



**HAL**  
open science

# Établissement et caractérisation de modèles précliniques de résistance aux inhibiteurs de points de contrôles immunitaires

Chloé Grasselly

► **To cite this version:**

Chloé Grasselly. Établissement et caractérisation de modèles précliniques de résistance aux inhibiteurs de points de contrôles immunitaires. Cancer. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1256 . tel-02390159

**HAL Id: tel-02390159**

**<https://theses.hal.science/tel-02390159v1>**

Submitted on 2 Dec 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.



N° d'ordre NNT : 2018LYSE1256

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de

**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale ED 340**

**Biologie Moléculaire Intégrative Et Cellulaire**

**Spécialité de doctorat : Biologie**

**Discipline : Cancérologie**

Soutenue publiquement le 14/11/2018, par :

**Chloé GRASSELLY**

---

**ÉTABLISSEMENT ET CARACTÉRISATION DE  
MODÈLES PRÉCLINIQUES DE RÉSISTANCE AUX  
INHIBITEURS DE POINTS DE CONTRÔLES  
IMMUNITAIRES**

---

Devant le jury composé de :

Ghiringhelli, François PU-PH Université de Dijon Rapporteur  
Oudard, Stéphane PU-PH Université de Paris Rapporteur  
Bonney, Nathalie DR Université de Montpellier Examinatrice  
Caramel, Julie CR Université de Lyon Examinatrice  
Moyret-Lalle, Caroline PU Université de Lyon Examinatrice & Présidente

Jordheim, Lars MCF Université de Lyon Directeur de thèse  
Dumontet, Charles PU-PH Université de Lyon Invité

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique  
Vice-président du Conseil d'Administration  
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire  
Vice-président de la Commission Recherche  
Directrice Générale des Services

## **M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID  
M. le Professeur Didier REVEL  
M. le Professeur Philippe CHEVALIER  
M. Fabrice VALLÉE  
Mme Dominique MARCHAND

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard  
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud –  
Charles Mérieux  
Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation  
Département de formation et Centre de Recherche en  
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C.  
BURILLON

Directeur : M. le Professeur D.  
BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C.  
VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M.  
SCHOTT

## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies  
Département Biologie

Département Chimie Biochimie  
Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique  
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et  
Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon  
Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique  
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1  
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F.  
THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S.  
AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G.  
TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN  
HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A.  
MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

## Remerciements

« Être un homme, c'est sentir, en posant une pierre, que l'on contribue à bâtir le monde » (Antoine de Saint-Exupéry) : réaliser son doctorat, c'est participer à la recherche de demain. Or, la mise en œuvre de ce projet est loin d'être un parcours en solitaire, et je n'aurais jamais pu le mener à bien sans le soutien et la bienveillance des personnes qui m'ont encouragées.

En premier lieu, je tiens à remercier le Pr Charles Dumontet, directeur de l'équipe Anticorps Anticancer, qui a su croire en moi et qui m'a donné l'opportunité de mener mon doctorat au sein de son laboratoire. Je remercie également mon directeur de thèse, le Dr Lars Petter Jordheim, pour ses conseils avisés et ses relectures tout au long de mon doctorat.

Je souhaite remercier les membres de mon jury, pour avoir accepté d'évaluer mon travail, Pr Caroline Moyret-Lalle, Dr Julie Caramel, Dr Nathalie Bonnefoy, et spécialement le Pr François Ghiringhelli et le Pr Stéphane Oudard pour avoir eu la gentillesse d'être rapporteurs de ma thèse.

J'ai eu l'immense opportunité de rencontrer des personnes exceptionnelles dans le laboratoire, qui sont aujourd'hui de vrais amis. Merci à Juliette, pour toutes nos discussions, nos fou-rires et nos sorties à Lyon durant ces trois ans. Merci à Anne et à Doriane (Mimi !), pour leur bienveillance et leur soutien quotidien. Merci à Morgane pour sa complicité et son positivisme depuis notre rencontre.

Un chaleureux merci aussi à tous les autres étudiants du labo, pour leur fun et leur bonne humeur (même face à mon côté ronchon !), en particulier David, Octavia, Joyce,

Je tiens également à remercier tous mes amis « hors laboratoire », Jérémy, Gaëlle, Lucile, Constance, Thomas, Anne, pour leur humour, leur accompagnement et pour leurs encouragements tout au long de ma thèse.

Je remercie du fond du cœur ma famille, mon pilier durant ces trois années laborieuses. Merci à mes parents, Jacques et Marie-Laure, pour leur soutien inconditionnel, leur appui de tous les jours, et pour avoir toujours su me remonter le moral dans les moments moins faciles. Merci aussi à mes sœurs, Morgane et

Daphné : Merci à ma famille formidable de m'avoir poussé à dépasser mes limites, et à donner le meilleur de moi.

Enfin, je remercie Nolan (Pipou !), pour sa patience légendaire et sa persévérance, et pour m'avoir toujours encouragé à faire ce qui me plait. Merci d'avoir toujours été présent pour m'aider à franchir cette étape, et vivement la suite !

## Résumé

En raison du manque d'efficacité et de la toxicité des thérapies conventionnelles contre le cancer, la recherche s'est concentrée sur le développement de nouvelles stratégies. Ces efforts ont été à l'origine de l'essor de l'immunothérapie, dont les acteurs les plus récents sont les anticorps monoclonaux ciblant les points de contrôles immunitaires (PCI). Parmi ces inhibiteurs des PCI, on retrouve les anticorps ciblant la protéine de surface « Programmed Cell Death 1 », les anti-PD1, et ceux ciblant son ligand, « Programmed Cell Death Ligand 1 », les anti-PDL-1. Ces anticorps ont démontré une efficacité spectaculaire dans plusieurs types de cancers, et sont aujourd'hui couramment utilisés en clinique comme thérapies dans le mélanome, le cancer du poumon, de la vessie et du rein. Cependant, ces traitements ne profitent pas à tous les patients atteints de cancer, avec en moyenne 60% de résistance innée, et 25% de résistance acquise après une réponse primaire aux anticorps, variable selon le type de tumeur. Les phénomènes impliqués dans la résistance sont à l'heure actuelle peu connus. Ainsi, l'objectif de mon projet de recherche consistait à établir des modèles *in vivo* de résistance acquise aux anti-PD1 et anti-PDL-1. Pour ce faire, nous avons utilisé des tumeurs syngéniques de rein (RENCA), de vessie (MB49 et MBT-2) et de colon (MC38) et des souris immunocompétentes, que nous avons rendues résistantes aux traitements en les soumettant à des séries de réimplantation de tumeurs et de traitements, induisant une pression de sélection jusqu'à l'obtention d'un phénotype résistant. Le succès du blocage de l'axe PD1/ PDL-1 étant fortement lié à l'état du microenvironnement tumoral, nous avons mis en place un protocole d'immunophénotypage. Nous avons ainsi pu observer les cellules au profil « anti-tumoral », telles que les cellules T, les Natural Killer, et les macrophages M1, mais également les cellules ayant une fonction immunosuppressive, telles que les macrophages M2, les MDSC, les Treg. Enfin, certaines études ayant identifié une sur-régulation des PCI inhibiteurs alternatifs dans les cas de résistance acquise à l'anti-PD1, nous avons également observé l'expression de LAG3, TIM3 et TIGIT en plus de l'expression de PD1 et PDL-1. Nous avons ainsi pu déterminer que la résistance semble très fortement dépendante du modèle tumoral, même si nous avons pu identifier une diminution des macrophages M1 anti-tumoraux dans l'ensemble des modèles résistants à l'anti-

PD1, et une augmentation des Treg dans les modèles résistants à l'anti-PDL-1, suggérant un mécanisme commun de résistance propre respectivement à l'anti-PD1 et à l'anti-PDL-1. Suite à l'identification par Zaretsky et al. de gènes impliqués dans la voie interféron dans des cas de résistance acquise de mélanome traité à l'anti-PD1, nous avons également décidé d'étudier le profil moléculaire des tumeurs résistantes. Cela nous a permis d'identifier 5 gènes communs entre les modèles anti-PD1 et anti-PDL-1 résistants, dont SERPINF1 et FCNA qui semblent prometteurs comme cibles à valider.

Enfin, en parallèle de l'établissement et de la caractérisation des modèles de résistance acquise, nous avons testé de nouvelles approches thérapeutiques de potentialisation des anticorps anti-PD1 et anti-PDL-1 en combinaison avec des chimiothérapies de référence pour le cancer étudié. Nous avons ainsi démontré une potentialisation dans les modèles sauvages de cancer du côlon MC38 et de la vessie MB49, aucun effet de la combinaison dans le modèle de cancer du sein métastatique 4T1, et une inhibition de l'effet de l'anti-PDL-1 avec la combinaison dans le modèle de vessie MBT-2. L'immunophénotypage nous a permis de constater ici aussi des différences très importantes entre les modèles tumoraux, au niveau basal et après traitement. En conclusion, même si nos résultats restent à valider chez les patients, nous avons démontré que différentes modifications cellulaires et moléculaires pouvaient être impliquées dans la résistance aux anti-PD1 et anti-PDL-1, et que la résistance pouvait dans certains types tumoraux être contournée en combinant ces anticorps aux chimiothérapies standards.

Mots clés : PD1 – PDL-1 – Résistance acquise – modèles précliniques – immunophénotypage - combinaisons

## Abstract

### **Establishment and characterization of preclinical models of resistance to immune checkpoint inhibitors**

Because of the limited efficacy and the toxicity of conventional therapies to fight cancer, researchers focused on the new strategies. These efforts lead to the emergence of immunotherapies, whose most recent actors are the monoclonal antibodies targeting immune checkpoint (ICP). Among those ICP inhibitors, we found

antibodies targeting the surface protein « Programmed Cell Death 1 », called anti-PD1, and those targeting its ligand, « Programmed Cell Death Ligand 1 », called anti-PDL-1. Those antibodies shown a great efficacy in a wide diversity of cancers, and are currently used for clinical practice in the case of melanoma, lung cancer, bladder cancer and renal cell carcinoma. However, those treatments don't benefit to all tumor bearing patients, with a mean of 60% of innate resistance, and 25% of acquired resistance following a primary response, variable according to tumor type. Phenomena involved in resistance are currently poorly described. In this context, the aim of my project was to establish in vivo preclinical models of acquired resistance to anti-PD1 and anti-PDL-1. To do that, we used syngeneic renal cancer (RENCA), bladder cancer (MB49 and MBT-2), and colorectal cancer (MC38), and immunocompetent mice, that we have made resistant by serial reimplantations of tumors pieces and serial treatments, inducing a selection pressure until we obtained a resistant phenotype. The efficiency of PD1/PDL-1 axis blocking is strongly linked to the microenvironment composition, as a result we realized an immunophenotyping protocol. We observed anti-tumor cells as T cells, Natural Killer cells, and M1 macrophages, but also cells harboring immunosuppressive functions, as M2 macrophages, MDSC, and Treg. Moreover, some studies have identified an upregulation of alternatives ICP in the context of acquired resistance to anti-PD1, so we also observed the expression of LAG3, TIM3 and TIGIT besides PD1 and PDL-1 expression. We shown that resistance is strongly dependant to the tumor model, even if we identified a decrease of anti-tumor M1 macrophages in models resistant to anti-PD1, and an increase of Treg in models resistant to anti-PDL-1, suggesting a common mechanism of resistance specific to respectively anti-PD1 and anti-PDL-1. Following Zaretsky and al. identification of genes involved in interferon pathway in the case of acquired resistance to anti-PD1 in melanoma, we decided to study the molecular profile of resistant tumors. We identified 5 common genes differently modulated between anti-PD1 and anti-PDL-1 resistant models, including SERPINF1 and FCNA which seems to be promising as targets to validate.

Lastly, in parallel to establishment and characterization of preclinical models of acquired resistance, we tested new therapeutical approaches of anti-PD1 and anti-PDL-1 potentiation in combination with reference chemotherapies. We shown a synergy in wild-type colorectal and bladder cancers (MC38 and MB49), no effect of the combination in metastatic breast cancer 4T1, and an inhibition of anti-PDL-1

effect in bladder cancer MBT-2. Immunphenotyping of tumors allowed us to observe here also high differences between tumor models, both at baseline and after treatments initiation. To conclude, even if our results need a validation with patients samples, we demonstrated that different cellular and molecular modifications could be involved in resistance to anti-PD1 and anti-PDL-1, and that resistance could be bypass with chemotherapy combination, according to tumor type.

Key words : PD1 – PDL-1 – Acquired resistance – preclinical models – immunophenotyping - combinations

**Discipline** : Cancérologie

**Intitulé et l'adresse de l'unité ou du laboratoire où la thèse a été préparée :**

Equipe Anticorps anticancer, CRCL

INSERM U1052, CNRS 5286

Faculté Rockefeller, 8 avenue Rockefeller, 4ème étage

69008 Lyon, France

## Table des matières

Résumé .....	5
Abstract .....	6
Liste des abbreviations .....	11
Liste des Figures .....	12
Liste des Tableaux .....	12
CHAPITRE I – INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	13
I. Incidence du cancer en 2017 .....	13
II. Caractéristiques de l'immunologie du cancer.....	14
1. Notion d'immunosurveillance et d'immunoédition .....	14
1. Principe d'immunosurveillance .....	15
2. Introduction du mécanisme d'immunoédition .....	15
La phase d'élimination .....	15
La phase d'équilibre.....	16
La phase d'échappement.....	17
2. Le microenvironnement tumoral .....	18
3. Les protagonistes du système immunitaire.....	19
1. Les acteurs de l'immunité innée .....	20
Les cellules dendritiques .....	20
Les Lymphocytes Natural Killer .....	21
Les macrophages .....	22
Les neutrophiles, basophiles et éosinophiles.....	24
2. Les acteurs de l'immunité adaptative .....	24
Les lymphocytes B.....	25
Les lymphocytes T.....	26
Les lymphocytes T auxiliaires.....	27
Les cellules T régulatrices .....	29
Les cellules T cytotoxiques.....	30
Les cellules suppressives dérivées de cellules myéloïdes .....	32
4. Détermination de la valeur pronostique de l'infiltration des différentes populations immunitaires dans la tumeur.....	33
III. Mobiliser les défenses immunitaires : essor de l'immunothérapie .....	37
1. Les modulateurs biologiques .....	38
2. Les thérapies ciblées .....	39
3. Les ADC : Antibody-Drug Conjugate .....	41

4.	Les bispécifiques .....	42
5.	La thérapie de cellules adoptives.....	43
6.	Les points de contrôles immunitaires.....	45
	Description de l'interaction PD-1/PDL-1 .....	49
	Les anticorps anti-PD-1 et anti-PDL-1 .....	51
	Toxicité des anticorps anti-PD1 et anti-PDL-1 .....	56
IV.	Etude de biomarqueurs prédictifs de la réponse à l'inhibition de la voie PD1/PDL-1 .....	57
1.	Valeur prédictive de l'expression de PDL-1 .....	57
2.	Valeur prédictive de IDO.....	58
3.	Valeur prédictive de la charge mutationnelle .....	59
4.	Valeur prédictive de l'examen du système immunitaire de l'hôte.....	60
5.	Valeur prédictive du microbiote de l'hôte .....	61
V.	Les résistances aux anti-PD1 et anti-PDL-1 .....	62
1.	Résistances innées et acquises.....	63
1.	Insuffisance de production de cellules T anti-tumorales .....	63
	Influence des néo-antigènes.....	63
	Importance des voies de signalisations oncogéniques .....	65
2.	Insuffisance de la fonction anti-tumorale des cellules T .....	66
	Impact des mutations de la voie interféron .....	67
	Importance de l'expression du PDL-1.....	69
	Expression de points de contrôles immunitaires alternatifs .....	69
	Impact des cellules immunosuppressives.....	69
3.	Production insuffisante de lymphocytes T mémoires.....	70
2.	Les futurs traitements pour contourner la résistance .....	71
VI.	Modèles précliniques d'étude de la résistance aux anti-PD1 et anti-PDL-1....	74
	CHAPITRE II. RÉSULTATS – ÉTUDES DE COMBINAISONS DE CHIMIOTHÉRAPIES AVEC LES INHIBITEURS ANTI-PD1 ET ANTI-PDL-1 .....	76
	CHAPITRE III. RÉSULTATS – ÉTABLISSEMENT ET CARACTÉRISATION DE MODÈLES RÉSISTANTS IN VIVO .....	117
	Discussion .....	163
	Conclusion.....	174
	Références .....	176

## Liste des abbreviations

BCR	B Cell Receptor
B2M	Béta-2 Microglobuline
bsAb	Bispecific Antibody
CPNPC	Cancer du Poumon Non à Petites Cellules
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CAR T	Chimeric Antigen Receptor T-cells
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CXCR2	C-X-C chemokine receptor type 2
CXCL12	C-X-C motif chemokine 12
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
DC	Dendritic Cell
FDA	Food and Drug Administration
HAMA	Human Anti Murine Antibody
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
ICOS	Inducible T-cell COStimulator
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygénase
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IPRES	Innate PD-1 Resistance
JAK1 / JAK2	Janus Kinas 1 / 2
LAG3	Lymphocyte-Activation Gene 3
M1/M2	Macrophages 1 / 2
mAb	Monoclonal Antibody
MDSC	Myeloid Deriverd Suppressor Cells
NK	Natural Killer
PD1	Programmed death 1
PDL1/ PDL2	Programmed death ligand 1 / 2
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumours
ROR	Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor
TAM	Tumor Associated Macrophages
TCM	Lymphocyte T de Mémoire Centrale
TEM	Lymphocyte T Mémoire Effecteur
TGFb	Transforming Growth Factor beta
Th	T helper
TIGIT	T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIL	Tumor Infiltrating Lymphocyte
TIM3	T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3
TLR	Toll like Receptor
TMB	Tumor Mutational Burden
TNF	Tumor Necrosis Factor
Treg	T régulateur

## Liste des Figures

Figure 1 - Schéma récapitulatif de l'immunoédition. ....	18
Figure 2 - Caractéristiques de macrophages de types M1 et M2. ....	22
Figure 3 – Différentiation des lymphocytes B. ....	25
Figure 4 - Activation des lymphocytes T CD4 en 3 signaux distincts.....	28
Figure 5 – Récapitulatif des différentes immunothérapies.....	45
Figure 6 - Liste non exhaustive des points de contrôles immunitaires activateurs ou inhibiteurs .....	46
Figure 7 - Historique (non exhaustif) de la découverte des points de contrôle immunitaire (1909 - 2016).....	48
Figure 8 - Les 5 mécanismes principaux avancés dans l'hypothèse d'inhibition des lymphocytes T par PD1 .....	50
Figure 9 - Résultats des essais cliniques avec l'anti-PD1 et l'anti-PDL-1 en France	55
Figure 10 - Schéma simplifié de la voie de signalisation JAK1/JAK2. ....	67
Figure 11 - Schéma simplifié de l'implication de $\beta$ 2M dans la présentation antigénique.....	68
Figure 12 – Résumé des stratégies de combinaisons thérapeutiques pour lutter contre la résistance aux inhibiteurs des points de contrôle immunitaires .....	74
Figure 13 - Exemple d'hétérogénéité intra-groupe lors d'un traitement aux inhibiteurs de PCI.....	164
Figure 14 – Représentation schématique de l'effet des chimiothérapies en combinaisons aux inhibiteurs de points de contrôles immunitaires et limites de l'étude .....	165
Figure 15 - Représentation schématique du nombre de modèles sélectionnés jusqu'à l'initiation de la résistance.....	167

## Liste des Tableaux

Tableau 1 – Anticorps monoclonaux approuvés par la FDA dans le traitement du cancer (hors inhibiteurs des points de contrôles immunitaires) .....	41
Tableau 2 - Synthèse des différentes caractéristiques des anticorps monoclonaux nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab et durvalumab .....	54

## CHAPITRE I – INTRODUCTION GÉNÉRALE

### I. Incidence du cancer en 2017

En 2017, 400 000 nouveaux cas de cancers ont été détectés en France : 214 000 hommes et 186 000 femmes. Les organes le plus fréquemment concernés sont le poumon et le colon, ainsi que la prostate chez l'homme et le sein chez la femme. On estime à 150 000 le nombre de décès par cancer en 2017, touchant 84 000 hommes et 66 000 femmes<sup>1</sup>. Le cancer du poumon est par ailleurs en train de devenir la première cause de mortalité du cancer chez la femme<sup>2</sup>.

