.3390/biomedicines5020034>.
- Rangachari, Manu, Chen Zhu, Kaori Sakuishi, Sheng Xiao, Jozsef Karman, Andrew Chen, Mathieu Angin, et al. 2012. « Bat3 Promotes T Cell Responses and Autoimmunity by Repressing Tim-3–Mediated Cell Death and Exhaustion ». *Nature Medicine* 18 (9): 1394-1400. <https://doi.org/10.1038/nm.2871>.
- Raper, H. S. 1927. « The Tyrosinase-Tyrosine Reaction: Production from Tyrosine of 5: 6-Dihydroxyindole and 5: 6-Dihydroxyindole-2-Carboxylic Acid-the Precursors of Melanin ». *The Biochemical Journal* 21 (1): 89-96.
- Reck, Martin, Alexander Luft, Aleksandra Szczesna, Libor Havel, Sang-We Kim, Wallace Akerley, Maria Catherine Pietanza, et al. 2016. « Phase III Randomized Trial of Ipilimumab Plus Etoposide and Platinum Versus Placebo Plus Etoposide and Platinum in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 34 (31): 3740-48. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.6601>.
- Redmond, William L., Michael J. Gough, Bridget Charbonneau, Timothy L. Ratliff, et Andrew D. Weinberg. 2007. « Defects in the Acquisition of CD8 T Cell Effector Function after Priming with Tumor or Soluble Antigen Can Be Overcome by the Addition of an OX40 Agonist ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (11): 7244-53.
- Redmond, William L., Stefanie N. Linch, et Melissa J. Kasiewicz. 2014. « Combined Targeting of Costimulatory (OX40) and Coinhibitory (CTLA-4) Pathways Elicits Potent Effector T Cells Capable of Driving Robust Antitumor Immunity ». *Cancer Immunology Research* 2 (2): 142-53. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0031-T>.

Redmond, William L., Carl E. Ruby, et Andrew D. Weinberg. 2009. « The Role of OX40-Mediated Co-Stimulation in T-Cell Activation and Survival ». *Critical Reviews in Immunology* 29 (3): 187-201.

Restifo, Nicholas P., Mark J. Smyth, et Alexandra Snyder. 2016. « Acquired Resistance to Immunotherapy and Future Challenges ». *Nature Reviews. Cancer* 16 (2): 121-26. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.2>.

Ribas, Antoni, Marcus Butler, Jose Lutzky, Donald P. Lawrence, Caroline Robert, Wilson Miller, Gerald P. Linette, et al. 2015. « Phase I study combining anti-PD-L1 (MEDI4736) with BRAF (dabrafenib) and/or MEK (trametinib) inhibitors in advanced melanoma. » *Journal of Clinical Oncology* 33 (15_suppl): 3003-3003. https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.3003.

Ribas, Antoni, F. Stephen Hodi, Margaret Callahan, Cyril Konto, et Jedd Wolchok. 2013. « Hepatotoxicity with Combination of Vemurafenib and Ipilimumab ». *The New England Journal of Medicine* 368 (14): 1365-66. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1302338>.

Ribas, Antoni, Richard Kefford, Margaret A. Marshall, Cornelis J.A. Punt, John B. Haanen, Maribel Marmol, Claus Garbe, et al. 2013. « Phase III Randomized Clinical Trial Comparing Tremelimumab With Standard-of-Care Chemotherapy in Patients With Advanced Melanoma ». *Journal of Clinical Oncology* 31 (5): 616-22. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.44.6112>.

Ribatti, D., E. Crivellato, et A. Vacca. 2012. « Inflammation and Antiangiogenesis in Cancer ». *Text. mars* 2012. <https://doi.org/info:doi/10.2174/092986712799320655>.

Ribatti, Domenico. 2017. « The Concept of Immune Surveillance against Tumors: The First Theories ». *Oncotarget* 8 (4). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12739>.

Rittmeyer, Achim, Fabrice Barlesi, Daniel Waterkamp, Keunchil Park, Fortunato Ciardiello, Joachim von Pawel, Shirish M. Gadgeel, et al. 2017. « Atezolizumab versus Docetaxel in Patients with Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer (OAK): A Phase 3, Open-Label, Multicentre Randomised Controlled Trial ». *Lancet (London, England)* 389 (10066): 255-65. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32517-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32517-X).

Rizvi, Naiyer A., Matthew D. Hellmann, Julie R. Brahmer, Rosalyn A. Juergens, Hossein Borghaei, Scott Gettinger, Laura Q. Chow, et al. 2016. « Nivolumab in Combination With Platinum-Based Doublet Chemotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer ». *Journal of Clinical Oncology* 34 (25): 2969-79. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.66.9861>.

Robert, Caroline, Jacob Schachter, Georgina V. Long, Ana Arance, Jean Jacques Grob, Laurent Mortier, Adil Daud, et al. 2015. « Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma ». *New England Journal of Medicine* 372 (26): 2521-32. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503093>.

Robert, Caroline, Luc Thomas, Igor Bondarenko, Steven O'Day, Jeffrey Weber, Claus Garbe, Celeste Lebbe, et al. 2011. « Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma ». *The New England Journal of Medicine* 364 (26): 2517-26. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1104621>.

Robert, Jacques. 2016. « Dual-action combination therapy enhances angiogenesis while reducing tumor growth and spread ». *e-VEGF-IMMUNO-actu* 11 (3): 3-3. <https://doi.org/10.1684/veg.2016.0047>.