Les efforts de recherche sur les traitements sont aujourd'hui à l'origine de nombreux progrès, dont la guérison d'environ 1 cancer sur 2 pour les nouveaux cas annuels recensés<sup>3</sup>. Malgré les progrès importants accomplis dans le domaine des traitements médicamenteux, les traitements locaux tels que la chirurgie et la radiothérapie jouent encore aujourd'hui un rôle majeur dans l'obtention de guérisons. Néanmoins en situation de maladie disséminée seuls les traitements systémiques peuvent permettre d'envisager une approche curative.

Les premiers traitements anti-cancéreux avaient pour objectif de cibler directement la tumeur, en empêchant une multiplication rapide des cellules. Néanmoins, ces agents chimio-thérapeutiques agissent sur toutes les cellules en division de l'organisme, et pas uniquement les cellules cancéreuses, et sont par conséquent nocifs pour les cellules saines.

Partant de ce constat, de nouvelles approches ont permis l'émergence des thérapies ciblées, qui agissent sur la croissance tumorale et sur les métastases, en ciblant spécifiquement certaines molécules impliquées dans le développement et la propagation du cancer.

Enfin, la dernière révolution en terme de prise en charge des patients atteints d'un cancer repose sur la stimulation du système immunitaire pour empêcher la progression tumorale, et constitue l'immunothérapie anti-cancéreuse. Il s'agit d'une

révolution nouvelle, mais issue d'un concept ancien, qui a suscité un fort enthousiasme au cours du XXe siècle, généralement suivis d'importantes désillusions. En effet, les quelques immunothérapies efficaces ont souvent été accompagnées d'une très forte toxicité, comme les thérapies de types interféron ou interleukine 2.

Depuis un peu plus de 15 ans, et grâce aux observations de R. Shreiber et al. dans des modèles de souris immunocompétentes, l'existence d'une immunité anti-cancéreuse a été démontrée. A la suite de cette découverte, l'identification des points de contrôles inhibiteurs, en particulier PD-1 et PDL-1, et la réalisation d'anticorps spécifiques de ces antigènes, ont permis à l'immunothérapie de se hisser au rang des traitements les plus prometteurs dans la thérapie du cancer.

Malheureusement, l'efficacité des inhibiteurs des points de contrôles immunitaire tels que les anti-PD-1 et anti-PDL-1 ne se retrouve que chez une minorité de patients (environ 25 – 33%). Une large proportion de patients est donc résistante à ces traitements, de façon innée ou acquise. Il est crucial aujourd'hui de comprendre les acteurs fondamentaux de l'immunologie du cancer, d'identifier les mécanismes de résistances et de trouver de nouvelles voies de combinaisons thérapeutiques afin d'accroître l'efficacité des immunothérapies.

## II. Caractéristiques de l'immunologie du cancer

La cellule tumorale est en interaction avec le stroma (composé notamment des fibroblastes, de l'endothélium) et avec les cellules immunitaires. Les cellules immunitaires sont également en interaction régulière avec d'autres cellules immunitaires. Comprendre l'ensemble de ces interactions complexes est fondamental pour développer de nouvelles thérapies, mais aussi pour comprendre les mécanismes de progression tumorale, et l'échec du système tumoral à la contrôler<sup>4</sup>.

### 1. Notion d'immunosurveillance et d'immunoédition

## 1. Principe d'immunosurveillance

L'oncogénèse et le développement tumoral reposent sur des processus complexes, à l'heure actuelle décrits en 6 points fondamentaux: l'autosuffisance vis-à-vis des signaux de croissance, la résistance aux signaux inhibiteurs de la croissance, l'aptitude à éviter l'apoptose, l'immortalisation, la capacité à induire l'angiogénèse, et la faculté à envahir les tissus et à franchir les membranes basales<sup>5,6</sup>. Plus récemment, 4 autres mécanismes se sont ajoutés à cette liste, dont l'échappement de la cellule tumorale au contrôle du système immunitaire, qui a été considéré comme 7<sup>ème</sup> caractéristique essentielle des cellules cancéreuses<sup>7,8</sup>.

Le système immunitaire joue un rôle primordial dans la prévention de l'oncogénèse. Trois mécanismes fondamentaux ont été mis en avant : en premier lieu, la protection contre les infections virales, et donc contre la formation de cancers viro-induits. En effet, parmi l'ensemble des cancers répertoriés dans le monde, 20% seraient associés à une infection virale, avec comme virus impliqués le plus fréquemment l'hépatite, les papillomavirus et le virus Epstein-Barr<sup>9</sup>. Deuxièmement, l'immunité défend des processus d'inflammation liés aux agents pathogènes encourageant l'oncogénèse. Enfin, le dernier mécanisme décrit comprend l'élimination directe des cellules tumorales par ce système immunitaire, grâce à la détection des cellules dysplasique ou cancéreuses, puis leur destruction avant le développement tumoral<sup>6</sup>.

## 2. Introduction du mécanisme d'immunoédition

Malgré l'existence d'un dispositif perfectionné d'immunosurveillance anti-tumorale, certaines cellules tumorales échappent à cette surveillance : c'est ce que Robert Schreiber<sup>4</sup> a décrit sous le terme « d'immunoédition ». Cette théorie, qui aboutit à la disparition spécifique de cellules immunitaires réactives contre la tumeur, comprend trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement<sup>6</sup> (Figure 1).

### *La phase d'élimination*

La première phase de l'immunoédition est la reconnaissance des cellules cancéreuses par le système immunitaire, menant à leur destruction. Cette élimination fait intervenir des mécanismes immunitaires innés et adaptatifs. Ces différentes populations cellulaires seront détaillées dans la partie « les protagonistes du système immunitaire ».

Dans cette phase, le système immunitaire s'active suite à la reconnaissance des cellules à croissance anormale et des anomalies du stroma. Le remaniement du stroma induit la sécrétion de molécules proinflammatoires, et de cytokines. Les cellules présentatrices d'antigène (CPA), en majorité des DC, vont alors phagocyter les fragments de cellules tumorales (corps apoptotiques ou nécrotiques), sur le site de l'inflammation. Ces cellules vont ensuite migrer vers les ganglions drainants, afin de recruter et de déclencher la réponse lymphocytaire T. Par ailleurs, la présence de lymphocytes T dans la tumeur et en périphérie est considérée comme un facteur de pronostic positif chez les patients<sup>10</sup>. Les CPA ont donc également un rôle primordial pour activer ces lymphocytes T (Figure 1A).

Néanmoins, certaines sous-populations tumorales peuvent échapper à cette phase d'élimination. C'est alors que la phase d'équilibre se crée, durant laquelle les cellules immunitaires vont maîtriser la croissance tumorale.

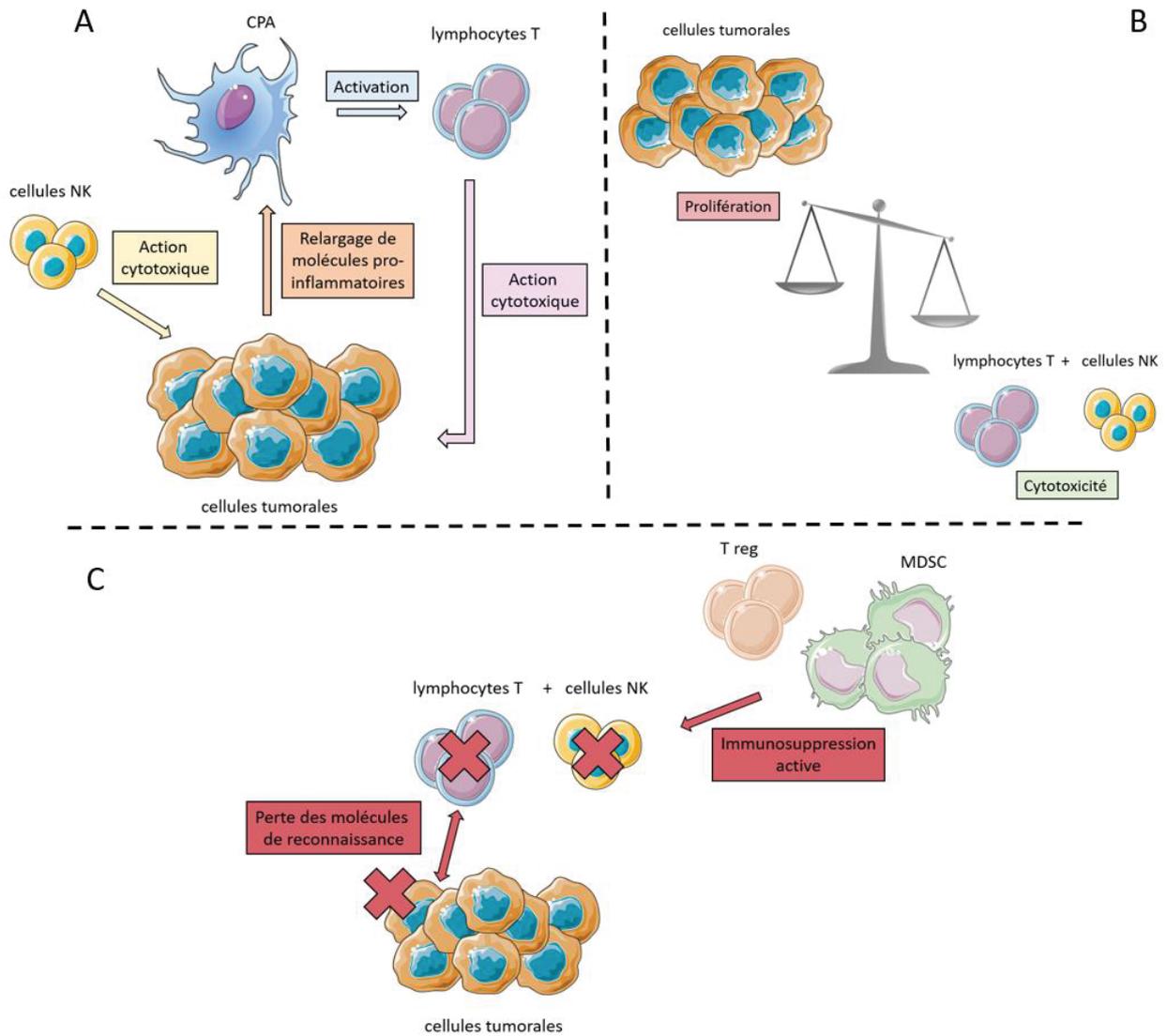
### *La phase d'équilibre*

Durant cette seconde phase, un équilibre va se mettre en place entre le système immunitaire et la tumeur, dans lequel les cellules immunitaires vont contrôler la croissance tumorale, en éliminant les cellules tumorales mais sans pouvoir réaliser une éradication complète des celles-ci (Figure 1B). La population tumorale est alors très hétérogène, et certaines cellules ont acquis la capacité d'échapper à la réponse immunitaire.

La phase d'équilibre pourrait être la période la plus longue de l'immunoédition, jusqu'à ce que certaines cellules acquièrent la capacité de maîtriser la réponse immunitaire et échappent à la surveillance du système immunitaire.

### *La phase d'échappement*

Cette troisième et dernière phase correspond à l'échappement de la cellule tumorale à l'immunosurveillance. Deux phénomènes ont été mis en lumière pour expliquer cette étape : l'immunosélection ou l'immunosuppression. L'immunosélection est décrite comme étant un mécanisme d'échappement dans lequel la cellule tumorale ne va plus être reconnue par le système immunitaire adaptatif, à cause de certaines modifications des antigènes tumoraux<sup>11</sup> ou d'autres jouant un rôle dans la reconnaissance par le système immunitaire, par exemple la perte du CMH de classe 1<sup>12</sup>. L'autre processus identifié comme étant à l'origine de la phase d'échappement est l'immunosuppression, c'est-à-dire la suppression de la réponse immunitaire directe ou via le recrutement de cellules immunosuppressives<sup>13</sup>. L'une des hypothèses à l'origine de ce bouleversement du système immunitaire impliquerait l'inhibition de la maturation des cellules dendritiques, qui tendraient alors vers un profil d'immunosuppression plutôt que vers une activité d'immunostimulation, en favorisant par exemple la différenciation des T-reg<sup>14</sup> (Figure 1C).



**Figure 1 - Schéma récapitulatif de l'immunoédition.**

Fig 1A : Phase d'élimination. Les cellules de l'immunité innée telles que les cellules NK (Natural Killer) vont agir sur les cellules tumorales, qui vont libérer des cytokines, et qui vont activer les CPA (Cellules Présentatrices d'Antigènes), qui vont à leur tour activer les lymphocyte T. Ces lymphocytes T vont ensuite réaliser leur activité cytotoxique pour éliminer les cellules tumorales. Fig1B : Phase d'équilibre. Mise en place d'un équilibre dynamique entre les cellules immunitaires et les cellules tumorales : il s'agit de la phase la plus longue de l'immunoédition. Fig1C. Phase d'échappement. La cellule tumorale va échapper à la vigilance du système immunitaire. 2 mécanismes ont été identifiés pour expliquer cet échappement : 1) la suppression des cellules immunitaires par les cellules immunosuppressives comme les cellules T régulatrices (Treg) ou les Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) : l'immunosuppression; 2) la non-reconnaissance de la cellule tumorale par le système immunitaire, notamment par la perte des molécules de reconnaissance : l'immunosélection.

## 2. Le microenvironnement tumoral

La phase d'échappement des cellules tumorales, décrite ci-dessus, constitue une des conséquences importantes de l'échec du système immunitaire à contrôler le développement de la tumeur. Cependant, une autre raison majeure réside dans le rôle du microenvironnement de la tumeur.

Les cellules tumorales sont entourées par la matrice extra-cellulaire et les cellules stromales<sup>15</sup>. La tumeur est une structure complexe, et organisée, dont les composants fondamentaux sont les cellules tumorales, les fibroblastes, les cellules neuroendocrines, les cellules adipeuses, les cellules immunitaires, les cellules endothéliales sanguines et lymphatiques, et la matrice extracellulaire<sup>15</sup>.

Les fibroblastes associés à la tumeur peuvent affecter le rôle des cellules immunitaires, à travers la sécrétion de différentes cytokines ou protéines<sup>16</sup>. A titre d'exemple, la production de cytokines de type IL-10 ou TGF $\beta$  favorise l'immunosuppression, à travers l'activation des lymphocytes T régulateurs (Treg) qui vont être recrutées sur le site de la tumeur sous l'influence de chimiokines telles que CXCL12<sup>15,17</sup>.

D'autres cellules immunosuppressives sont actives dans le microenvironnement de la tumeur capables d'inhiber la réponse immunitaire, telles que les cellules myéloïdes dont les macrophages de type 2.

Afin de mieux comprendre l'impact du microenvironnement tumoral dans la progression de la tumeur, il est indispensable de comprendre les différents acteurs du système immunitaire.

### **3. Les protagonistes du système immunitaire**

La fonction principale du système immunitaire est de veiller à l'homéostasie des tissus, de protéger contre l'invasion et l'infection de pathogènes, et d'éliminer les cellules endommagées.

Le système immunitaire mammifère est composé de multiples types cellulaires, qui interagissent entre eux ou avec d'autres cellules non-immunitaires, formant un

réseau complexe et dynamique pour lutter contre les pathogènes étrangers tout en veillant à maintenir une tolérance aux antigènes du soi.

On distingue les cellules de l'immunité innée (réponse rapide et non spécifique : reconnaissance de motifs de danger de type DAMPs, comme par exemple la présence d'ADN dans le milieu) ou adaptative (réponse lente, et spécifique de l'antigène)<sup>18,19</sup>.

## 1. Les acteurs de l'immunité innée

La première ligne de défense du système immunitaire est représentée par les cellules de l'immunité innée. Parmi ces cellules, on retrouve les cellules dendritiques, les Natural Killer (NK), les macrophages, ainsi que les polynucléaires (neutrophiles, basophiles et éosinophiles).

### *Les cellules dendritiques*

Les cellules dendritiques (dendritic cells, DC) sont essentielles à la fois au niveau du système inné et acquis. Il existe différents sous types de DC, dont les DC conventionnels, les DC plasmocytes et les DC dérivés de monocytes. Ces cellules possèdent des caractéristiques propres qui en font d'excellentes présentatrices d'antigènes. Par exemple, leurs dendrites leur permettent de « scanner » le tissu environnant.

Les DC expriment également un répertoire varié de récepteurs, ce qui leur confère une forte reconnaissance des signaux de danger. D'autres récepteurs complémentaires viennent également s'ajouter à la liste, favorisant l'endocytose de complexes immuns (comme le C3b, vecteur de phagocytose, ou CD11b, molécule d'adhésion), des molécules de présentation d'antigènes (dont CMH-I et CMH-II) et des molécules d'adhésion intracellulaire qui facilitent l'interaction et l'activation des lymphocytes (molécules de type ICAM). Les DC sont également capables d'augmenter l'activité des cellules NK.<sup>20</sup>

Dans le cas d'un cancer, la présence de DC infiltrant la tumeur a été reliée à une augmentation de la survie des patients et à une diminution du nombre de métastases dans certains types de cancers<sup>21</sup>. Néanmoins, il est important de modérer cette information. En effet, les DC activés favorisent bien l'immunité anti-tumorale, mais les DC immatures ont été décrit comme inducteur de tolérance<sup>22</sup>.

### *Les Lymphocytes Natural Killer*

Les cellules NK sont des lymphocytes effecteurs du système immunitaire innée, engagés dans plusieurs interactions cellulaires avec les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules T et les cellules endothéliales<sup>23</sup>.

Ces cellules sont des lymphocytes présentant des capacités cytotoxiques spontanées dont l'activation est indépendante de la présentation d'antigène par une CPA, et ont une capacité à produire des cytokines effectrices, dont le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ <sup>24,25</sup>. Elles sont activées en particulier par l'IL-2 et l'IL-15<sup>26</sup>.

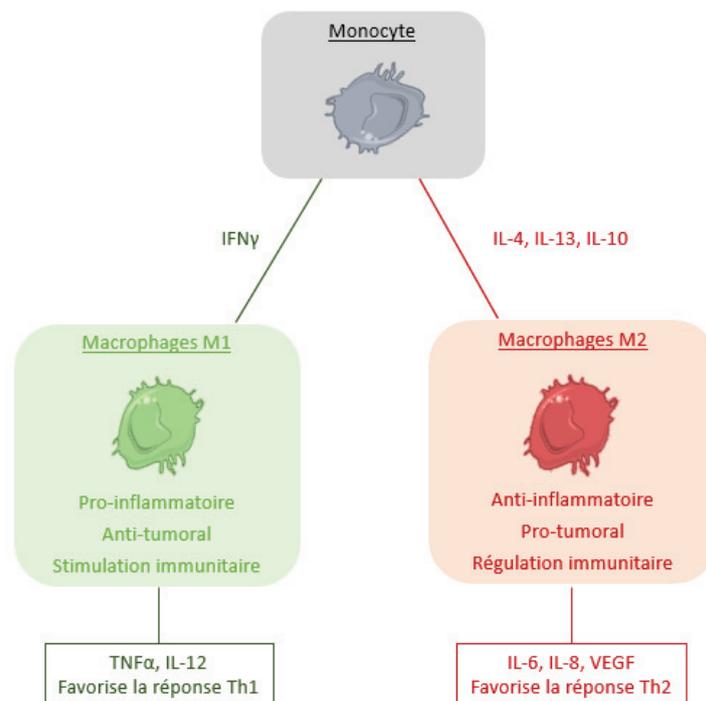
Ces « cellules tueuses », lorsqu'elles sont activées, détectent la présence de ligands du Toll-like Receptor (TLR). Les TLR font partie des PRR (Pattern Recognition Receptor), qui reconnaissent les motifs de danger ou les motifs associés aux pathogènes. Cette détection entraîne l'inflammation et l'activation de la réponse immunitaire<sup>27</sup>. Les NK ont également une bonne capacité à reconnaître les cellules du soi, par le biais de l'expression de CMH-I. Lorsque le CMH-I est présent sur la cellule en interaction avec la cellule NK, ce qui est le cas pour la plupart des cellules « saines », la cellule NK n'exercera pas d'activité cytotoxique. En revanche, si le CMH-I est absent la cellule NK peut exercer son action cytotoxique<sup>23</sup>. En plus du CMH-I, l'activation des NK dépend également d'un équilibre entre les signaux inhibiteurs et activateurs perçus<sup>28</sup>.

En terme de répartition, les cellules NK représentent une minorité des lymphocytes, avec par exemple 2% dans une rate de souris, 10% dans les poumons de souris et de 2 à 18% dans le sang périphérique humain<sup>29</sup>. Cette sous-population de lymphocytes est identifiable chez l'homme à travers l'expression de CD56 et CD27<sup>30</sup>. Dans les modèles murins, il s'agit du NK1.1 (autrement nommé CD161)<sup>31</sup> pour le

modèle de souris de fond génétique C57Bl/6, et du NKp46 dans le cas de souris de fond génétique BALB/c<sup>32</sup>.

### *Les macrophages*

Les macrophages jouent un rôle majeur dans la défense de l'hôte, grâce à leur capacité phagocytaire envers les parasites et les microbes ainsi que les cellules anormales et les corps apoptotiques. Ces cellules mononuclées ont d'abord été décrites comme étant des régulateurs de l'activation des lymphocytes, en intervenant dans le processus d'activation des lymphocytes B et T<sup>33</sup>. Plus récemment, les macrophages ont été définis comme pouvant changer de fonction, selon le microenvironnement local, pouvant ainsi avoir un rôle protecteur ou pathogène dans les tissus<sup>34</sup>. Généralement, on distingue deux sous-populations de macrophages : les macrophages classiques de type 1 (M1), ayant une fonction de défense de l'hôte envers les éléments étrangers, et un rôle dans l'immunité anti-tumorale ; et les macrophages alternatifs de type 2 (M2) qui sont en revanche des médiateurs de l'activité anti-inflammatoire, et sont donc considérés comme immunosuppresseifs (Figure 2).



**Figure 2 - Caractéristiques de macrophages de types M1 et M2.**

*Un monocyte peut se différencier en macrophage de type M1 en présence d'IFN $\gamma$ , ou en macrophage de type M2 en présence d'IL-4, IL-13 et IL-10. Les M1 vont avoir un rôle globalement anti-tumoral, en favorisant la réponse Th1 et en sécrétant des cytokines anti-tumorales de type TNF $\alpha$ . Les M2 vont avoir un rôle opposé, favorisant la progression tumorale, notamment via la sécrétion de VEGF (« Vascular endothelial growth factor ») et des cytokines IL-6 et IL-8.*

Dans le contexte du cancer, les M1 sont capables de participer à la destruction de la cellule tumorale, et de jouer un rôle antagoniste vis à vis des cellules immunosuppressives du microenvironnement. Ce sous-type de macrophages amplifie également la réponse anti-tumorale Th1, qui met en jeu l'activation des lymphocytes T cytotoxiques. En revanche, les M2 ont un phénotype immunosuppresseur, et de nombreuses études mettent en évidence la contribution des macrophages dans la progression tumorale, dans différents modèles tumoraux. Une augmentation du nombre de macrophages associés à la tumeur (TAM), ainsi que de cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC) et de monocytes immatures a ainsi été largement associée à un mauvais pronostic clinique<sup>35</sup>.

Les macrophages peuvent être recrutés puis activés suite à la production de différentes cytokines comme l'IL-4, l'IL-10 et l'IFN $\gamma$ . En particulier, l'IFN $\gamma$  a une action cruciale pour inverser les caractéristiques pro-tumorales et immunosuppressives des TAM, et peut être envisagé comme une option thérapeutique pour rétablir un microenvironnement tumoral plus protecteur de la réponse immunitaire<sup>36</sup>. Ainsi, l'utilisation de l'IFN $\gamma$  en première ligne de traitement dans le cancer ovarien a permis une augmentation de la survie sans progression<sup>37</sup>. En 2017, une étude a démontré une synergie de l'IFN $\gamma$  avec l'anticorps monoclonal anti-erbB2 dans le cancer du sein<sup>38</sup>. Néanmoins, les effets de l'IFN $\gamma$  semblent être dépendants du type de tumeur et du protocole d'étude. En effet, son utilisation n'a apporté aucun bénéfice dans le carcinome rénal métastatique, ou dans le cancer du colon<sup>39,40</sup>.

En pratique, de nombreux marqueurs permettent d'identifier les macrophages chez l'homme. Par exemple, les macrophages infiltrant les tissus pendant un processus inflammatoire sont identifiés par le CD14, CD68, le F4/80 et l'EMR1 (« Epidermal growth factor module-containing mucin-like receptor 1 »).<sup>41</sup> Dans les modèles murins, plusieurs marquages peuvent également être utilisés afin de discriminer les

macrophages M1/M2, dont classiquement CD68+ pour les M1 et CD206+ pour les M2<sup>42</sup>.

### *Les neutrophiles, basophiles et éosinophiles*

Les neutrophiles, éosinophiles et basophiles sont des cellules myéloïdes, granulocytaires, produites durant l'hématopoïèse. Chacune de ces cellules possède une structure et une fonction particulière dans l'organisme<sup>43,44</sup>.

Les neutrophiles interviennent de façon importante dans les phénomènes inflammatoires, et de façon majoritaire en comparaison aux autres leucocytes. Leur fonction de phagocytose est dépendante de protéines distinctes telles que le CD11b ou le CD18<sup>45,46</sup>.

Les cellules éosinophiles défendent l'hôte des parasites et sont impliquées dans les réactions d'hypersensibilité via leur activité cytotoxique. Cette cytotoxicité est possible par l'intermédiaire des granules contenant des protéines basiques et cationiques<sup>47</sup>.

Enfin, les basophiles produisent certaines cytokines, induisant une inflammation allergique. Ces cellules ont une forte affinité pour les immunoglobulines de type E, et sécrètent de l'héparine et de l'histamine après activation. Lors de l'interaction de leurs récepteurs avec les IgE produites par les plasmocytes et lors d'un premier contact avec un antigène, les basophiles libèrent le contenu de leurs granules via l'exocytose<sup>48</sup>.

## **2. Les acteurs de l'immunité adaptative**

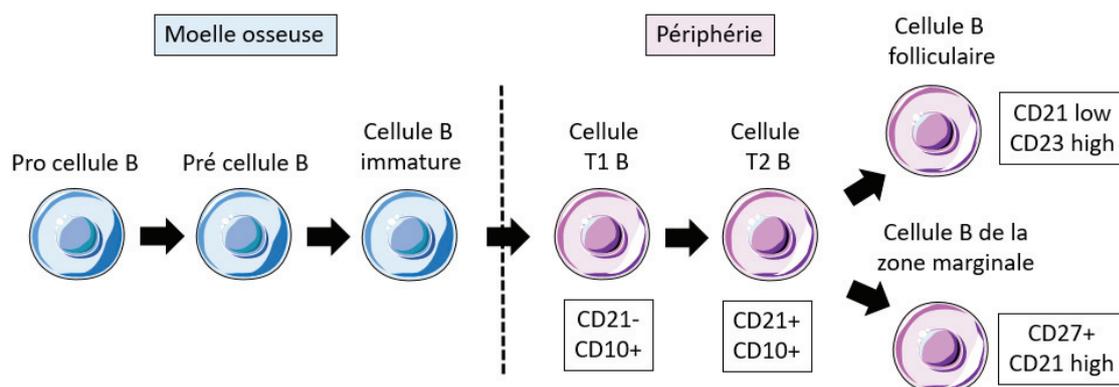
Le système immunitaire adaptatif est impliqué dans la reconnaissance d'agents du « non-soi » par le système immunitaire inné. Le système immunitaire adaptatif est impliqué dans la reconnaissance spécifique d'antigènes exprimés par des pathogènes ou des cellules de l'organismes et est activé suite à la reconnaissance spécifique de ces antigènes présentés par des CPA. Il est également caractérisé par la mise en place d'une mémoire immunologique capable de se réactiver rapidement en cas de nouvelle rencontre avec l'antigène. Plus exactement, lorsqu'il est activé, le système immunitaire adaptatif permet une amplification de la réponse, et engendre

deux phénomènes de défense : une réponse de populations cytotoxiques ou de production d'anticorps immédiatement actifs, et une réponse mémoire. Cette dernière va permettre une élimination beaucoup plus rapide du même antigène lors d'une deuxième rencontre.

Les principaux acteurs de cette immunité adaptative sont les lymphocytes T (pour thymus), qui jouent un rôle primordial dans l'immunité à médiation cellulaire, et les lymphocytes B (pour Bourse de Fabricius), impliqués dans l'immunité à médiation humorale<sup>49</sup>.

### Les lymphocytes B

Chez l'homme, les lymphocytes B atteignent leur maturité dans les ganglions, passant par plusieurs stades de transition : durant la phase de migration de la moelle osseuse et jusqu'à leur sortie, en tant que lymphocytes B immatures ; en périphérie, ils sont considérés comme des T1 B, puis transitant du stade T1B vers la cellule T2B (Figure 3). Les lymphocytes T2B vont ensuite soit devenir des cellules B folliculaires (ayant un phénotype  $CD21^{low}$   $CD23^{high}$ ), ou des cellules B de la zone marginale (ayant un phénotype  $CD27+$   $CD21^{high}$ ), et ils sont alors considérés comme des lymphocytes B matures<sup>50-53</sup>.



**Figure 3 – Différenciation des lymphocytes B.**

*Les cellules B immatures issues de la moelle osseuse vont atteindre leur maturité dans le ganglion, en passant par différents stades de maturation, pour finalement devenir des lymphocytes B folliculaires ou marginaux.*

L'activation de ces lymphocytes B se réalise ensuite dans les organes lymphoïdes secondaires, dans les ganglions lymphatiques. Les lymphocytes B folliculaires vont avoir une activation dépendante des cellules T, par l'intermédiaire d'une liaison avec

le ligand CD40L présent sur le lymphocyte T, et du récepteur CD40 présent à la surface du lymphocyte B<sup>54</sup>, tandis que les lymphocytes B de la zone marginale vont préférentiellement avoir une activation indépendante des cellules T.

Lors d'une activation de type mémoire, la cellule B mémoire pour un antigène donné va capter cet antigène via le récepteur BCR (pour « B-Cell Receptor »), le dégrader et le présenter aux cellules T en formant un complexe avec le CMH-II. La cellule T le plus souvent reconnaît ce complexe à travers le TCR. La cellule B activée va ensuite générer davantage de cellules plasmocytaires et de lymphocytes B mémoires spécifiques de l'antigène<sup>55,56</sup>.

De nombreux marqueurs de surface permettent la reconnaissance des lymphocytes B, et à différents stades de leur maturation, dont le CD19 qui est un marqueur de la lignée B entière, ou encore le CD20 qui est exprimé sur toutes les cellules B hors pro-B<sup>57</sup>.

### *Les lymphocytes T*

Les lymphocytes T sont produits dans la moelle osseuse et finissent leur maturation dans le thymus. Un rôle important des lymphocytes T est de cibler de façon spécifique les cellules infectées par un pathogène ou les cellules anormales présentant des signaux de stress ou des molécules du soi modifiées, comme des protéines mutées dans les cellules cancéreuses. Afin de permettre cette reconnaissance, tous les lymphocytes T présentent un récepteur appelé TCR, pour « T cell receptor ». Chaque lymphocyte T exprime ainsi un TCR, qui est spécifique d'un épitope particulier et de quelques variants de cet épitope. L'ensemble des TCRs exprimés par l'ensemble des lymphocytes T constitue le « répertoire TCR », qui a la capacité de reconnaître une très large variété d'épitopes dérivés d'antigènes. On estime que chez un être humain adulte, le répertoire en périphérie (après la sortie du thymus) est d'environ 25 millions de TCRs. Le répertoire potentiel (avant les étapes de sélection dans le thymus) est d'environ  $10^{15}$  (1 million de milliard de TCR différents). Ce répertoire est en renouvellement et en évolution permanente tout au long de la vie d'un individu.

Le TCR est un hétérodimère transmembranaire composé de deux chaînes polypeptidiques (majoritairement  $\alpha$  et  $\beta$ ), et est associé au complexe de signalisation

CD3 qui transduit le signal perçu par le TCR. D'autres protéines membranaires sont également indispensables au fonctionnement des lymphocytes T, comme les immunoglobulines, les récepteurs de cytokines, ou d'autres protéines de différenciation de type CD45<sup>48</sup>.