- Roger, Anissa, Adeline Finet, Blandine Boru, Alain Beauchet, Jean-Jacques Mazon, Yves Otmeguine, Astrid Blom, et al. 2018. « Efficacy of combined hypo-fractionated radiotherapy and anti-PD-1 monotherapy in difficult-to-treat advanced melanoma patients ». *Oncolimmunology* 7 (7): e1442166. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1442166>.
- Rogers, Paul R, Jianxun Song, Irene Gramaglia, Nigel Killeen, et Michael Croft. 2001. « OX40 Promotes Bcl-xL and Bcl-2 Expression and Is Essential for Long-Term Survival of CD4 T Cells ». *Immunity* 15 (3): 445-55. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00191-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00191-1).
- Rosenberg, S A, M T Lotze, J C Yang, W M Linehan, C Seipp, S Calabro, S E Karp, R M Sherry, S Steinberg, et D E White. 1989. « Combination therapy with interleukin-2 and alpha-interferon for the treatment of patients with advanced cancer. » *Journal of Clinical Oncology* 7 (12): 1863-74. <https://doi.org/10.1200/JCO.1989.7.12.1863>.
- Rosenberg, Steven A. 2014. « IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192 (12): 5451-58. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1490019>.
- Rosenberg, Steven A., James C. Yang, Richard M. Sherry, Udai S. Kammula, Marybeth S. Hughes, Giao Q. Phan, Deborah E. Citrin, et al. 2011. « Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T Cell Transfer Immunotherapy ». *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17 (13): 4550-57. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0116>.
- Rossowska, Joanna, Natalia Anger, Agnieszka Szczygieł, Jagoda Mierzejewska, et Elżbieta Pajtasz-Piasecka. 2018. « Reprogramming the murine colon cancer microenvironment using lentivectors encoding shRNA against IL-10 as a component of a potent DC-based chemoimmunotherapy ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 37 (juin): 126. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0799-y>.
- Roth, Wilfried, et John C. Reed. 2004. « FLIP Protein and TRAIL-Induced Apoptosis ». *Vitamins and Hormones* 67: 189-206. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(04\)67011-7](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(04)67011-7).
- Rudd, Christopher E., Alison Taylor, et Helga Schneider. 2009. « CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction ». *Immunological reviews* 229 (1): 12-26. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00770.x>.
- Ruffell, Brian, et Lisa M. Coussens. 2015. « Macrophages and Therapeutic Resistance in Cancer ». *Cancer Cell* 27 (4): 462-72. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.02.015>.
- Ryu, Rachel, et Kristina E. Ward. 2018. « Atezolizumab for the First-Line Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Current Status and Future Prospects ». *Frontiers in Oncology* 8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00277>.
- Sadej, Rafal, et Andrzej C. Skladanowski. 2012. « Dual, Enzymatic and Non-Enzymatic, Function of Ecto-5'-Nucleotidase (EN, CD73) in Migration and Invasion of A375 Melanoma Cells ». *Acta Biochimica Polonica* 59 (4): 647-52.
- Sadej, Rafal, Jozef Spychala, et Andrzej C. Skladanowski. 2006. « Expression of Ecto-5'-Nucleotidase (EN, CD73) in Cell Lines from Various Stages of Human Melanoma ». *Melanoma Research* 16 (3): 213-22. <https://doi.org/10.1097/01.cmr.0000215030.69823.11>.
- Saris, C. P., P. J. van de Vaart, R. C. Rietbroek, et F. A. Blommaert. 1996. « In Vitro Formation of DNA Adducts by Cisplatin, Lobaplatin and Oxaliplatin in Calf Thymus DNA in Solution and in Cultured Human Cells ». *Carcinogenesis* 17 (12): 2763-69.