Il existe deux populations de lymphocytes T conventionnels, les CD4 et les CD8. Chacun se divise ensuite en plusieurs sous-populations, définies par des fonctions. On retrouve ainsi principalement les lymphocytes T auxiliaires, les lymphocytes T régulateurs et les lymphocytes T cytotoxiques.<sup>58</sup>

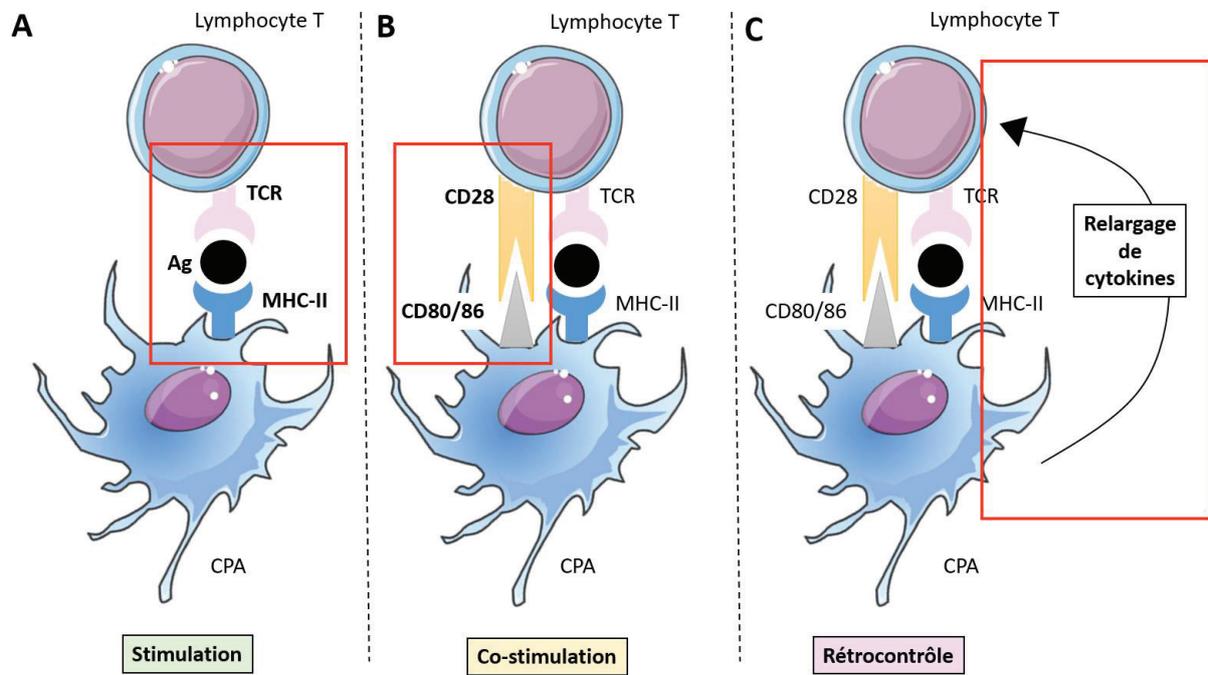
### Les lymphocytes T auxiliaires

Les lymphocytes T auxiliaires (T helper ou Th) sont les sous-populations issues de la différenciation de lymphocytes T CD4 suite à leur activation. Ils sont répartis en plusieurs sous-populations, principalement les Th1, Th2, Th17 et les T régulateurs induits, en fonction des cytokines qu'ils produisent et de leurs fonctions. Néanmoins, ces cellules ont en commun les particularités suivantes :

- Ce sont des stimulateurs de la prolifération des lymphocytes B
- Elles expriment le CD4 à leur surface
- Elles reconnaissent les antigènes étrangers complexés au CMH-II sur les cellules B, les macrophages ou tout autre CPA
- Elles contribuent à l'activité effectrice des lymphocytes T dans l'immunité à médiation cellulaire<sup>48</sup>.

Si la stimulation des cellules T CD4 se réalise via l'interaction entre le TCR et le complexe antigène/CMH-II de la CPA (signal 1), un signal 2 de co-stimulation est nécessaire pour leur prolifération et différenciation. Le principal récepteur de co-stimulation est le CD28, exprimé à la surface des cellules T naïves. Les ligands de CD28, le CD80 (B7-1) et le CD86 (B7-2), sont présents sur la CPA et vont être régulés en fonction de l'activation de la CPA. D'autres co-stimulateurs peuvent être présents à la surface de la cellule T CD4, comme l'Inducible CO-Stimulator (ICOS), ou des membres de la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNF) comme OX-40 ou CD27, dont les ligands sont présents sur la CPA<sup>59</sup>.

La CPA va ensuite sécréter de nombreuses cytokines, créant une boucle de rétrocontrôle positif (signal 3), à travers laquelle la différenciation et la réponse des lymphocytes T vont être augmentées (Figure 4)<sup>59</sup>.



**Figure 4 - Activation des lymphocytes T CD4 en 3 signaux distincts.**

Fig 2A. Signal 1 : la stimulation du lymphocyte T est rendue possible via l'interaction du TCR (« T Cell Receptor ») avec le CMH-II (« Complexe majeur d'histocompatibilité de Classe II ») sur la CPA (Cellule Présentatrice d'Antigène). Fig 2B. Signal 2 : un signal de co-stimulation est nécessaire pour la prolifération et la différenciation du lymphocyte T. Cette costimulation nécessite l'interaction du CD28 présent sur le lymphocyte avec le CD80 ou CD86 présent sur la CPA. Fig 2C. Signal 3 : Afin de permettre la polarisation des lymphocytes, la CPA va produire des cytokines qui vont se fixer sur les récepteurs exprimés sur les cellules T.

Les différents sous-groupes de T helper ont des fonctions, et des cytokines de différenciation propres :

Les Th1 : L'IL-12 et l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) sont les principaux moteurs de la cascade de signalisation développant les cellules de type Th1. Certains facteurs de transcription coordonnent également la différenciation des cellules Th1, dont majoritairement le T-box transcription factor (T-bet). Les cellules Th1 sont ensuite impliquées dans l'élimination des pathogènes intracellulaires, et sont associées à l'autoimmunité spécifique de l'organe. Leur activité met en jeu la sécrétion de l'IFN $\gamma$ , la lymphotoxine  $\alpha$  (Lfa) et l'IL-2<sup>59</sup>.

Les Th2 : La différenciation des cellules Th2 implique l'IL-4 et l'IL-2. Le facteur de transcription Th2 est GATA3. Le rôle des Th2 consiste principalement à éliminer les parasites extracellulaires. Les Th2 sont également responsables de plusieurs dérèglements tels que l'asthme ou autre maladie allergique<sup>60</sup>.

Les Th17 : Les cytokines impliquées dans la différenciation vers un phénotype Th17 sont l'IL-6, IL-21, IL-23 et TGF- $\beta$ . Le phénomène de différenciation peut être séparé en trois étapes : l'étape de différenciation induite par TGF- $\beta$  et IL-6, l'étape d'amplification médiée par IL-21, et l'étape de stabilisation par l'IL-23. Le TGF- $\beta$  a un rôle fondamental dans la différenciation des Th17. En effet, une forte concentration de TGF- $\beta$  peut mener au développement de cellules T régulatrices, tandis qu'à faible concentration et en présence d'IL-6, TGF- $\beta$  va booster la production d'IL-21 et d'IL-23 et provoquer la différenciation des Th17. Pour le développement des Th17, les facteurs de transcription impliqués sont nombreux : les récepteurs de l'acide rétinoïque  $\alpha$  et  $\gamma$  (ROR $\alpha$  et ROR $\gamma$ ) étant les principaux acteurs. En termes de fonction, les cellules Th17 vont avoir une action contre les bactéries et champignons extracellulaires. Elles sont également très fortement impliquées dans les maladies auto-immunes.<sup>59</sup>

D'autres sous-populations, moins fréquentes ou moins bien explorées à ce jour, ont également été décrites, telles que les Th9. Les Th9 auraient un rôle dans la parasitologie et l'allergie, et ont été décrites récemment comme ayant des capacités anti-tumorales, via la sécrétion d'IL9<sup>61</sup>.

### Les cellules T régulatrices

Contrairement aux cellules auxiliaires précédemment décrites, les cellules T régulatrices ont une fonction de suppression des autres lymphocytes T. On distingue deux catégories : les Treg naturels (nTreg), et les Treg induits (iTreg). Dans le premier cas, Les nTreg sont produites par le thymus avec la protéine « forkhead box P3 » (FOXP3) déjà exprimée, tandis que dans le second cas, les iTreg, se différencient suite à un premier contact avec l'antigène dans les organes lymphoïdes périphériques et acquièrent alors un de phénotype CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> <sup>59,62,63</sup>.

Les Treg jouent un rôle majeur dans le maintien de la tolérance aux antigènes du soi et du non-soi. Ils régulent la réponse immunitaire après l'élimination d'un pathogène,

afin d'empêcher une forte réaction auto-immune. Les principales cytokines impliquées dans la fonction des Treg sont l'IL-10, l'IL-35 et le TGF $\beta$ . L'IL-10 est un inhibiteur d'autres cytokines, qui a la capacité de supprimer l'inflammation. En partenariat avec le TGF $\beta$ , ils peuvent inhiber la fabrication d'IgE et ainsi diminuer l'inflammation allergique<sup>63</sup>.

En conclusion, les cellules Treg sont donc indispensables au maintien de l'homéostasie immunitaire.

### Les cellules T cytotoxiques

Pendant une infection, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs vont reconnaître un antigène par l'intermédiaire de la CPA, via l'interaction spécifique du TCR avec le complexe CMH-I/antigène, dans les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques ou la rate. Lorsque l'interaction est mise en place, une « synapse immunologique » est alors créée, permettant l'activation de trois voies de signalisation, semblables aux cas d'activation des lymphocytes T CD4 : la stimulation antigénique (signal 1), la co-stimulation (signal 2) (Figure 4). Le signal 3 est indépendant de la synapse immune, et requiert les cytokines inflammatoires de l'environnement. L'ensemble de ces trois éléments est crucial pour provoquer une réponse effectrice performante et la production de cellules mémoires<sup>64</sup>.

Signal 1 : Lors de la stimulation antigénique, le complexe TCR/CD3 s'associe avec la molécule co-réceptrice de surface CD8, et l'ensemble se lie au CMH-I de la CPA, donnant lieu à un contact stable et efficace. Cependant, plusieurs éléments peuvent venir perturber cette interaction, dont la quantité d'antigènes présents : en effet, l'étendue de l'expansion des lymphocytes T effecteurs serait dépendante de la quantité d'antigène présentée par les CPA<sup>64</sup>. En second lieu, l'affinité du TCR avec le complexe CMH-I/antigène, même si elle n'est pas limitante, provoquerait un meilleur maintien de la prolifération<sup>65</sup>. Enfin, la durée de l'interaction serait également un facteur important de la stimulation antigénique<sup>64</sup>.

Néanmoins, bien que le signal 1 soit fondamental pour l'activation des lymphocytes T CD8, seul, il ne permet ni le gain de la fonction effectrice, ni une amplification suffisamment persistante : c'est ici qu'intervient le signal 2 de co-stimulation.

Signal 2 : Les lymphocytes T CD8 présentent différents types de récepteurs à leur surface : certains vont avoir une fonction inhibitrice, d'autres une fonction de stimulation. Ces récepteurs vont ainsi moduler leur activation. Parmi les co-stimulateurs les plus connus, à l'instar des lymphocytes T CD4, on retrouve le CD28 et ses ligands CD80/ CD86, ainsi que les récepteurs de la famille des TNF<sup>64</sup>.

Signal 3 : En plus des signaux 1 et 2, la présence de certaines cytokines dans le milieu environnant s'avère nécessaire à la prolifération et la différenciation terminale des lymphocytes T CD8. Les principales cytokines impliquées dans ce signal 3 sont l'IL-12, l'IFN- $\gamma$  et l'IL-2<sup>66</sup>.

À la suite de l'activation des trois signaux, les lymphocytes vont alors rentrer dans une phase d'expansion clonale et acquérir leur fonction effectrice. Ils vont pouvoir en premier lieu migrer vers le site de l'infection, en subissant notamment des modifications de surface leur permettant de quitter les organes lymphoïdes secondaires<sup>64</sup>. Puis la reconnaissance des cellules à éliminer (toujours grâce à l'interaction TCR et CMH-II/ antigène) va déclencher leur capacité de cytotoxicité et de production de cytokines.

La cytotoxicité des lymphocytes effecteurs peut se réaliser par l'intermédiaire de deux voies : la voie perforine/ granzyme et la voie Fas/ FasL.

La voie perforine/ granzyme : lors de l'interaction de la cellule T CD8 avec la cellule cible, la perforine va être libérée par exocytose, pour aller créer des pores, par lesquels le granzyme va diffuser vers le cytosol de la cellule cible<sup>67</sup>. Le granzyme va ensuite conduire à la mort de la cellule<sup>67</sup>. Le granzyme B est le granzyme pro-apoptotique le plus puissant, induisant une mort rapide en activant les caspases (indirectement chez l'homme, et directement chez la souris).

La voie Fas/ FasL : Le ligand FasL est présent à la surface du lymphocyte T CD8, et se lie au récepteur Fas exprimé par la cellule cible. L'interaction va ensuite provoquer le recrutement du complexe de mort cellulaire « Death-Inducing Signaling Complex » (DISC), puis induire la mort par apoptose via la caspase 8<sup>68</sup>.

En dehors de leur fonction cytotoxique, les lymphocytes effecteurs ont également la capacité de produire de nombreuses cytokines, telles que l'IL-2 (maintien de la prolifération), le TNF $\alpha$  (soutien de l'inflammation) et l'IFN $\gamma$  (amplification de la

reconnaissance de la CPA via une augmentation de CMH-I), ainsi que plusieurs autres chimiokines.

Les cellules T CD8 vont ensuite être éliminées par apoptose, lors du phénomène nommé « contraction clonale ». Cependant, une population spécifique va persister : les lymphocytes CD8 mémoires. Ceux-ci vont avoir une réactivité plus importante lors d'une seconde infection, et une réponse amplifiée, en sécrétant certaines cytokines et chimiokines de façon plus rapide que les lymphocytes CD8 naïfs. On distingue deux sous-types de lymphocytes mémoires : ceux de la mémoire effectrice ( $T_{EM}$ ), localisés dans les ganglions, et ceux de la mémoire centrale ( $T_{CM}$ ), situés dans les organes périphériques. D'un point de vue fonctionnel, les  $T_{EM}$  auraient la capacité d'intervenir rapidement lors d'une réinfection, contrairement aux  $T_{CM}$  qui interviendraient de façon plus tardive, mais plus durable<sup>64</sup>.

### *Les cellules suppressives dérivées de cellules myéloïdes*

Les cellules suppressives dérivées de myéloïdes (MDSC, « Myeloid-Derived Suppressor Cells) représentent un ensemble de populations de cellules myéloïdes, qui s'accumulent pendant la progression tumorale ou l'inflammation chronique. Les MDSC ont un rôle d'immunosuppression important, et favorisent la tumorigénèse. Pour cela, les MDSC privent les cellules T de l'arginine et de la cystéine, indispensable à leur développement. Les MDSC produisent également des ROS (Reactive Oxygen Species, espèces réactives de l'oxygène) et de l'oxyde nitrique, qui vont causer une nitration du TCR et induire l'apoptose à la fois des NK des lymphocytes T. Un autre mécanisme majeur de l'inhibition des lymphocytes T est la production de TGF $\beta$  et IL-10, qui vont empêcher les fonctions effectrices des cellules T CD8. Enfin, les MDSC sont capables de diminuer l'expression de la chaîne  $\zeta$  du complexe de signalisation CD3, et donc de bloquer la reconnaissance de l'antigène présenté par la CPA, de produire des facteurs angiogéniques, et des cytokines stimulant le développement de la tumeur (notamment des cytokines activatrices des Treg)<sup>69</sup>.

Les cellules tumorales produisent des cytokines (IL-6, IL-1 $\beta$ ), et des facteurs de stimulations (VEGF, GM-CSF, etc.) qui vont favoriser l'expansion des MDSC. Le recrutement des MDSC (de leur migration vers le site de l'inflammation) est surtout

lié à des chimiokines, dont CXCL12. L'activation des MDSC va, elle, être favorisée par la présence chronique de cytokines inflammatoires, telles que le TNF $\alpha$  ou l'IFN $\gamma$ . Cette activation va mener à la suppression des lymphocytes T par rétrocontrôle négatif. Au-delà des fonctions d'immunosuppression, les MDSC peuvent également avoir un rôle direct dans la progression tumorale, et la création de métastases, grâce à la production de VEGF, qui favorise l'angiogénèse, et l'augmentation des MMP (Multiple Matrix Metalloproteinases)<sup>69</sup>.

Pour l'identification des MDSC, on utilise l'analyse d'antigènes exprimés préférentiellement tels que CD11b et Gr1 chez la souris, en distinguant deux sous-types : les MDSC granulocytaires, de phénotype Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup> (G-MDSC), et les MDSC monocytaires, de type Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> (M-MDSC).

Dans l'organisme humain, les MDSC étaient définies par CD11b+CD14-CD15+, avant la mise en évidence des deux sous-populations monocyttaire et granulocyttaire<sup>70</sup>. Par la suite, les MDSC ont été définies dans le CPNPC avancé comme étant de phénotype CD11b+CD14-CD15+CD33<sup>+</sup><sup>71</sup>. Plus récemment, les M-MDSC ont été définies selon le phénotype CD11b+CD14-HLA-DR-<sup>low</sup>CD15-, et les MDSC polynucléaires équivalents des G-MDSC murines caractérisées par : CD11b+CD14-CD15<sup>+</sup><sup>72</sup>. Néanmoins, la caractérisation à la fois morphologique et fonctionnelle des cellules myéloïdes est un domaine évolutif, et reste controversée à l'heure actuelle.

#### 4. Détermination de la valeur pronostique de l'infiltration des différentes populations immunitaires dans la tumeur

Il est aujourd'hui établi que le système immunitaire de l'hôte joue un rôle prépondérant dans le développement de la tumeur, et que ce rôle peut varier en fonction du type de cancer. Ainsi, à la fois le nombre, la localisation et le type de cellules infiltrant la tumeur pourrait avoir une valeur prédictive, soulignant l'importance de la recherche de biomarqueurs de prédiction du pronostic et de la réponse à la thérapie<sup>73</sup>.

Suite à la description (non exhaustive) des différentes populations immunitaires dans la section précédente nous détaillerons ici les valeurs pronostiques de certains sous-types cellulaires :

Les lymphocytes T : Lorsque les lymphocytes pénètrent dans la tumeur, ils sont appelés des TIL, pour « Tumor Infiltrating Lymphocyte ». La valeur pronostique dépend du type de TIL. En effet, les TIL CD8+ cytotoxiques sont la plupart du temps associés à un bon pronostic<sup>74</sup>, et de la même façon, les cellules T CD8 mémoires, qui ont déjà « rencontré » l'antigène et sont donc capables de tuer rapidement les cellules tumorales, sont fortement associées à un bon pronostic<sup>75</sup>. Les lymphocytes T CD8 sont aidés par les cellules T CD4 Th1, caractérisées par leur production d'IL-2 et d'IFN $\gamma$  : ainsi, un grand nombre de cellules T CD4 de sous-type Th1 dans le microenvironnement est corrélé à un bon pronostic. D'autres sous catégories de CD4+, comme les Th2 qui produisent des interleukines de type IL-4, IL-5 ou IL-13, et qui supportent la réponse B, ou encore les Th17 qui produisent l'IL-21 et l'IL-22, favorisant l'inflammation antimicrobienne, sont généralement considérés comme favorisant la progression tumorale dans divers types de cancers<sup>76</sup>, bien qu'ils aient été associé à une meilleure survie dans le cancer du sein pour Th2<sup>77</sup>, et dans le cancer de l'œsophage pour Th17<sup>78</sup>.

En revanche, les TIL régulateurs, qui sont des cellules CD4 caractérisées par l'expression du FoxP3 et de CD25, ayant une forte activité immunosuppressive via la production d'IL-10 ou de TGF- $\beta$ , vont davantage être prédictifs d'un mauvais pronostic<sup>79-81</sup>. A titre d'exemple, l'analyse des Treg dans des échantillons d'ascites issus de patients atteints de carcinomes de l'ovaire a démontré que les Treg étaient associés à un survie réduite<sup>81</sup>. Cependant, les Treg peuvent aussi être suppressifs de tumeurs, comme dans certains cancers des cellules B : la présence de Treg dans le lymphome Hodgkinien est corrélée à un bon pronostic, probablement en raison de la suppression directe des cellules tumorales dans ce cas précis<sup>82,83</sup>.

Les lymphocytes B : les cellules B sont souvent retrouvées dans les ganglions lymphatiques drainants et les structures lymphoïdes adjacentes de la tumeur. Leur infiltration est associée à un bon pronostic, notamment dans les cancers de l'ovaire et du sein<sup>84</sup>. En revanche, dans les modèles murins, il a été découvert une sous population de lymphocytes B produisant de l'IL-10, leur conférant un rôle de B régulateurs immunosuppresseurs<sup>85</sup>. Ces « Breg » augmentent la charge tumorale

tout en inhibant la réponse immunitaire spécifique de la tumeur dans des modèles murins de cancer de la peau<sup>86</sup>, et ont également été décrits comme favorisant les métastases pulmonaires dans un modèle in vivo de cancer du sein. Enfin, les Breg empêcheraient l'élimination des cellules tumorales par l'anti-CD20 dans un modèle murin de lymphome<sup>87</sup>.

Cependant, aucun des effets des Breg précédemment décrits n'est dû à une infiltration des Breg dans le microenvironnement. En effet, les Breg semblent affecter les cellules immunitaires dans les tissus lymphoïdes environnants ou dans les ganglions drainants. Le rôle des cellules B dans le pronostic reste à établir, et en particulier les Breg, dont la corrélation avec les cancers humains n'a pas encore été étudiée.

Les NK : les cellules de l'immunité innée telles que les NK sont capables d'infiltrer le stroma de la tumeur, mais sont rarement au contact des cellules tumorales. Dans certains types de cancers, les NK sont indicateurs de bons pronostics, notamment dans le cancer du foie, du rein, du poumon, de l'estomac et du colon<sup>88-90</sup>. Néanmoins, certaines études ont démontré que bien qu'étant physiquement présentes, les cellules NK pourraient ne pas pouvoir exercer leurs fonctions, en particulier à cause du TGF- $\beta$  présent dans le microenvironnement tumoral qui leur confère un phénotype anergique<sup>75</sup>.

Les macrophages : les macrophages associés à la tumeur sont abondants dans la plupart des modèles murins de cancers, et dans les cancers humains, et leur activité est habituellement pro-tumorigène<sup>91</sup>. Selon Pollard and al., les TAM favoriseraient l'angiogénèse, la migration de cellules malignes, l'invasion et les métastases<sup>92</sup>. Il a été mis en avant par le biais d'études précliniques et cliniques que l'abondance des TAM dans le microenvironnement seraient associée à un mauvais pronostic<sup>93</sup>. A titre d'exemple, il a été démontré dans le cancer du poumon que l'effusion maligne pleurale était liée à une augmentation significative des TAM CD163+, démontrant son rôle pronostic dans la survie sans progression<sup>94</sup>. De plus, des études génétiques dans le lymphome folliculaire ont démontré que l'expression de gènes associés à une signature des macrophages, tels que ACTN1 ou TNFSF13B, confèreraient un mauvais pronostic<sup>95</sup>. La détermination du profil de transcription des TAM a prouvé que leur profil est fortement enrichi en transcrits codant pour des molécules angiogéniques, et la comparaison de transcriptomes des TAM disponibles

dans les bases de données cliniques ont montré que les signatures transcriptionnelles sont prédictives de la survie<sup>96,97</sup>.

L'interaction entre les macrophages et le microenvironnement tumoral configure leur phénotype et leurs réponses: en clair, l'hypoxie tumorale est importante car un grand nombre de TAM s'accumulent dans les zones hypoxiques et/ou nécrotiques des tumeurs. Il a été démontré que ces zones attirent les TAM via la sécrétion de chimio-attractants induits par l'hypoxie, comme par exemple le VEGF. Ainsi, un phénotype de macrophages humains pro-angiogéniques induit par l'hypoxie a pu être identifié<sup>98,99</sup>.

Les MDSC : comme vu précédemment, la caractérisation des MDSC humaines est difficile, et leur phénotype est assez variable. Cependant, les MDSC murines et humaines inhibent l'action des lymphocytes T CD8+ par l'intermédiaire de la synthèse d'oxyde nitrique 2 (NOS2) et de l'arginase 1 (ARG1)<sup>100,101</sup>. Les MDSC favorisent également le développement des Treg<sup>102</sup>, et la polarisation des macrophages en phénotype de type 2, identifiée dans un modèle murin de cancer du sein métastatique<sup>103</sup>. Ainsi, les MDSC sont actuellement définies comme une population inhibitrice des cellules immunitaires, augmentée dans divers cancers murins et humains, et leurs fonctions immunosuppressives les assimileraient à un mauvais pronostic<sup>69,104</sup>.

Les DC : la valeur pronostique des cellules dendritiques est difficile à estimer. Elles ont une fonction cruciale dans la présentation antigénique, et ont été décrites comme ayant une action défensive dans le microenvironnement tumoral. Néanmoins, les DC retrouvées dans le microenvironnement tumoral ont été décrites comme étant « défectueuses », et ainsi incapable de stimuler une réponse immunitaire aux antigènes associés à la tumeur. En effet, le microenvironnement hypoxique perturbe la fonction d'activation immunitaire des DC, et certains DC ont été identifiées comme suppressives de la réponse T sur le site de la tumeur<sup>105</sup>. Ainsi, chez l'homme, les DC infiltrantes ont été reliées à la progression tumorale dans le cancer du sein<sup>106</sup> et le cancer colorectal<sup>107</sup>. En revanche, dans le carcinome hépatocellulaire, plus le nombre de DC est élevé dans le microenvironnement, plus le pronostic serait bon<sup>108</sup>. En conclusion, les DC pourraient avoir un rôle anti-tumoral ou pro-tumoral, dépendant du site de la tumeur et du microenvironnement<sup>109</sup>.

Il existe aujourd'hui un outil de pronostic utilisé pour la quantification in situ de l'infiltrat des cellules immunitaires : l'immunoscore<sup>110</sup>. L'immunoscore est basé sur les découvertes de Jérôme Galon en 2006, qui ont révélé un rôle positif majeur des lymphocytes T cytotoxiques et mémoires dans la survie des patients atteints de cancers colorectaux. Cet outil n'est pas encore établi dans d'autres types tumoraux que le cancer colorectal, mais semble très prometteur pour de futures indications. Ainsi, le système le plus commun pour la classification du stade du cancer reste aujourd'hui la classification TNM :

- 1) T : décrit la taille de la tumeur primaire, et l'invasion des tissus à proximité,
- 2) N : implication des ganglions lymphatiques,
- 3) M : présence des métastases.

La plupart des tumeurs ont leur propre classification TNM, excepté certaines tumeurs particulières (comme par exemple, les tumeurs du système nerveux central). Néanmoins, ces informations d'aide au pronostic sont incomplètes, et l'issue clinique peut énormément varier chez des patients ayant des tumeurs de même stade histologique<sup>111</sup>. De plus, cet outil ne prend pas en compte les effets du système immunitaire de l'hôte, et se concentre uniquement sur les cellules tumorales<sup>112</sup>.

En revanche, l'immunoscore inclut les effets du système immunitaire de l'hôte dans la classification du cancer et améliore la justesse du pronostic. Cette méthode mesure la densité de deux sous population des lymphocytes, évaluée par immunohistochimie : CD3/CD45RO, CD3/CD8 ou CD8/CD45RO (les cellules CD45RO+ représentant les cellules T mémoires), au centre et à la périphérie de la tumeur. Un immunoscore de 0 (I0) est atteint lorsqu'il y a une faible densité des deux populations à la fois, et dans les deux régions (centrale et périphérique), et le rang maximum de 4 (I4) est atteint lorsqu'on retrouve une forte densité<sup>113,114</sup>.

### **III. Mobiliser les défenses immunitaires : essor de l'immunothérapie**

Après avoir décrit dans les sections précédentes le rôle du système immunitaire dans l'élimination ou le contrôle des cellules malignes, nous allons voir les différentes immunothérapies dans le cancer. En effet, le but principal des immunothérapies

consiste à exploiter et augmenter la capacité du système immunitaire à détruire la tumeur<sup>115</sup>. Les plus anciennes immunothérapies comprennent les modulateurs biologiques, non spécifiques. En raison de leur toxicité, de nouvelles approches thérapeutiques ont alors vu le jour, ciblant spécifiquement la cellule tumorale : les thérapies ciblées. L'ingénierie des anticorps a ensuite permis de développer des thérapies originales, comme les anticorps conjugués à des chimiothérapies, ou encore les anticorps bispécifiques, pouvant cibler deux épitopes<sup>116</sup>. Enfin, nous aborderons les approches adoptives, dont le but est d'exploiter la spécificité des cellules immunitaires anti-tumorales en les transférant aux patients.

## 1. Les modulateurs biologiques

Une partie des immunothérapies la plus ancienne et non-spécifique comprend les cytokines immuno-stimulantes telles que l'IL-2 et l'IFN.

L'IL-2 a été décrite comme ayant un bon potentiel pour être utilisée en tant que thérapie dans le cancer. Une étude datant de 1986 sur des modèles animaux a montré que l'administration d'IL-2 exogène pouvait induire la prolifération et l'augmentation de la fonction des cellules T, mais également l'augmentation du nombre de cellules T mémoires<sup>117</sup>. En clinique, l'administration systémique d'IL-2 a montré une efficacité thérapeutique dans le carcinome du rein et le mélanome<sup>118,119</sup>. Cependant, son utilisation a ensuite été limitée en raison des nombreuses toxicités reportées suite à une délivrance systémique. En effet, l'administration intraveineuse d'IL-2 cause un syndrome d'hyperperméabilité capillaire, ou encore une hypotension de la pression sanguine, des oedèmes, et des dyspnées pouvant mener à un choc circulatoire et éventuellement à une défaillance cardio-pulmonaire ou multi-organes. Ainsi, de nouvelles approches d'administration de l'IL-2 se sont développées, de manière plus localisées. Néanmoins, l'efficacité de l'IL-2 en monothérapie reste très limitée, et de nouvelles stratégies de combinaison sont actuellement en cours d'études<sup>120</sup>.

Concernant l'activité de l'IFN, les IFN de type I ont la capacité d'activer l'immunité anti-tumorale. Cette activation inclut la stimulation des cellules T, des NK, des DC et la régulation négative des cellules immunosuppressives telles que les MDSC et les Treg<sup>121</sup>. En parallèle de cette activité extrinsèque le l'IFN-I, il existe également un impact intrinsèque non négligeable, comme la modulation de l'apoptose, la migration

et la différenciation cellulaire, mais également l'inhibition de la prolifération. Au vu de ces différents éléments, l'IFN-I constituerait une opportunité de traitement fondamentale dans le cadre des thérapies anti-cancéreuses. Ainsi, la première thérapie basée sur l'IFN-I a montré une très forte efficacité contre les cancers hématologiques, dont les néoplasmes lympho et myélo-prolifératifs<sup>121</sup>. L'administration de l'IFN-I chez les patients atteints de ces pathologies a considérablement augmentée leur durée de vie en comparaison aux approches chimio-thérapeutiques<sup>121</sup>. Concernant les cancers solides, les essais de hautes doses d'IFN chez des patients atteints de mélanomes de stades IIb ou III a été à l'origine d'une augmentation de la survie. Néanmoins, en dépit d'une activité certaine, l'IFN-I a également provoqué de nombreux effets secondaires graves, tels que nausées, vertiges, anorexie, dépression, leucopénie, fatigue et fièvres<sup>122</sup>. Ainsi, des efforts au niveau de la formulation sont actuellement engagés pour optimiser à la fois la stabilité et la biodisponibilité de l'IFN-I. Par exemple, la conjugaison d'IFN-I (en particulier, l'IFN $\alpha$ ) avec du polyéthylène glycol (PEG) diminue la clairance et l'immunogénicité en comparaison à l'IFN-I seul<sup>123</sup>. L'utilisation de ce type de combinaison PEG-IFN $\alpha$  a par ailleurs été approuvée aux Etats-Unis, en 2011, dans le mélanome de stade III<sup>124</sup>. Cependant, de nombreuses limitations perdurent malgré l'amélioration de la formulation : en effet, l'utilisation de PEG-IFN n'augmente pas la survie, et ne semble pas agir sur les métastases.

Enfin, certains immunostimulants non spécifiques se sont révélés efficaces dans certains types tumoraux. Le plus connu, le BCG, a montré une activité dans le traitement du carcinome de la vessie. Son administration augmente l'expression des antigènes tumoraux, après que la cellule tumorale ait internalisé la bactérie. Cette surexpression va induire une production massive de cytokines (de type IL-2, IL-12, IFN $\gamma$  etc.), qui vont-elles-mêmes provoquer une réponse anti-tumorale par l'intermédiaire de l'activité cytotoxique des lymphocytes, et la contribution des NK, neutrophiles et macrophages<sup>125</sup>.

## 2. Les thérapies ciblées

L'objectif de ces thérapies est d'interagir avec des molécules cancéreuses spécifiques impliquées dans la progression tumorale, en préservant les cellules saines. Les thérapies ciblées incluent les anticorps monoclonaux (mAbs) et des petites molécules chimiques.

Les mAbs sont généralement de la famille des IgG. La partie supérieure de ces anticorps comprend un bras « Fab », pour « Fragment antigen binding », qui va permettre la liaison à l'antigène, et la partie inférieure constitue la partie « Fc », pour « crystallizable Fragment ».

Les premiers essais cliniques utilisant des mAbs remontent aux années 1980, et les premiers mAbs ont montré une efficacité mitigée, principalement due à leur immunogénicité<sup>126</sup>. En effet, ces premiers anticorps étant 100% murins, le système immunitaire du patient produisait des anticorps dirigés contre ces mAbs (spécifiquement nommés « Human Anti-Murine Antibodies », « HAMA »), limitant ainsi leur efficacité et causant de sévères réactions secondaires. Ainsi, les mAbs actuels sont des anticorps chimériques et humanisés, qui induisent moins d'immunogénicité et sont plus efficaces.

Les mAbs peuvent être dirigés contre des facteurs solubles, comme des cytokines, mais la plupart d'entre eux vont avoir un effet lié à l'interaction avec des antigènes spécifiques de la tumeur<sup>127</sup>. L'action de ces mAbs va ensuite être soit directe, via l'induction de l'apoptose, soit indirecte, via l'activation du système immunitaire grâce à la partie Fc. La fraction Fc de l'anticorps peut ainsi provoquer une réaction de cytotoxicité de la cellule dépendante de l'anticorps (« ADCC : Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity »)<sup>128</sup>, de cytotoxicité dépendante du complément (« CDC : Complement-Dependant Cytotoxicity »)<sup>129</sup> ou encore de phagocytose de la cellule dépendante de l'anticorps (« ADCP : Antibody-Dependant Cellular Phagocytosis »)<sup>130</sup>.

Le premier mAb approuvé en 1997 par la FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement du cancer est le rituximab, un anticorps monoclonal dirigé contre le CD20. Le CD20 est une protéine surexprimée dans 95% des lymphomes des cellules B<sup>131</sup>. Depuis la mise sur le marché du rituximab, plus d'une vingtaine d'anticorps monoclonaux ont été approuvés dans le traitement de cancers solides et liquides (Tableau 1<sup>132,133</sup>). Plus récemment, le daratumumab, un anticorps monoclonal dirigé

contre le CD38 et l'Elotuzumab, ciblant la protéine SLAMF7, ont été approuvés par la FDA dans le myélome multiple<sup>134</sup>. Selon le site clinicaltrial.gov, 11 essais cliniques sont actuellement en cours, ou en recrutement, en France, étudiant l'efficacité de divers anticorps monoclonaux dans le cancer.