- Satoshi, S., H. Yoshino, K. Miyamoto, M. Yonemori, T. Sakaguchi, Y. Osako, H. Enokida, et M. Nakagawa. 2018. « 457 - Targeting HRAS as a potential therapeutic target through RAS inhibitor salirasib in bladder cancer ». *European Urology Supplements*, Abstracts EAU18 – 33rd Annual EAU Congress, 17 (2): e655. [https://doi.org/10.1016/S1569-9056\(18\)31294-6](https://doi.org/10.1016/S1569-9056(18)31294-6).
- Schuler, P. J., Z. Saze, C.-S. Hong, L. Muller, D. G. Gillespie, D. Cheng, M. Harasymczuk, et al. 2014. « Human CD4+ CD39+ Regulatory T Cells Produce Adenosine upon Co-Expression of Surface CD73 or Contact with CD73+ Exosomes or CD73+ Cells ». *Clinical and Experimental Immunology* 177 (2): 531-43. <https://doi.org/10.1111/cei.12354>.
- Seliger, B., U. Wollscheid, F. Momburg, T. Blankenstein, et C. Huber. 2001. « Characterization of the Major Histocompatibility Complex Class I Deficiencies in B16 Melanoma Cells ». *Cancer Research* 61 (3): 1095-99.
- Seremet, Teofila, Simon Planken, Julia K. Schwarze, Yanina Jansen, Laura Vandeweerd, Robbe van den Begin, Ioannis Tsechlidis, Danielle Lienard, Véronique Del Marmol, et Bart Neyns. 2018. « Successful Treatment with Intralesional Talimogene Laherparepvec in Two Patients with Immune Checkpoint Inhibitors Refractory Advanced Melanoma ». *Melanoma Research*, septembre. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000501>.
- Serra, Sara, Alberto L. Horenstein, Tiziana Vaisitti, Davide Brusa, Davide Rossi, Luca Laurenti, Giovanni D'Arena, et al. 2011. « CD73-Generated Extracellular Adenosine in Chronic Lymphocytic Leukemia Creates Local Conditions Counteracting Drug-Induced Cell Death ». *Blood* 118 (23): 6141-52. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374728>.
- Shankaran, V., H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old, et R. D. Schreiber. 2001. « IFN γ and Lymphocytes Prevent Primary Tumour Development and Shape Tumour Immunogenicity ». *Nature* 410 (6832): 1107-11. <https://doi.org/10.1038/35074122>.
- Sharma, Padmanee, Siwen Hu-Lieskovan, Jennifer A. Wargo, et Antoni Ribas. 2017. « Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy ». *Cell* 168 (4): 707-23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017>.
- Sharon, Eilon, David van Dijk, Yael Kalma, Leeat Keren, Ohad Manor, Zohar Yakhini, et Eran Segal. 2014. « Probing the effect of promoters on noise in gene expression using thousands of designed sequences ». *Genome Research* 24 (10): 1698-1706. <https://doi.org/10.1101/gr.168773.113>.
- Shaverdian, Narek, Aaron E Lisberg, Krikor Bornazyan, Darlene Veruttipong, Jonathan W Goldman, Silvia C Formenti, Edward B Garon, et Percy Lee. 2017. « Previous radiotherapy and the clinical activity and toxicity of pembrolizumab in the treatment of non-small-cell lung cancer: a secondary analysis of the KEYNOTE-001 phase 1 trial ». *The Lancet. Oncology* 18 (7): 895-903. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30380-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30380-7).
- Shay, Jerry W., Ying Zou, Eiso Hiyama, et Woodring E. Wright. 2001. « Telomerase and Cancer ». *Human Molecular Genetics* 10 (7): 677-85. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.7.677>.
- Shibuya, Masabumi, et Lena Claesson-Welsh. 2006. « Signal Transduction by VEGF Receptors in Regulation of Angiogenesis and Lymphangiogenesis ». *Experimental Cell Research* 312 (5): 549-60. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.11.012>.
- Shinkai, Yoichi, Gary Rathbun, Kong-Peng Lam, Eugene M. Oltz, Valerie Stewart, Monica Mendelsohn, Jean Charron, et al. 1992. « RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes

owing to inability to initiate V(D)J rearrangement ». *Cell* 68 (5): 855-67. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90029-C](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90029-C).

Sia, Daniela, Clara Alsinet, Pippa Newell, et Augusto Villanueva. 2014. « VEGF Signaling in Cancer Treatment ». *Text. mai* 2014. <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd/2014/00000020/00000017/art00005>.

Sica, Antonio, Tiziana Schioppa, Alberto Mantovani, et Paola Allavena. 2006. « Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy ». *European Journal of Cancer, Cancer and inflammation*, 42 (6): 717-27. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.003>.

Sims, Gary P., Daniel C. Rowe, Svend T. Rietdijk, Ronald Herbst, et Anthony J. Coyle. 2010. « HMGB1 and RAGE in Inflammation and Cancer ». *Annual Review of Immunology* 28 (1): 367-88. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132603>.

Sistigu, Antonella, Takahiro Yamazaki, Erika Vacchelli, Kariman Chaba, David P. Enot, Julien Adam, Ilio Vitale, et al. 2014. « Cancer Cell-Autonomous Contribution of Type I Interferon Signaling to the Efficacy of Chemotherapy ». *Nature Medicine* 20 (11): 1301-9. <https://doi.org/10.1038/nm.3708>.

Sitkovsky, Michail V., Stephen Hatfield, Robert Abbott, Bryan Belikoff, Dmitriy Lukashev, et Akio Ohta. 2014. « Hostile, Hypoxia–A2-Adenosinergic Tumor Biology as the Next Barrier to Overcome for Tumor Immunologists ». *Cancer Immunology Research* 2 (7): 598-605. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0075>.

Slamon, D. J., G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich, et W. L. McGuire. 1987. « Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/Neu Oncogene ». *Science* 235 (4785): 177-82. <https://doi.org/10.1126/science.3798106>.

Slany, Astrid, Andrea Bileck, Besnik Muqaku, et Christopher Gerner. 2015. « Targeting Breast Cancer-Associated Fibroblasts to Improve Anti-Cancer Therapy ». *Breast (Edinburgh, Scotland)* 24 (5): 532-38. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.06.009>.

Slovin, S. F., C. S. Higano, O. Hamid, S. Tejwani, A. Harzstark, J. J. Alumkal, H. I. Scher, et al. 2013. « Ipilimumab Alone or in Combination with Radiotherapy in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Results from an Open-Label, Multicenter Phase I/II Study ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 24 (7): 1813-21. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt107>.

Smyth, Mark J., Shin Foong Ngiow, Antoni Ribas, et Michele W. L. Teng. 2016. « Combination Cancer Immunotherapies Tailored to the Tumour Microenvironment ». *Nature Reviews. Clinical Oncology* 13 (3): 143-58. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.209>.

Smyth, Mark J., Kevin Y. T. Thia, Shayna E. A. Street, Duncan MacGregor, Dale I. Godfrey, et Joseph A. Trapani. 2000. « Perforin-Mediated Cytotoxicity Is Critical for Surveillance of Spontaneous Lymphoma ». *Journal of Experimental Medicine* 192 (5): 755-60. <https://doi.org/10.1084/jem.192.5.755>.