Nom de l'anticorps	Cible	Approbation par la FDA
Rituximab	CD20	1997
Trastuzumab	HER2	1998
Gemtuzumab	CD33	2000
Alemtuzumab	CD52	2001
Ibritumomab tiuxetan	CD20	2002
Cetuximab	EGFR	2004
Bevacizumab	VEGF	2004
Panitumumab	EGFR	2006
Ofatumumab	CD20	2009
Denosumab	RANK-L	2010
Brentuximab	CD30	2011
Pertuzumab	HER2	2012
Obinutuzumab	CD20	2013
Trastuzumab emtasine	HER2 (mertansine)	2013
Ramucirumab	VEGFR	2014
Siltuximab	IL-6	2014
Dinutuximab	GD2	2015
Daratumumab	CD38	2015
Necitumumab	EGFR	2015
Elotuzumab	SLAM-F7	2015

**Tableau 1 – Anticorps monoclonaux approuvés par la FDA dans le traitement du cancer (hors inhibiteurs des points de contrôles immunitaires)**

### 3. Les ADC : Antibody-Drug Conjugate

Les anticorps conjugués de type ADC sont des thérapies composées d'un agent cytotoxique lié de façon covalente par l'intermédiaire d'un linker à un anticorps ou à un fragment d'anticorps dirigé vers une cible spécifique exprimée à la surface des cellules tumorales<sup>135</sup>. L'avantage de ces ADC réside dans leur spécificité et leur efficacité, en comparaison à la chimiothérapie qui à la fois manque de spécificité et peut causer des dommages importants aux tissus sains. De plus, la partie chimique

liée à l'anticorps induit seule une très forte toxicité, rendant la molécule inutilisable en dehors d'une approche d'ADC. Cependant, le design des ADC présente une difficulté importante : en particulier, la stabilité du linker est primordiale lors de la circulation du complexe dans le sang, après administration par intraveineuse. Le choix de ce linker est donc un critère essentiel dans la fabrication des ADC<sup>132</sup>.

Bien que les ADC représentent une innovation thérapeutique importante dans le traitement du cancer, à travers des avantages certains comme leur spécificité, leur large indice thérapeutique, et une durée de demi-vie augmentée, de nombreux points négatifs restent encore à améliorer. En effet, la cible moléculaire peut être exprimée dans certains tissus normaux, ce qui peut être à l'origine d'une toxicité importante. L'élément cytotoxique peut également être relargué prématurément, notamment en cas d'instabilité du linker. De plus, les ADC peuvent être en concentration insuffisante pour être létale lorsqu'ils atteignent la cellule cible. Enfin, comme pour toute thérapie ciblée, l'expression des antigènes à la surface de la tumeur peut être hétérogène, limitant l'efficacité de ces anticorps<sup>135</sup>.

#### 4. Les bispécifiques

Les anticorps bispécifiques (bsAb) sont des protéines dérivés d'anticorps qui ont la capacité de se lier à deux épitopes différents sur le même antigène ou sur deux antigènes différents. Les bsAb peuvent induire de la cytotoxicité, de la phagocytose, réaliser la présentation antigénique, ou directement supprimer une réponse immunitaire dérégulée. Ces différentes actions dépendent de la nature de l'interaction entre la cible et le bsAb. L'intérêt thérapeutique majeur de ces anticorps a été démontré au cours des trente dernières années, grâce à leurs caractéristiques avantageuses comme la sélectivité, et la flexibilité de design. A titre d'exemple, l'équipe de Kellner *et al.* a développé un bsAb dirigé contre CD19 (antigène tumoral) et CD16 (antigène présent sur les cellules de l'immunité innée tels que les NK et les macrophages), un candidat attractif pour le traitement des leucémies, qui est à l'heure actuelle en évaluation préclinique<sup>136</sup>. Ce type de bsAb a par ailleurs démontré un effet de synergie anti-tumorale avec le bsAb CD19 x CD3 dans un modèle préclinique de lymphome non Hodgkinien<sup>137</sup>, le bsAb CD19 x CD3 ayant déjà montré une efficacité très importante en monothérapie dans des modèles de xénogreffes de

lymphome des cellules B<sup>138</sup>. Le blinatumumab, un bsAb CD19 x CD3 dépourvu de partie Fc, a par ailleurs été approuvé par la FDA en 2014 dans le traitement de la leucémie aigüe lymphoblastique<sup>139</sup>. Cependant, en raison du manque de la partie Fc, et donc de sa très faible durée de demie vie, l'administration de cet anticorps nécessite une perfusion longue et prolongée.

Il existe plusieurs limitations importantes relatives au développement des bsAb : premièrement, dans la difficulté de production à grande échelle en lots homogènes de ce type d'anticorps, et deuxièmement dans la génération d'une réponse HAMA à cause des fragments d'anticorps murins. Ce deuxième point s'accompagne également d'effets secondaire importants, comme la libération de cytokines, la thrombocytopenie et la leucopénie<sup>140</sup>.

## 5. La thérapie de cellules adoptives

Cette autre type d'immunothérapie implique la récupération et l'expansion *in vitro* de cellules T spécifiques de la tumeur, qui vont ensuite être ré-infusées au patient. D'autres essais sont également menés de la même manière avec des cellules NK.<sup>141</sup> Historiquement, la première thérapie de cellules adoptives consistait à réaliser une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques, pour le traitement de maladies hématologiques<sup>142</sup>. Plusieurs formes de thérapies utilisant les cellules adoptives ont ensuite vu le jour, avec par exemple en 1988, la récupération des TIL issus directement de la tumeur. Cette thérapie a provoqué une réponse objective selon les critères RECIST pour 11/20 patients atteints de mélanome métastatique. En revanche, seul 5/9 de réponses étaient complètes, avec une durée de réponse moyenne de 4 mois seulement<sup>143</sup>.

Suite à cette découverte, un bouleversement majeur s'est opéré lors des essais de lympho-déplétion totale par irradiation avant une thérapie de cellules adoptives de type TIL. En effet, la lympho-déplétion avant une thérapie de transfert de cellules adoptives amplifie la réponse anti-tumorale en favorisant l'immunité innée, en augmentant certaines cytokines et en diminuant le nombre de Treg et de MDSC. Ainsi, la lympho-déplétion avant le transfert de cellules augmente le taux de réponse chez des patients atteints de mélanome de stade IV à des taux de 49%, 52% et au

maximum 72% selon l'augmentation d'intensité d'irradiation provoquant la lympho-déplétion<sup>144</sup>.

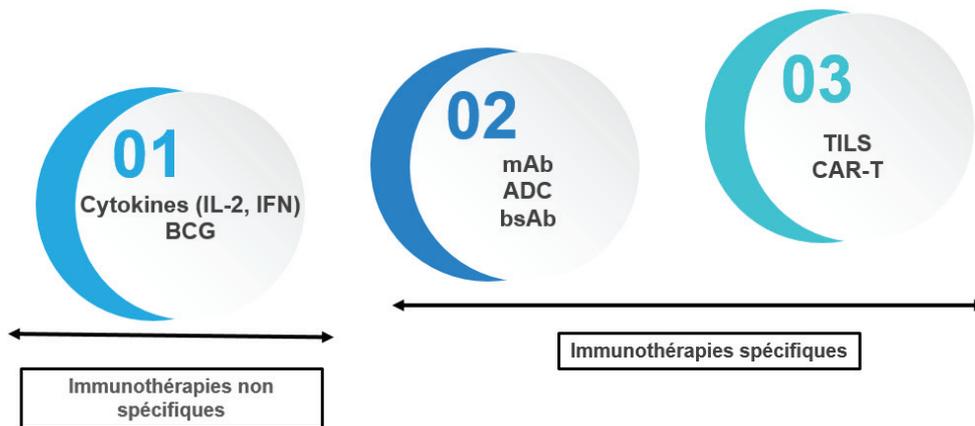
Cependant, ce type de protocole, bien que très efficace dans le traitement du mélanome, se montre inefficace dans d'autres types de cancers ou la culture des TIL reste aujourd'hui un challenge. Par exemple, le cancer du côlon, qui a été décrit comme contenant des TIL, comprend trop d'incertitude sur ces TIL (à savoir, s'ils présentent une activité suppressive plutôt qu'anti-tumorale) pour mettre au point une thérapie de type adoptive<sup>143</sup>.

Une autre technique de thérapie de cellules adoptives consiste à isoler et amplifier des clones de cellules T spécifiques de la tumeur. Ces clones peuvent être générés à partir de la répétition d'une stimulation antigène-spécifique *in vitro* de cellules T dérivés du patient (autologue) ou dérivés d'un donneur (allogénique). Les cellules T isolées du patient doivent exprimer un TCR actif, et peuvent ensuite être modifiées en vue d'augmenter l'affinité spécifique de l'antigène, en changeant la région complémentaire à l'antigène<sup>145</sup>. Contrairement à l'utilisation des TIL, le nombre de cancers pouvant utiliser ce type de thérapie est beaucoup plus vaste, comme le neuroblastome ou le cancer colorectal<sup>143</sup>.

Enfin, la dernière innovation de transfert de cellules adoptives consiste à utiliser des cellules T qui ont été modifiées *in vitro* pour reconnaître et attaquer les tumeurs. Cette dernière thérapie est connue comme la thérapie « CAR-T cells » (cellules T porteuses d'un récepteur chimérique), et utilise la technique du CRISPR/Cas9<sup>125</sup>. Le récepteur chimérique des cellules CAR-T est un récepteur hybride, issu de la fusion d'un fragment d'anticorps spécifique de la tumeur (une chaîne dérivée de CD3), et un domaine de co-stimulation de signal<sup>146</sup>. La thérapie « CAR-T cells » a montré une très forte efficacité en ciblant le CD19 dans la leucémie lymphoblastique aigue des cellule B<sup>146,147</sup>, le CD171 dans le neuroblastome, et une enzyme dans le carcinome rénal<sup>143</sup>.

En résumé, il y a trois sources possibles de cellules T spécifiques de la tumeur pour l'immunothérapie adoptive : les TIL, qui sont spécifiques de la tumeur, qui peuvent être amplifiés *in vitro* puis ré-infusés au patient. Ensuite, pour les patients atteints de tumeurs dont on ne peut pas isoler les TIL, il est nécessaire d'avoir recours à une

amplification de cellules spécifiques de l'antigène, ou bien de modifier génétiquement les populations de lymphocytes T. Néanmoins, l'une des limites majeures de ces thérapies reste leur coût très élevé. À titre d'exemple, le prix d'une transplantation allogénique aux Etats-Unis varie d'environ 90 000 à 200 000 \$<sup>148</sup>.



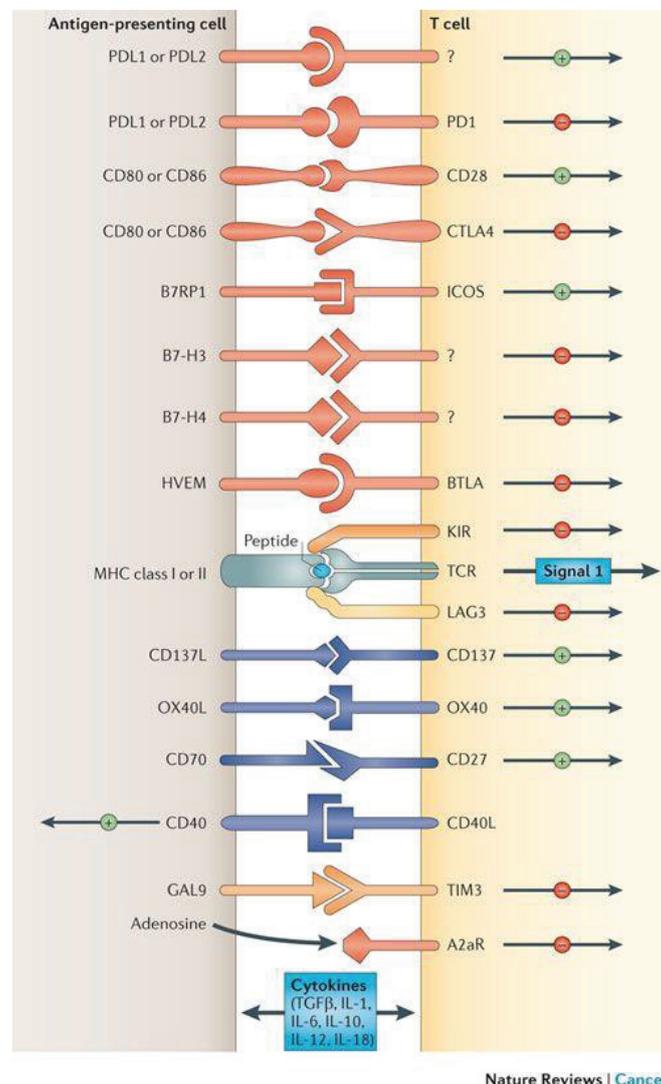
**Figure 5 – Récapitulatif des différentes immunothérapies**

01) Modulateurs biologiques, 02) Anticorps, 03) Thérapies cellulaires. MAb = anticorps monoclonaux, ADC = anticorps conjugués, TILS = thérapie utilisant les lymphocytes infiltrants, CAR-T= thérapie utilisant les cellules T porteuses d'un récepteur chimérique, bsAbs = anticorps bispécifiques.

## 6. Les points de contrôles immunitaires

Afin d'assurer qu'une réponse immunitaire inflammatoire ne soit pas activée de façon inappropriée, de nombreux points de contrôles immunitaires sont présents sous forme de récepteurs sur la cellule T, et se lient aux ligands présents dans le microenvironnement (sur la CPA, ou la cellule tumorale). Cette interaction permet de limiter les réactions d'auto-immunité, et de prévenir d'une réponse immunitaire démesurée. Ainsi, comme décrit précédemment, lorsque le CMH de la CPA rencontre le TCR du lymphocyte T, et que la co-stimulation avec le CD28 est activée, l'activation et la prolifération peut se mettre en place. Les points de contrôles immunitaires régulent ou suppriment cette réaction pour éviter des dommages collatéraux d'auto-immunité.

Ce type de suppression d'activité des lymphocytes provoque un « épuisement » des lymphocytes T, qui diffère de la sénescence ou de l'anergie. Plus de vingt couples de récepteur/ligand de points de contrôles immunitaires, activateurs ou inhibiteurs, ont été découverts (Figure 6, issue de Pardoll *et al.*<sup>149</sup>).



**Figure 6 - Liste non exhaustive des points de contrôles immunitaires activateurs ou inhibiteurs**

(Issu de Pardoll *and al.*, 2012)

Certains points de contrôles, tels que TIGIT, LAG-3 ou TIM-3 sont également présents à la surface d'autres cellules myéloïdes et lymphoïdes<sup>150-152</sup>. Deux couples de récepteur/ligand ont particulièrement retenu l'attention ces dernières années : le récepteur « cytotoxique T lymphocyte-associated antigen-4 » (CTLA-4), et son ligand B7, et le récepteur « programmed cell death protein 1 » (PD-1) avec son ligand PDL-1. L'expression du CTLA-4 sur les T cytotoxiques et régulateurs a été décrite en

1987<sup>153</sup>. Le CTLA-4 possède une très forte homologie avec CD28, protéine de co-stimulation des cellules T, et une meilleure affinité pour B7, provoquant une perte de la prolifération et de la sécrétion d'IL-2 par les cellules T.

Concernant PD-1, ce point de contrôle a été découvert en 1992<sup>154</sup>, ses ligands (PDL-1 et PDL-2) ayant été caractérisés plus tard (entre 2000 et 2002, Figure 7<sup>155</sup>). PD-1 n'interfère pas dans la co-stimulation comme CTLA-4, mais génère des signaux qui empêchent la phosphorylation de signaux intermédiaires clés dans l'activation des lymphocytes T. Le ligand PDL-1 est exprimé sur les DC, macrophages et cellules B, mais peut également être présent sur les cellules T, les cellules endothéliales et épithéliales, et les cellules tumorales.

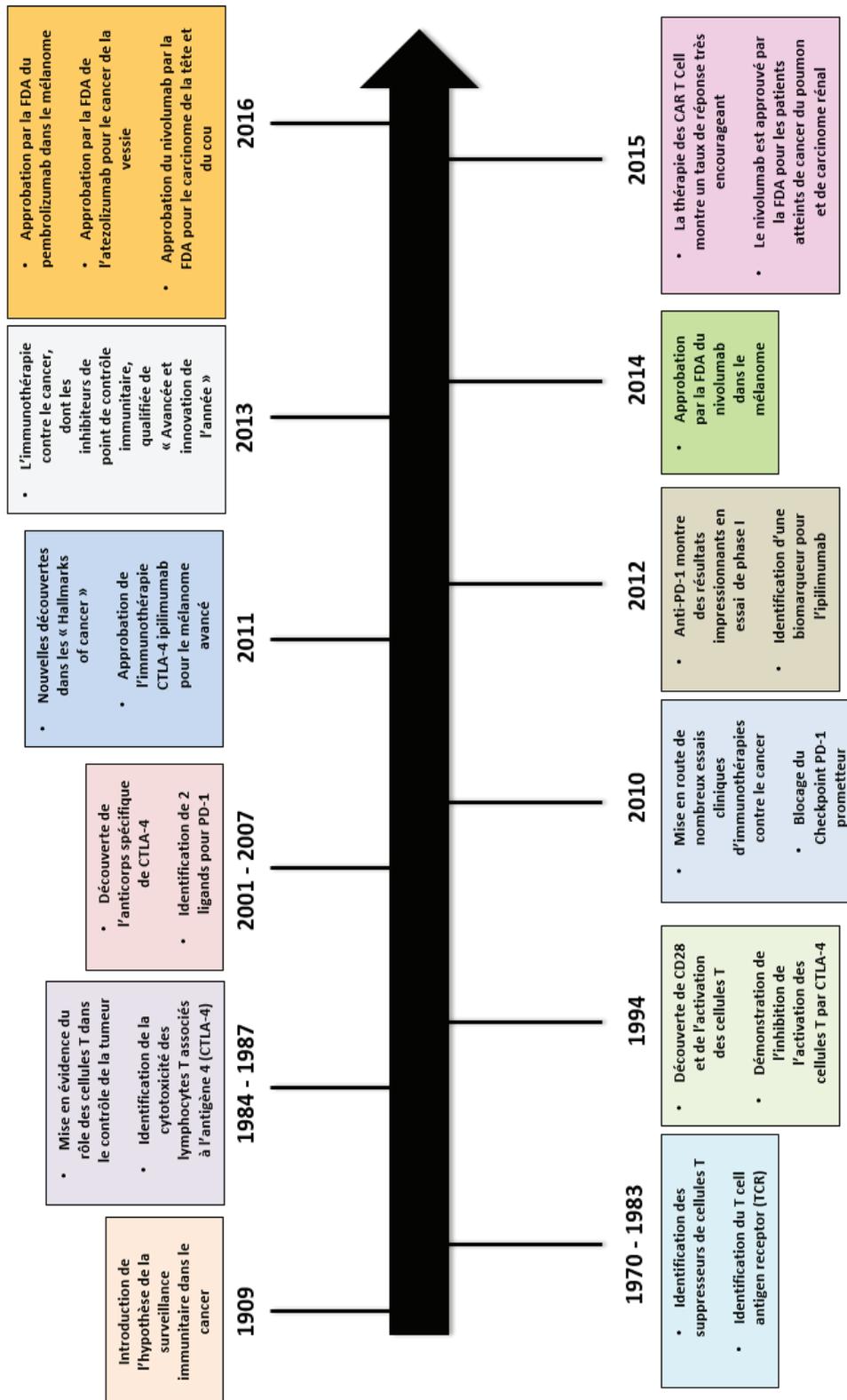


Figure 7 - Historique (non exhaustif) de la découverte des points de contrôle immunitaire (1909 - 2016)

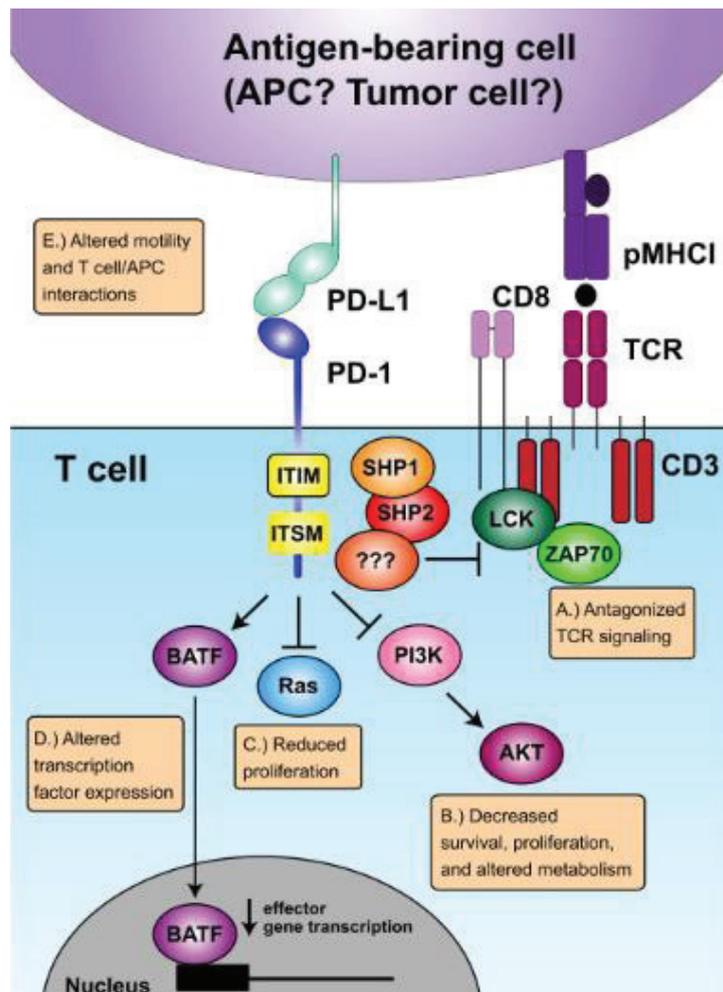
### *Description de l'interaction PD-1/PDL-1*

La protéine transmembranaire monomérique PD-1 (autrement nommé CD279), de la famille de B7, est composée de 288 acides aminés, et sa structure présente une homologie avec les immunoglobulines. La protéine PD-1 est issue du gène *pdc1*, présent chez l'homme et chez la souris (chromosome 2 et chromosome 1 respectivement). PD-1 est présent à la surface des lymphocytes T et B, des NK, des Treg, des DC, et des macrophages.

Au niveau de sa structure, le récepteur PD-1 contient deux motifs tyrosines qui vont permettre le recrutement de phosphatases pour permettre son activité inhibitrice : « Immunoreceptor Tyrosine Inhibitory Motif » (ITIM) et « Immunoreceptor Tyrosine Switch Motif » (ITSM).

La liaison de PD-1 avec PDL-1 va créer une perte de fonctionnalité, un épuisement et une neutralisation des TIL, ainsi qu'une production massive d'IL-10 de la part de la tumeur. Par l'intermédiaire d'une surexpression de PDL-1 la tumeur se protège donc elle-même des lymphocytes T cytotoxiques. En conséquence de l'épuisement des cellules T CD8, les cellules tumorales gagnent en agressivité et vont libérer des cytokines à vocation pro-inflammatoire, telles que l'IL-2 ou l'IFN $\gamma$  qui vont induire l'expression de PDL-1. En parallèle, les cellules T régulatrices vont mettre en place un environnement très immunosuppresseur en maintenant PD-1 à leur surface. Il a également été démontré qu'en présence de TGF- $\beta$  et CD3, si PD-1 est exprimé sur la cellule T régulatrice, une augmentation de la transformation des CD4 en phénotype Treg va être observée, et par conséquent une diminution de la réponse immunitaire<sup>156</sup>.

D'autres mécanismes d'inhibition induits par la voie PD-1/ PDL-1 ont également été mis en avant, même si la connaissance de certains de ces processus ne soit pas complète<sup>157</sup> (Figure 8, issue de Pauken *et al*).



**Figure 8 - Les 5 mécanismes principaux avancés dans l'hypothèse d'inhibition des lymphocytes T par PD1**

(Issu de Pauken et al., 2015)

5 mécanismes majeurs hypothétiques ont été mis en avant pour l'inhibition des lymphocytes T par PD-1<sup>157</sup> : PD-1 pourrait se comporter comme un antagoniste et donc comme un compétiteur du TCR. Le récepteur PD-1 perturberait ainsi la voie du TCR et empêcherait la phosphorylation de ZAP70 par LCK. 1 (Figure 8, A). Une autre hypothèse serait que PD-1 inhiberait l'enzyme PI3K, et donc la voie AKT → mTOR, induisant une diminution de la survie, la prolifération et l'altération du métabolisme cellulaire (Figure 8, B). PD-1 pourrait réduire la prolifération en agissant sur la voie de signalisation de Ras (Figure 8, C). Ensuite, PD-1 pourrait agir sur l'expression de certains facteurs de transcription dont BATF, qui régule de façon négative plusieurs gènes effecteurs (Figure 8, D). Enfin, le récepteur PD-1 modifierait la mobilité des lymphocytes T, et la stabilité ou la durée de l'interaction avec la CPA ou la cellule tumorale (Figure 8, E).

Suite à ces mécanismes, et comme évoqué précédemment, les lymphocytes T entreraient en état dit d'épuisement suite à l'interaction PD-1/PDL-1. Cet état se caractérise par l'incapacité à proliférer, à produire des cytokines (cette perte de production de cytokines suit un certain ordre : d'abord l'IL-2, puis le TNF $\alpha$  et enfin l'IFN $\gamma$ ), et une altération du métabolisme. Bien que cet épuisement soit lié à la plupart des points de contrôles inhibiteurs (PD-1, mais aussi CTLA-4, LAG-3 et TIM-3), PD-1 y est majoritairement lié. Néanmoins, plus le nombre de points de contrôle est élevé en co-expression de PD-1, plus l'épuisement sera important. Une autre singularité des lymphocytes T épuisés est la modification épigénétique de l'ADN. En effet, les gènes effecteurs (à savoir, induisant la prolifération cellulaire ou codant pour des cytokines) présentent une modification dans leur méthylation jouant sur leur transcription<sup>157</sup>.

### *Les anticorps anti-PD-1 et anti-PDL-1*

Depuis la découverte de ces points de contrôle inhibiteurs, le secteur de l'immunothérapie a subi un véritable bouleversement. L'utilisation d'anticorps bloquant ces points de contrôles immunologiques, et permettant de réactiver la réponse immunitaire, a montré des réponses spectaculaires et durables dans certaines indications. Cette innovation a été considérée comme une telle révolution dans la prise en charge de patients atteints de cancers qu'elle a reçu la mention de « Breakthrough » de l'année 2013 dans la revue Science<sup>158</sup>.

L'anticorps anti-CTLA4 ipilimumab (nom commercial Yervoy<sup>®</sup>, commercialisé par Bristol-Myers Squibb (BMS)) est le premier inhibiteur de point de contrôle immunologique à avoir été approuvé par la FDA. Cependant, en raison de la toxicité importante due à l'ipilimumab, la recherche s'est ensuite orientée davantage vers le développement des anti-PD-1 et anti-PDL-1, qui présentent moins d'effets indésirables.

L'activité des anti-PD-1 et anti-PDL-1 a été démontrée dans le mélanome et le cancer du rein, mais également dans le cancer du poumon à petites cellules, le cancer de la vessie et le cancer de la tête et du cou, des tumeurs qui n'étaient initialement que peu sensibles à l'immunothérapie<sup>159</sup>.

De nombreuses compagnies pharmaceutiques se sont emparées du phénomène et ont consacré leur recherche et développement aux anti-PD-1 et anti-PDL-1. Ainsi, on retrouve aujourd’hui plusieurs anticorps utilisés en clinique qui ont été approuvés par la FDA. Pour les anti-PD-1, les anticorps sont principalement le nivolumab (nom commercial Opdivo<sup>®</sup>, commercialisé par BMS) et le pembrolizumab (nom commercial Keytruda<sup>®</sup>, commercialisé par Merck), alors que pour les anti-PDL-1 on retrouve notamment l’atezolizumab (nom commercial Tecentriq<sup>®</sup>, commercialisé par Roche) et le durvalumab (nom commercial Imfinzi<sup>®</sup>, commercialisé par AstraZeneca).

Le tableau ci-dessous répertorie les différentes caractéristiques des anticorps nivolumab, pembrolizumab, atelzolizumab et durvalumab (Tableau 2<sup>159-169</sup>).

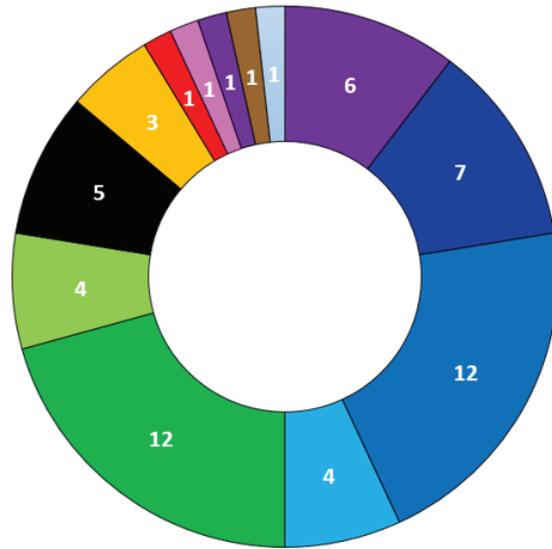
Nom anticorps	Cible	Type d'anticorps	Type de cancer	Approbation par la FDA
Nivolumab	PD1	IgG4, humain	mélanome métastatique inopérable avec mutation positive de BRAF ou après progression aux anti-BRAF	2014
			cancer du poumon non à petites cellules	2015
			carcinome rénal	2015
			carcinome des cellules squameuses de la tête et du cou récurrent ou métastatique	2016
			lymphome de Hodgkin	2016
			cancer de la vessie avancé ou métastatique	2017
			cancer colorectal avec progression après un traitement à l'oxaliplatine, fluoropyrimidine et irinotecan	2017
			carcinome hépatocellulaire avancé	2017

<b>Pembrolizumab</b>	PD1	IgG4, humanisé	mélanome avancé traité à l'ipilimumab	2016
			carcinome cellulaire squameux progressif ou récurrent de la tête et du cou, avec une progression de la maladie ou après une chimiothérapie à base de platines	2016
			cancer de l'estomac	2017
			lymphome de Hodgkin	2017
			cancer de la vessie avancé ou métastatique	2017
			cancer du poumon non à petites cellules	2018
<b>Atezolizumab</b>	PDL-1	IgG1, humain modifié	cancer du poumon non à petites cellules ou l'état de la maladie a empiré pendant ou après une chimiothérapie à base de platines	2016
			carcinomes urothéliaux avancés ou métastatiques et pour lesquelles la maladie a empiré pendant ou après une chimiothérapie à base de platines	2016
<b>Durvalumab</b>	PDL-1	IgG1, humain	carcinome urothélial avancé ou métastatique avec une progression de la maladie pendant ou après une chimiothérapies à base de platine	2017
			cancer du poumon n'ayanr pas progressé après un traitement à la chimio-radiation	2018

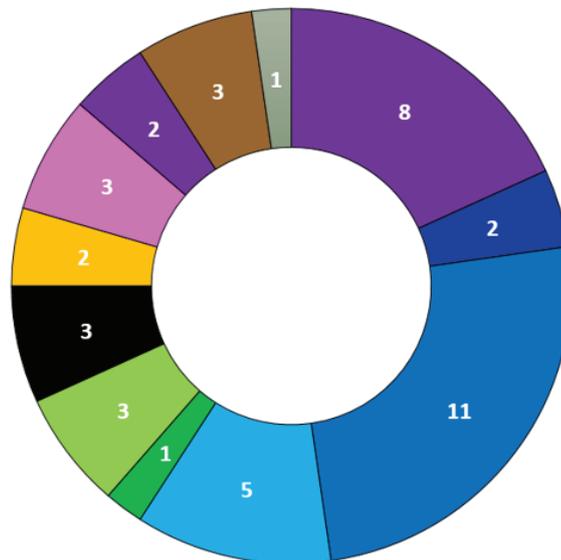
**Tableau 2 - Synthèse des différentes caractéristiques des anticorps monoclonaux nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab et durvalumab**

D'autres anticorps anti-PD-1 et anti-PDL-1 sont actuellement en phase d'essai clinique active, tels que l'anti-PDL-1 MDX-1105 ou encore l'anticorps anti-PD1 pidilizumab (CT-011) dans le lymphome. A titre d'exemple de l'enthousiasme suscité par les bloqueurs de la voie PD1/PDL-1, la figure ci-dessous répertorie les différents essais cliniques utilisant l'anti-PD1 et l'anti-PDL-1, en France uniquement (Figure 9).

A



B



**Figure 9 - Résultats des essais cliniques avec l'anti-PD1 et l'anti-PDL-1 en France**

D'après [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov), (A) recherche « ANTI-PD-1 » « France » « Cancer », (B) recherche « ANTI-PDL-1 » « France » « Cancer ».

### *Toxicité des anticorps anti-PD1 et anti-PDL-1*

Les anticorps anti-PD1 et anti-PDL-1 ont démontré une forte efficacité dans plusieurs types de cancers (Tableau 2) et sont en cours d'essai dans un large panel.

Cependant, les modifications induites par ces anticorps dans le fonctionnement des points de contrôles immunitaires peuvent mener à un déséquilibre de la tolérance immunologique, se manifestant cliniquement par des symptômes auto-immuns, et d'importants effets secondaires inflammatoires. En général, cette toxicité est moindre avec les traitements anti-PD1 / PDL-1 en comparaison à l'anti-CTLA4. En effet, dans des études cliniques de phase III, les effets indésirables toxiques de grade 3-4 s'élevait au nombre de 7-12% des patients ayant reçu la monothérapie anti-PD1 ou anti-PDL-1 versus 10-18% des patients ayant reçu l'anti-CTLA4 seul<sup>170,171</sup>.

Parmi ces événements indésirables liés aux anti-PD1 et anti-PDL-1, on retrouve le plus communément la fatigue, qui revient chez 16-37% des patients traités à l'anti-PD1 en monothérapie<sup>172</sup>, et 12-24% pour l'anti-PDL-1<sup>173</sup>.

Concernant les effets secondaires spécifiques d'organes, on retrouve ensuite des toxicités dermatologiques, la plus commune étant l'éruption maculopapuleuse (éruption de taches cutanées superficielles)<sup>174</sup>. D'autres désordres dermatologiques ont également été observés de façon plus rare, tels que des dermatoses lichénoïdes (lésion de la peau, dont l'aspect évoque celui du lichen) et des nécrolyses épidermiques toxiques, pouvant avoir des conséquences sévères<sup>170,171</sup>. L'un des potentiels mécanismes évoqué pour expliquer ces toxicités au niveau de la peau serait la co-expression de l'antigène sur les cellules tumorales du patient et sur les cellules de la jonction dermo-épidermale (ou autres cellules de la peau)<sup>171</sup>. Ainsi, pour le management des patients présentant une toxicité de la peau de grade 2 ou 3, le blocage avec les inhibiteurs de points de contrôles immunitaires doit être temporairement arrêté, pour redescendre progressivement à un stade de toxicité <1. Cette discontinuité de traitement a été observée dans environ 5% des cas de patients traités<sup>171</sup>.