Sokolosky, Jonathan T., Michael Dougan, Jessica R. Ingram, Chia Chi M. Ho, Monique J. Kauke, Steven C. Almo, Hidde L. Ploegh, et K. Christopher Garcia. 2016. « Durable Antitumor Responses to CD47 Blockade Require Adaptive Immune Stimulation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (19): E2646-2654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604268113>.

- Somasundaram, Veena, Debashree Basudhar, Gaurav Bharadwaj, Jae Hong No, Lisa A. Ridnour, Robert Y.S. Cheng, Mayumi Fujita, et al. 2018. « Molecular Mechanisms of Nitric Oxide in Cancer Progression, Signal Transduction, and Metabolism ». *Antioxidants & Redox Signaling*, mars. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7527>.
- Speeckaert, Reinhart, Karim Vermaelen, Nanja van Geel, Philippe Autier, Jo Lambert, Marc Haspeslagh, Mireille van Gele, et al. 2012. « Indoleamine 2,3-Dioxygenase, a New Prognostic Marker in Sentinel Lymph Nodes of Melanoma Patients ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 48 (13): 2004-11. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.09.007>.
- Stagg, John, Paul A. Beavis, Upulie Divisekera, Mira CP Liu, Andreas Moeller, Phillip K. Darcy, et Mark J. Smyth. 2012. « CD73-Deficient Mice Are Resistant to Carcinogenesis. » *Cancer Research*, mars, canres.0420.2012. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0420>.
- Stagg, John, Upulie Divisekera, Helene Duret, Tim Sparwasser, Michele W. L. Teng, Phillip K. Darcy, et Mark J. Smyth. 2011. « CD73-Deficient Mice Have Increased Antitumor Immunity and Are Resistant to Experimental Metastasis ». *Cancer Research*, février. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4246>.
- Stagg, John, Upulie Divisekera, Nicole McLaughlin, Janelle Sharkey, Sandra Pommey, Delphine Denoyer, Karen M. Dwyer, et Mark J. Smyth. 2010. « Anti-CD73 Antibody Therapy Inhibits Breast Tumor Growth and Metastasis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (4): 1547-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908801107>.
- Stutman, O. 1974. « Tumor Development after 3-Methylcholanthrene in Immunologically Deficient Athymic-Nude Mice ». *Science (New York, N.Y.)* 183 (4124): 534-36.
- . 1979. « Chemical Carcinogenesis in Nude Mice: Comparison between Nude Mice from Homozygous Matings and Heterozygous Matings and Effect of Age and Carcinogen Dose ». *Journal of the National Cancer Institute* 62 (2): 353-58.
- Sun, Xiaofeng, Yan Wu, Wenda Gao, Keiichi Enjoji, Eva Csizmadia, Christa E. Müller, Takashi Murakami, et Simon C. Robson. 2010. « CD39/ENTPD1 Expression by CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells Promotes Hepatic Metastatic Tumor Growth in Mice ». *Gastroenterology* 139 (3): 1030-40. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.05.007>.
- Sveinbjørnsson, Baldur, Ketil Andre Camilio, Bengt Erik Haug, et Øystein Rekdal. 2017. « LTX-315: a first-in-class oncolytic peptide that reprograms the tumor microenvironment ». *Future Medicinal Chemistry* 9 (12): 1339-44. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0088>.
- Swann, Jeremy B., Matthew D. Vesely, Anabel Silva, Janelle Sharkey, Shizuo Akira, Robert D. Schreiber, et Mark J. Smyth. 2008. « Demonstration of Inflammation-Induced Cancer and Cancer Immunoediting during Primary Tumorigenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (2): 652-56. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708594105>.
- Swartz, Melody A., Norihiro Iida, Edward W. Roberts, Sabina Sangaletti, Melissa H. Wong, Fiona E. Yull, Lisa M. Coussens, et Yves A. DeClerck. 2012. « Tumor Microenvironment Complexity: Emerging Roles in Cancer Therapy ». *Cancer Research*, mars, canres.0122.2012. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0122>.
- Tadmor, Tamar, Yu Zhang, Hyun-Mi Cho, Eckhard R. Podack, et Joseph D. Rosenblatt. 2011. « The Absence of B Lymphocytes Reduces the Number and Function of T-Regulatory Cells and Enhances the Anti-Tumor Response in a Murine Tumor Model ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 60 (5): 609-19. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-0972-z>.

Tai, T., M. Eisinger, S. Ogata, et K. O. Lloyd. 1983. « Glycoproteins as Differentiation Markers in Human Malignant Melanoma and Melanocytes ». *Cancer Research* 43 (6): 2773-79.

Tammela, Tuomas, et Kari Alitalo. 2010. « Lymphangiogenesis: Molecular Mechanisms and Future Promise ». *Cell* 140 (4): 460-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.045>.

Tang, Chad, James W. Welsh, Patricia de Groot, Erminia Massarelli, Joe Y. Chang, Kenneth R. Hess, Sreyashi Basu, et al. 2017. « Ipilimumab with stereotactic ablative radiation therapy: Phase I results and immunologic correlates from peripheral T-cells ». *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 23 (6): 1388-96. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1432>.

Tang, Dong, Jun Gao, Sen Wang, Nianyuan Ye, Yang Chong, Yuqin Huang, Jie Wang, Bin Li, Wei Yin, et Daorong Wang. 2016. « Cancer-Associated Fibroblasts Promote Angiogenesis in Gastric Cancer through Galectin-1 Expression ». *Tumor Biology* 37 (2): 1889-99. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3942-9>.

Tao, Leilei, Guichun Huang, Haizhu Song, Yitian Chen, et Longbang Chen. 2017. « Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment (Review) ». *Oncology Letters* 14 (3): 2611-20. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6497>.

Taylor, Clare, Dawn Hershman, Nina Shah, Nicole Suci-Foca, Dan P. Petrylak, Robert Taub, Linda Vahdat, et al. 2007. « Augmented HER-2–Specific Immunity during Treatment with Trastuzumab and Chemotherapy ». *Clinical Cancer Research* 13 (17): 5133-43. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0507>.

Tesniere, A, F Schlemmer, V Boige, O Kepp, I Martins, F Ghiringhelli, L Aymeric, et al. 2010. « Immunogenic Death of Colon Cancer Cells Treated with Oxaliplatin ». *Oncogene* 29 (4): 482-91. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.356>.

They, Laetitia, Henri-Alexandre Michaud, Ondine Becquart, Virginie Lafont, Bernard Guillot, Florence Boissière-Michot, Marta Jarlier, et al. 2017. « PD-1 Blockade at the Time of Tumor Escape Potentiates the Immune-Mediated Antitumor Effects of a Melanoma-Targeting Monoclonal Antibody ». *Oncoimmunology* 6 (10): e1353857. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1353857>.

Thompson, John F., Peter Hersey, et Eric Wachter. 2008. « Chemoablation of Metastatic Melanoma Using Intralesional Rose Bengal ». *Melanoma Research* 18 (6): 405-11. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e32831328c7>.

Thomson, T. M., M. J. Mattes, L. Roux, L. J. Old, et K. O. Lloyd. 1985. « Pigmentation-Associated Glycoprotein of Human Melanomas and Melanocytes: Definition with a Mouse Monoclonal Antibody ». *The Journal of Investigative Dermatology* 85 (2): 169-74.

Tomasek, James J., Giulio Gabbiani, Boris Hinz, Christine Chaponnier, et Robert A. Brown. 2002. « Myofibroblasts and Mechano-Regulation of Connective Tissue Remodelling ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 (5): 349-63. <https://doi.org/10.1038/nrm809>.

Topalian, Suzanne L., Charles G. Drake, et Drew M. Pardoll. 2015. « Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy ». *Cancer Cell* 27 (4): 450-61. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.001>.

Topalian, Suzanne L., F. Stephen Hodi, Julie R. Brahmer, Scott N. Gettinger, David C. Smith, David F. McDermott, John D. Powderly, et al. 2012. « Safety, Activity, and Immune Correlates

of Anti-PD-1 Antibody in Cancer ». *The New England journal of medicine* 366 (26): 2443-54. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>.

Torchilin, Vladimir P. 2010. « Passive and Active Drug Targeting: Drug Delivery to Tumors as an Example ». *Handbook of Experimental Pharmacology*, n° 197: 3-53. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3_1.

Triebel, F., S. Jitsukawa, E. Baixeras, S. Roman-Roman, C. Genevee, E. Viegas-Pequignot, et T. Hercend. 1990. « LAG-3, a Novel Lymphocyte Activation Gene Closely Related to CD4 ». *The Journal of Experimental Medicine* 171 (5): 1393-1405.

Trimble, Cornelia L., Matthew P. Morrow, Kimberly A. Kraynyak, Xuefei Shen, Michael Dallas, Jian Yan, Lance Edwards, et al. 2015. « Safety, Efficacy, and Immunogenicity of VGX-3100, a Therapeutic Synthetic DNA Vaccine Targeting Human Papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 Proteins for Cervical Intraepithelial Neoplasia 2/3: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2b Trial ». *Lancet (London, England)* 386 (10008): 2078-88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00239-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00239-1).

Tsai, Miaw-Sheue, Lisa A. Shamon-Taylor, Inderjit Mehmi, Careen K. Tang, et Ruth Lupu. 2003. « Blockage of Heregulin Expression Inhibits Tumorigenicity and Metastasis of Breast Cancer ». *Oncogene* 22 (5): 761-68. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206130>.

Tschopp, J., M. Irmeler, et M. Thome. 1998. « Inhibition of Fas Death Signals by FLIPs. ». *Current Opinion in Immunology* 10 (5): 552-58. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80223-9](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80223-9).

Tseng, S. Y., M. Otsuji, K. Gorski, X. Huang, J. E. Slansky, S. I. Pai, A. Shalabi, T. Shin, D. M. Pardoll, et H. Tsuchiya. 2001. « B7-DC, a New Dendritic Cell Molecule with Potent Costimulatory Properties for T Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 193 (7): 839-46.

Tsui, James M, Catalin Mihalciou, et Fabio L Cury. s. d. « Abscopal Effect in a Stage IV Melanoma Patient who Progressed on Pembrolizumab ». *Cureus* 10 (2). Consulté le 26 août 2018. <https://doi.org/10.7759/cureus.2238>.

Tsushima, Fumihiko, Sheng Yao, Tahiro Shin, Andrew Flies, Sarah Flies, Haiying Xu, Koji Tamada, Drew M. Pardoll, et Lieping Chen. 2007. « Interaction between B7-H1 and PD-1 Determines Initiation and Reversal of T-Cell Anergy ». *Blood* 110 (1): 180-85. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-060087>.

Turcotte, Martin, David Allard, Deepak Mittal, Yacine Bareche, Laurence Buisseret, Vinu Jose, Sandra Pommey, et al. 2017. « CD73 Promotes Resistance to HER2/ErbB2 Antibody Therapy ». *Cancer Research*, janvier, canres.0707.2017. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0707>.

Uotila, P. 1996. « The Role of Cyclic AMP and Oxygen Intermediates in the Inhibition of Cellular Immunity in Cancer ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 43 (1): 1-9.

Uslu, Ugur, Michael Erdmann, Stefan Schliep, Jan Dörrie, Niels Schaff, Gerold Schuler, et Beatrice Schuler-Thurner. 2017. « Sarcoidosis Under Dendritic Cell Vaccination Immunotherapy in Long-Term Responding Patients with Metastatic Melanoma ». *Anticancer Research* 37 (6): 3243-48.

Vacchelli, Erika, Fernando Aranda, Norma Bloy, Aitziber Buqué, Isabelle Cremer, Alexander Eggermont, Wolf Hervé Fridman, et al. 2015. « Trial Watch—Immunostimulation with cytokines in cancer therapy ». *Oncoimmunology* 5 (2). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1115942>.

- Veen, A. H. van der, J. H. de Wilt, A. M. Eggermont, S. T. van Tiel, A. L. Seynhaeve, et T. L. ten Hagen. 2000. « TNF-Alpha Augments Intratumoural Concentrations of Doxorubicin in TNF-Alpha-Based Isolated Limb Perfusion in Rat Sarcoma Models and Enhances Anti-Tumour Effects ». *British Journal of Cancer* 82 (4): 973-80. <https://doi.org/10.1054/bjoc.1999.1027>.
- Vesely, Matthew D., Michael H. Kershaw, Robert D. Schreiber, et Mark J. Smyth. 2011. « Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer ». *Annual Review of Immunology* 29: 235-71. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>.
- Vu, Minh Diem, Xiang Xiao, Wenda Gao, Nicolas Degauque, Ming Chen, Alexander Kroemer, Nigel Killeen, Naoto Ishii, et Xian Chang Li. 2007. « OX40 Costimulation Turns off Foxp3+ Tregs ». *Blood* 110 (7): 2501-10. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-070748>.
- Walker, Lucy S. K. 2013. « Treg and CTLA-4: Two Intertwining Pathways to Immune Tolerance ». *Journal of Autoimmunity* 45 (septembre): 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.06.006>.
- Walunas, Theresa L., Deborah J. Lenschow, Christina Y. Bakker, Peter S. Linsley, Gordon J. Freeman, Jonathan M. Green, Craig B. Thompson, et Jeffrey A. Bluestone. 1994. « CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation ». *Immunity* 1 (5): 405-13. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90071-X](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90071-X).
- Wang, H, S Lee, C Lo Nigro, L Lattanzio, M Merlano, M Monteverde, R Matin, et al. 2012. « NT5E (CD73) is epigenetically regulated in malignant melanoma and associated with metastatic site specificity ». *British Journal of Cancer* 106 (8): 1446-52. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.95>.
- Wang, Li, Karina Pino-Lagos, Victor C. de Vries, Indira Guleria, Mohamed H. Sayegh, et Randolph J. Noelle. 2008. « Programmed Death 1 Ligand Signaling Regulates the Generation of Adaptive Foxp3+CD4+ Regulatory T Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (27): 9331-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710441105>.
- Wang, Long, Jie Fan, Linda F. Thompson, Yi Zhang, Tahiro Shin, Tyler J. Curiel, et Bin Zhang. 2011. « CD73 Has Distinct Roles in Nonhematopoietic and Hematopoietic Cells to Promote Tumor Growth in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (6): 2371-82. <https://doi.org/10.1172/JCI45559>.
- Waterhouse, Paul, Josef M. Penninger, Emma Timms, Andrew Wakeham, Arda Shahinian, Kelvin P. Lee, Craig B. Thompson, Henrik Griesser, et Tak W. Mak. 1995. « Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in Ctl4 ». *Science* 270 (5238): 985-88. <https://doi.org/10.1126/science.270.5238.985>.
- Weber, Jeffrey S., Sandra P. D'Angelo, David Minor, F. Stephen Hodi, Ralf Gutzmer, Bart Neyns, Christoph Hoeller, et al. 2015. « Nivolumab versus Chemotherapy in Patients with Advanced Melanoma Who Progressed after Anti-CTLA-4 Treatment (CheckMate 037): A Randomised, Controlled, Open-Label, Phase 3 Trial ». *The Lancet. Oncology* 16 (4): 375-84. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70076-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70076-8).
- Weide, Benjamin, Dario Neri, et Giuliano Elia. 2017. « Intralesional treatment of metastatic melanoma: a review of therapeutic options ». *Cancer immunology, immunotherapy: CII* 66 (5): 647-56. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1952-0>.

- West, Nathan R., Katy Milne, Pauline T. Truong, Nicol Macpherson, Brad H. Nelson, et Peter H. Watson. 2011. « Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer ». *Breast Cancer Research* 13 (décembre): R126. <https://doi.org/10.1186/bcr3072>.
- Wilson, Timothy R., Jane Fridlyand, Yibing Yan, Elicia Penuel, Luciana Burton, Emily Chan, Jing Peng, et al. 2012. « Widespread Potential for Growth-Factor-Driven Resistance to Anticancer Kinase Inhibitors ». *Nature* 487 (7408): 505-9. <https://doi.org/10.1038/nature11249>.
- Wing, Kajsa, Yasushi Onishi, Paz Prieto-Martin, Tomoyuki Yamaguchi, Makoto Miyara, Zoltan Fehervari, Takashi Nomura, et Shimon Sakaguchi. 2008. « CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function ». *Science (New York, N.Y.)* 322 (5899): 271-75. <https://doi.org/10.1126/science.1160062>.
- Workman, C. J., Y. Wang, K. C. El Kasmi, D. M. Pardoll, P. J. Murray, C. G. Drake, et D. A. A. Vignali. 2009. « LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis ». *The Journal of Immunology* 182 (4): 1885-91. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0800185>.
- Woynarowski, J. M., W. G. Chapman, C. Napier, M. C. Herzig, et P. Juniewicz. 1998. « Sequence- and Region-Specificity of Oxaliplatin Adducts in Naked and Cellular DNA ». *Molecular Pharmacology* 54 (5): 770-77.
- Wu, Annie A, Virginia Drake, Huai-Shiuan Huang, ShihChi Chiu, et Lei Zheng. 2015. « Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells ». *Oncoimmunology* 4 (7). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1016700>.
- Wu, Xian-Rui, Xiao-Sheng He, Yu-Feng Chen, Rui-Xue Yuan, Yang Zeng, Lei Lian, Yi-Feng Zou, Nan Lan, Xiao-Jian Wu, et Ping Lan. 2012. « High Expression of CD73 as a Poor Prognostic Biomarker in Human Colorectal Cancer ». *Journal of Surgical Oncology* 106 (2): 130-37. <https://doi.org/10.1002/jso.23056>.
- Xu, Y., X. Zhou, M. Mei, et Y. Ren. 2017. « Reprograming Carcinoma Associated Fibroblasts by MicroRNAs ». *Text.* juin 2017. <https://doi.org/info:doi/10.2174/1566524018666171205113959>.
- Yamazaki, T., J. M. Pitt, M. Vétizou, A. Marabelle, C. Flores, Ø Rekdal, G. Kroemer, et L. Zitvogel. 2016. « The Oncolytic Peptide LTX-315 Overcomes Resistance of Cancers to Immunotherapy with CTLA4 Checkpoint Blockade ». *Cell Death and Differentiation* 23 (6): 1004-15. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.35>.
- Yan, Yiyi, Anagha Bangalore Kumar, Heidi Finnes, Svetomir N. Markovic, Sean Park, Roxana S. Dronca, et Haidong Dong. 2018. « Combining Immune Checkpoint Inhibitors With Conventional Cancer Therapy ». *Frontiers in Immunology* 9 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01739>.
- Yao, Han, Huanbin Wang, Chushu Li, Jing-Yuan Fang, et Jie Xu. 2018. « Cancer Cell-Intrinsic PD-1 and Implications in Combinatorial Immunotherapy ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01774>.
- Yarchoan, Mark, Burles A. Johnson Iii, Eric R. Lutz, Daniel A. Laheru, et Elizabeth M. Jaffee. 2017. « Targeting Neoantigens to Augment Antitumour Immunity ». *Nature Reviews Cancer* 17 (4): 209-22. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.154>.

- Zeng, Jing, Alfred P. See, Jillian Phallen, Christopher M. Jackson, Zineb Belcaid, Jacob Ruzevick, Nicholas Durham, et al. 2013. « Anti-PD-1 Blockade and Stereotactic Radiation Produce Long-Term Survival in Mice With Intracranial Gliomas ». *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 86 (2): 343-49. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.12.025>.
- Zhang, Yu, Yair Eliav, Seung-Uon Shin, Taylor H. Schreiber, Eckhard R. Podack, Tamar Tadmor, et Joseph D. Rosenblatt. 2013. « B Lymphocyte Inhibition of Anti-Tumor Response Depends on Expansion of Treg but Is Independent of B-Cell IL-10 Secretion ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 62 (1): 87-99. <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1313-6>.
- Zhao, Xiaofei, Feng Kong, Lei Wang, et Han Zhang. 2017. « C-FLIP and the NOXA/Mcl-1 Axis Participate in the Synergistic Effect of Pemetrexed plus Cisplatin in Human Choroidal Melanoma Cells ». *PLOS ONE* 12 (9): e0184135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184135>.
- Zhou, Fan, Lieping Guo, Haotian Shi, Chenhui Lin, et Jian Hou. 2010. « Continuous Administration of Low-Dose Cyclophosphamide and Prednisone as a Salvage Treatment for Multiple Myeloma ». *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* 10 (1): 51-55. <https://doi.org/10.3816/CLML.2010.n.005>.
- Zhou, Qing, Meghan E. Munger, Rachelle G. Veenstra, Brenda J. Weigel, Mitsuomi Hirashima, David H. Munn, William J. Murphy, et al. 2011. « Coexpression of Tim-3 and PD-1 Identifies a CD8+ T-Cell Exhaustion Phenotype in Mice with Disseminated Acute Myelogenous Leukemia ». *Blood* 117 (17): 4501-10. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-310425>.
- Zimmerman, Mark W., Yu Liu, Shuning He, Adam D. Durbin, Brian J. Abraham, John Easton, Ying Shao, et al. 2017. « MYC Drives a Subset of High-Risk Pediatric Neuroblastomas and Is Activated through Mechanisms Including Enhancer Hijacking and Focal Enhancer Amplification ». *Cancer Discovery*, décembre. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0993>.
- Zitvogel, Laurence, et Guido Kroemer. 2012. « Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy ». *Oncoimmunology* 1 (8): 1223-25. <https://doi.org/10.4161/onci.21335>.

Résumé : Le mélanome est la forme la plus agressive des cancers de la peau. Si sa prise en charge à des stades précoces est de bon pronostic, l'espérance de vie des patients chute dramatiquement pour les stades métastatiques. Malgré les avancées thérapeutiques spectaculaires récentes, le problème majeur réside dans la résistance aux traitements et la récurrence et le défi principal est désormais de tendre vers un contrôle efficace et durable. Les anticorps monoclonaux (AcM) ont la capacité de cibler et éliminer spécifiquement la cellule tumorale tout en recrutant des cellules du système immunitaire, permettant de développer et/ou renforcer l'immunité de l'hôte avec le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale de type vaccinale. Dans un modèle de tumeur solide de mélanome murin après greffe sous-cutanée des cellules B16F10, nous avons étudié le potentiel immunomodulateur de l'AcM TA99 qui cible un antigène de surface TYRP-1 surexprimé dans les mélanocytes tumoraux. Nos résultats montrent qu'environ 30% des souris sont protégées sur le long-terme et présentent une réponse immunitaire humorale et cellulaire mémoire. Par ailleurs, l'analyse de l'infiltrat immunitaire chez les souris qui échappent au traitement par l'AcM TA99 et qui développent une tumeur à plus ou moins long terme, montre une surexpression de PD-1 et Tim3 associée à une perte de fonctionnalité des cellules effectrices au sein de la tumeur. Ce même phénotype a été observé sur des biopsies de patients atteints de mélanome métastatique. Nous montrons aussi dans le cadre de ce travail que, le blocage de l'axe PD1/PD-L1 par inoculation d'un AcM anti-PD1 au moment de l'échappement, potentialise la réponse immunitaire anti-tumorale et entraîne une augmentation de la survie. Cependant, l'absence de régression complète suggère la mise en place d'autres voies immunosuppressives. En effet nous avons observé une surexpression des ectonucleotidases CD39 et CD73 dans le microenvironnement tumoral suggérant l'implication de l'adénosine dans la résistance au traitement de l'AcM TA99 plus l' α -PD-1. Ce résultat ouvre des perspectives intéressantes pour le blocage concomitant la voie de l'adénosine et de l'axe PD1/PD-L1. Une autre stratégie a consisté à améliorer les effets immunomodulateurs précoces de l'AcM TA99 en le combinant avec l'oxaliplatine, chimiothérapie favorisant la mort immunogénique. Bien que les combinaisons thérapeutiques testées dans cette étude montrent des effets *in vivo* encourageants avec un délai significatif dans la survie globale, aucune augmentation significative de la réponse anti-tumorale sur le long terme n'a pu être observée, suggérant la mise en place d'autres voies immunosuppressives non redondantes ou des stratégies de combinaisons non adaptées. Une analyse dynamique approfondie, tant phénotypique que fonctionnelle, des différents acteurs cellulaires du microenvironnement tumoral sera une étape clé dans la mise en place de combinaisons pertinentes en association avec l'AcM TA99. Ce travail prend d'autant plus d'intérêt qu'un essai clinique de phase I (IMC-20D7S) utilisant le flinvotumab (équivalent humain de l'AcM TA99) réalisé chez 27 patients atteints de mélanome métastatique, montre des effets cliniques intéressants sans effets secondaires sévères, ouvrant la voie au développement de combinaisons thérapeutiques associées à cet AcM.

Abstract: Melanoma is the most aggressive form of skin cancer. Although early management is of good prognosis, the survival of patients decrease dramatically for metastatic stages. Despite the recent spectacular therapeutic advances, the major problem lies in resistance to treatment and relapse and the main challenge now is to develop an effective and sustainable control. Monoclonal antibodies (mAbs) have the ability to specifically target and eliminate tumor cells while recruiting cells from the immune system, to develop and / or enhance the immunity of the host with the development of a vaccinal immune response. In a solid tumor model of murine melanoma after subcutaneous transplantation of B16F10 cells, we investigated the immunomodulatory effect of TA99 mAb targeting a TYRP-1 surface antigen overexpressed in tumor melanocytes. Our results showed that about 30% of mice are protected in the long term and have an antitumoral humoral and cellular immune response. Moreover, the analysis of the immune infiltrate in mice that escape to the treatment with TA99 mAb and develop a tumor, shows an overexpression of PD-1 and Tim3 associated with a loss of effector cell functions within the tumor. This same phenotype has been observed in biopsies of patients with metastatic melanoma. Thus, blocking the PD-1 / PD-L1 axis by inoculation of an anti-PD1 mAb at the time of tumor escape potentiates the anti-tumor immune response and results in increased survival. However, the absence of complete regression suggests the establishment of other immunosuppressive pathways. Indeed we have observed an overexpression of CD39 and CD73 ectonucleotidases in the tumor microenvironment suggesting the involvement of adenosine in the resistance mechanisms observed and opening interesting perspectives for the concomitant blocking of this pathway and the PD1 / PD-L1 axis. Another strategy has been to improve the early immunomodulatory effects of TA99 mAb by combining it with oxaliplatin, a chemotherapy that promotes immunogenic death. Although the therapeutic combinations tested in this study showed encouraging *in vivo* effects with a significant delay in overall survival, no significant increase in the long-term anti-tumor response was observed, suggesting the establishment of other non-redundant immunosuppressive mechanisms or unsuitable combinations strategies. Both phenotypic and functional analysis of the different cellular actors of the tumor microenvironment will be a key step in the implementation of relevant combinations in association with the TA99 mAb. This work is highlighted by a phase I clinical trial (IMC-20D7S) using flinvotumab (human equivalent of mAb TA99) in 27 patients with metastatic melanoma that shows interesting clinical outcome without severe side effects, opening the way for the development of therapeutic combinations associated with this mAb.