Ensuite, de nombreux cas de diarrhées et de colites ont été également définis, avec de forte douleurs abdominales, et à moindre mesure des toxicités endocrines tels

que des hypophysites (atteinte inflammatoire de la glande hypophysaire)<sup>175</sup>. Le foie peut également être atteint lors de l'utilisation d'anti-PD1 et anti-PDL-1, avec des hépatites observées pour 5% des patients, dont 1 à 2% de toxicité de grade 4<sup>171</sup>. Enfin, des cas de toxicité pulmonaire (pneumonites) ont été reportées pour environ 10% des patients traités aux anti-PD1 et anti-PDL-1, et semblent plus fréquentes chez les patients atteints de cancer du poumon<sup>170</sup>. Ces toxicités ont été fatales pour trois patients durant le stade de développement précoce du nivolumab. Les toxicités les plus sévères ne sont pas négligeables, et nécessitent une hospitalisation avec administration de corticostéroïdes ou d'autres médicaments immunosuppresseurs<sup>170</sup>. D'autres toxicités liées aux anti-PD1/PDL-1 ont également été reportées, mais de façon très rare, tels que des syndromes neurologiques, oculaires et rénaux<sup>171</sup>.

#### IV. Etude de biomarqueurs prédictifs de la réponse à l'inhibition de la voie PD1/PDL-1

Afin de prédire la réponse aux anti-PD1/PDL-1, de nombreux efforts de recherche sont en cours pour valider de bons prédicteurs de l'efficacité de ces traitements. En effet, comme nous le verrons dans les sections suivantes, les immunothérapies de type inhibiteur de point de contrôle immunitaire ne vont pas apporter de bénéfices pour 40 à 60% des patients. De plus, il s'agit de traitements coûteux, et pouvant être responsables de toxicité importante. Il est donc impératif aujourd'hui d'identifier des biomarqueurs valides de réponse, pour aider à optimiser la sélection des patients.

##### 1. Valeur prédictive de l'expression de PDL-1

A l'heure actuelle, l'expression extracellulaire du PDL-1 sur les cellules tumorales (et également sur les cellules immunitaires dans le cas de l'atezolizumab seulement), évaluée en immunohistochimie, reste le biomarqueur clinique le plus commun pour prédire la réponse aux anti-PD1/PDL-1<sup>176,177</sup>. De nombreuses limitations résident néanmoins dans son utilisation, dues à la non-standardisation des seuils de surexpression du PDL-1, et au fait que son expression soit un processus dynamique (et donc, un seul point de temps de mesure, ou des points de temps de mesure limités ne seraient pas suffisant pour prédire la réponse). L'expression de PDL-1

pourrait également être affectée par les traitements de chimiothérapie/ radiation préalables<sup>176</sup>.

Au regard de ces éléments, une étude récente de phase III dans le CPNPC comparant l'anti-PD1 à la chimiothérapie en première ligne de traitement chez des patients ayant une surexpression de PDL-1 (au moins 50% sur les cellules tumorales), a révélé une survie sans progression et une survie globale significativement plus importante avec l'immunothérapie<sup>178</sup>. Cependant, en vue du manque de consensus actuel sur l'utilisation de PDL-1 comme biomarqueur, plusieurs théories soutiennent l'utilisation de l'anti-PDL-1 en thérapie pour des patients n'ayant pas, ou ayant peu d'expression de PDL-1. Le scénario est également similaire dans le mélanome, le cancer de la vessie ou le carcinome rénal, ou la valeur prédictive de PDL-1 varie en fonction des études<sup>179-181</sup>. A titre d'exemple, dans le carcinome, une association entre l'expression de PDL-1 au seuil de 5% de positivité des cellules tumorales et la réponse au nivolumab a été démontrée dans une étude de Phase II<sup>182</sup>, alors que pour le même seuil de positivité de 5%, cette association n'a pas pu être retrouvée dans deux études similaires<sup>183,184</sup>.

## 2. Valeur prédictive de IDO

Un autre potentiel biomarqueur de réponse pourrait être l'expression d'IDO (Indoleamine 2,3-DiOxygénase), une enzyme catabolisant le tryptophane et ayant une forte activité immunosuppressive<sup>185</sup>. A titre d'exemple, les cancers colorectaux ayant une instabilité des microsatellites expriment souvent IDO, et ont une réponse très favorable au traitement anti-PD1<sup>186</sup>. Dans le mélanome également les patients ayant répondu à la thérapie présentaient un niveau élevé de IDO<sup>179</sup>. En effet, une étude menée sur des tissus issus de 43 patients atteints de mélanome métastatique, en comparant pré-traitement et post-traitement, a démontré que l'expression de IDO1 sur les cellules endothéliales constituait un biomarqueur prédictif robuste<sup>187</sup>.

Une autre investigation dans le modèle préclinique de mélanome B16, utilisant des souris KO pour IDO et un traitement à l'anti-CTLA4, a démontré un délai de croissance tumorale et une durée de vie augmentée par rapport aux souris sauvages, certifiant un rôle critique de IDO dans la résistance anti-tumorale à

l'immunothérapie anti-CTLA4<sup>185</sup>. Le même type d'expérimentation, mais avec un modèle de surexpression d'IDO dans le mélanome B16, a démontré une agressivité supérieure de la croissance tumorale pour B16-IDO par rapport aux cellules parentales *in vivo*, accompagné d'une expansion des MDSC dans le microenvironnement tumoral<sup>188</sup>. Ces données font d'IDO un régulateur clé de l'immunosuppression dans le microenvironnement tumoral, et son expression à la fois dans le microenvironnement et au niveau systémique pourrait être cruciale pour l'élaboration du design thérapeutique. Par ailleurs, davantage d'études devraient émerger pour mieux définir la valeur prédictive et / ou pronostique de IDO.

### 3. Valeur prédictive de la charge mutationnelle

Rizvi *et al.* ont démontré qu'une plus forte charge mutationnelle et antigénique était corrélée à une meilleure efficacité des anti-PD1/PDL-1, notamment dans les cas de CPNPC où le bénéfice clinique observé était durable (réponse partielle ou stable d'une durée supérieure à 6 mois)<sup>189</sup>. Une forte charge mutationnelle, considérée comme une charge de mutations non-synonymes supérieure à 178, et une charge de néo-antigènes élevée ont été associées à un allongement significatif de la survie sans progression<sup>189,190</sup>. Une autre étude sur un effectif de 65 patients atteints de mélanome avancé et traités soit au nivolumab, à l'atezolizumab ou au pembrolizumab, a montré des résultats similaires, où une charge mutationnelle importante (résultats issus de la technologie NGS, pour « Next Generation Sequencing ») était associée à une bonne réponse à l'immunothérapie<sup>191</sup>. Enfin, une étude de phase II dans le carcinome urothélial avancé et métastatique traité à l'atezolizumab impliquant le séquençage ciblé de l'exome des patients, a démontré l'association d'une grande charge mutationnelle avec une réponse complète ou partielle<sup>192</sup>. Néanmoins, dans certaines études, un haut niveau de charge mutationnelle n'est pas toujours corrélé avec une réponse objective au nivolumab et pembrolizumab<sup>193</sup>. Ces résultats suggèrent qu'une forte charge mutationnelle ou antigénique peut servir de facteur pronostique et/ou prédictif du bénéfice clinique dans le cadre de traitements aux anti-PD1/PDL-1, mais que cela peut varier selon les cas d'études.

L'hétérogénéité des néo-antigènes tumoraux, en plus de l'évaluation de la charge mutationnelle, semble être également d'un grand intérêt prédictif : dans des tumeurs

primaires de CPNPC, un bénéfice clinique a été recensé pour des patients qui avaient à la fois une forte charge mutationnelle, et une faible hétérogénéité des néo-antigènes intra-tumoraux (inférieur à 1%), en comparaison au patients présentant seulement une forte charge mutationnelle<sup>194</sup>.

#### 4. Valeur prédictive de l'examen du système immunitaire de l'hôte

Le nombre de neutrophiles, dérivés du sang, a été suggéré comme pouvant avoir une valeur prédictive de réponse à l'ipilimumab. En effet, une étude prospective sur 720 patients atteints d'un mélanome métastatique a démontré qu'un niveau élevé de neutrophiles était associé à une diminution significative de la survie de patients traités à l'ipilimumab<sup>179</sup> : la survie globale moyenne des patients ayant un nombre de neutrophiles  $\geq 7500$  était de 1.55 mois contre 9.4 mois avec un nombre  $\leq 7500$ . Il n'y a pour le moment pas d'études similaires pour les patients suivant un traitement anti-PD1 ou anti-PDL-1.

De façon similaire, le nombre de lymphocyte chez les patients atteints de mélanome métastatique, mesuré avant et pendant le traitement à l'ipilimumab, a été relié à une survie sans progression augmentée<sup>195</sup>. Une autre étude, également dans des cas de mélanomes avancés, a montré une association positive entre la survie globale et l'augmentation du nombre de lymphocytes 12 semaines après l'initiation des traitements<sup>196</sup>. Cependant, une autre étude, toujours dans le mélanome métastatique, a démontré qu'un niveau augmenté de lymphocytes chez des patients traités à l'ipilimumab n'était pas prédictif de la réponse<sup>197</sup>. L'utilisation du nombre de lymphocytes doit donc être interprétée avec précaution comme indicateur de réponse à l'ipilimumab, et n'a pas encore été testé dans le cas du blocage de l'axe PD1/PDL-1.

Le profil des cellules immunitaires des tumeurs solides est considérablement différent de celui des cellules du sang périphérique. De plus, la fonction de ces cellules immunitaires est souvent très différente lorsqu'elles sont à l'intérieur du microenvironnement tumoral comparé au sang périphérique<sup>198</sup>. La présence de cellules immunitaires infiltrant la tumeur peut être facilement réalisée par les techniques d'immunohistochimie (IHC) ou de cytométrie en flux. Ainsi, une forte

infiltration de cellules T CD8+ est souvent corrélée à une meilleure réponse, notamment dans la réponse des patients atteints de mélanome métastatique traités à l'anti-PD1<sup>199</sup>. Cependant, l'IHC ne permet pas de prédire si les cellules T infiltrantes sont fonctionnelles, contrairement à la cytométrie en flux. En effet, la cytométrie en flux a montré que les patients traités au nivolumab ou au pembrolizumab dans le cas du mélanome métastatique présentant plus de 20% de cellules ayant un profil CTLA-4<sup>high</sup> PD-1<sup>high</sup> parmi les cellules CD8+, montraient une réponse favorable au traitement<sup>200</sup>. Curieusement, la réponse clinique n'était associée qu'à la population double positive CTLA-4<sup>high</sup> PD-1<sup>high</sup>, et n'était pas retrouvée pour les populations positives pour un seul de ces marqueurs d'épuisement. D'autres marqueurs d'épuisement des lymphocytes T tels que LAG-3 ou VISTA avant le traitement en co-expression avec PD-1 pourrait se révéler utile pour identifier la réponse.

## 5. Valeur prédictive du microbiote de l'hôte

Enfin, la composition du microbiote de l'hôte pourrait également avoir un impact sur les immunothérapies car certaines études ont démontré dans des modèles murins que les animaux porteurs de mélanomes et colonisés par des espèces de type *Bifidobacterium* avait une augmentation significative de l'efficacité du traitement anti-PDL-1<sup>201</sup>. L'efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA-4 à également été corrélée à la présence de *B. fragilis* dans des modèles précliniques de mélanome<sup>202</sup>. En plus de ces données in vivo, les résultats de trois études de cohortes de patients publiées récemment ont très clairement confirmé le rôle des bactéries intestinales dans la réponse à l'anti-PD1<sup>203</sup>. Zitvogel and al. ont étudié des cohortes de patients atteints de cancer urothélial, du poumon, et du rein, et ont pu établir que les patients ayant reçu des antibiotiques avant ou rapidement après la thérapie anti-PD1 rechutaient plus rapidement et avaient une survie globale inférieure à plus de la moitié des patients n'ayant pas reçu les antibiotiques<sup>204</sup>. L'analyse de la composition du microbiote intestinal de 100 patients atteints de cancer du poumon ou du rein par séquençage métagénomique a révélé que les patients répondeurs pour l'anti-PD1 (maladie sans progression pendant au moins 3 mois) avaient une augmentation significative de la bactérie *Akkermansia muciniphila* en comparaison aux non-répondeurs. La culture d'échantillons fécaux de patients atteints de cancer du poumon a aussi souligné de fortes différences dans la composition bactérienne. De

plus, le transfert de microbiote fécal de patients dans des souris déficientes en germes, ou traitées aux antibiotiques, permet de réinstaurer une réponse aux inhibiteurs des points de contrôles immunitaires<sup>204</sup>. Ce type de transfert de bactéries issues de patients répondeurs dans des modèles syngéniques de mélanome sans germes a permis également une croissance ralentie de la tumeur, une meilleure infiltration de cellules T CD8+, et une meilleure réponse à la thérapie anti-PDL-1. Enfin, les patients ayant une composition favorable du microbiote intestinal ont une infiltration de lymphocytes CD8+ cytotoxiques très importante, et ainsi une réponse immunitaire antitumorale préexistante. Ces données cliniques et précliniques prouvent que la composition du microbiote de l'hôte peut moduler la réponse aux anti-PD1/ PDL-1<sup>204</sup>. Globalement, ces résultats indiquent qu'un microbiote diversifié, et avec la présence de certaines espèces de bactéries favorise l'établissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale de base, qui peut être augmentée par la suite avec l'anti-PD1 avec une réponse clinique favorable, et l'administration d'antibiotiques en parallèle de l'administration des traitements peut diminuer son efficacité. La difficulté de ciblage du microbiote reste toutefois un challenge, avec à l'heure actuelle seulement des méthodes rudimentaires comme les probiotiques ou les prébiotiques pour le moduler.

## V. Les résistances aux anti-PD1 et anti-PDL-1

En dépit de l'activité importante et de l'engouement pour les thérapeutiques de type anti-PD-1 et anti-PDL-1 décrite ci-dessus, l'analyse des essais cliniques a permis d'identifier 3 différentes populations de patients<sup>205</sup> :

- 1) Les patients qui présentent une réponse persistante,
- 2) Les patients qui sont d'emblée réfractaires au traitement (résistance innée, environ 60-90% des patients selon le type de cancer),
- 3) Les patients qui répondent initialement mais qui finissent par développer une progression de la maladie (résistance acquise).

Le challenge consiste aujourd'hui à déterminer les patients répondeurs ou non-répondeurs, une difficulté importante au vu de l'hétérogénéité des profils de réponse lors des traitements aux inhibiteurs de PD1 ou PDL-1. En effet, on observe pour ces

patients une diversité des réactions, qui peut être temporelle (par exemple, une stabilité de la maladie suivie d'une progression), et/ou spatiale (différentes réponses de différentes lésions). La compréhension de ces phénomènes de résistance est cruciale pour étendre le bénéfice à long terme engendré par les anti-PD1/PDL-1 à davantage de patients ayant un cancer avancé.

Les hypothèses concernant la non-réponse aux inhibiteurs des points de contrôles immunitaires peuvent être divisées en 3 catégories :

- 1) Une génération insuffisante de cellules T à vocation anti-tumorale,
- 2) Une fonction insuffisante des cellules T spécifiques de la tumeur,
- 3) Une perturbation dans la formation des cellules T mémoires.

Le manque de néo-antigènes, la perturbation de la formation des néo-antigènes, et/ou l'altération du processus de présentation des néo-antigènes, peut être à l'origine de la diminution de la formation de cellules T spécifiques et réactives envers les cellules tumorales. L'insuffisance de fonction des cellules T peut être due aux divers composants immunosuppresseurs du microenvironnement.

La prochaine section portera sur l'approfondissement de ces mécanismes responsables de la résistance acquise ou innée aux anti-PD1 et anti-PDL-1.

## 1. Résistances innées et acquises

### 1. Insuffisance de production de cellules T anti-tumorales

#### *Influence des néo-antigènes*

Comme nous l'avons vu dans les précédentes parties, il existe des mécanismes intrinsèques à la tumeur permettant à la cellule tumorale de contourner le système immunitaire. Ce processus d'évasion peut être dû à des changements génétiques et épigénétiques, qui vont influencer la production de néo-antigènes et leur présentation, ainsi qu'une perturbation de certaines voies de signalisation cellulaires qui vont bouleverser l'action des lymphocytes T cytotoxiques<sup>206</sup>.

Concernant les mécanismes extrinsèques, ceux-ci incluent les cellules non cancéreuses et les cellules immunitaires, ainsi que d'autres composants spécifiques, tels que le microbiote de l'hôte. Ces différents agents peuvent agir conjointement aux cellules tumorales pour leur permettre de s'accroître et de résister aux inhibiteurs des points de contrôle immunitaires<sup>206</sup>

Lors d'un traitement aux anti-PD1/ PDL-1 provoquant une réponse anti-tumorale, les cellules T sont réactivées et agissent directement sur les cellules tumorales porteuses de mutations. Or, la non-disponibilité de ces antigènes ou une altération dans leur processus de présentation a été associé à un manque de réponse immunitaire anti-tumorale<sup>207</sup>.

Ainsi, une forte charge mutationnelle (ou « Tumor Mutational Burden », TMB) constituerait un facteur intrinsèque de la tumeur primordial à la réponse anti-tumorale, et à la réponse aux anti-PD1/ PDL-1. Plusieurs types tumoraux répondant à ces anticorps confirment cette hypothèse, comme le mélanome, le cancer du poumon et de la vessie, qui arborent un haut niveau de mutations. Cette observation va de pair avec l'observation de Le *et al.*, ayant publié une étude selon laquelle la déficience en éléments de réparation des mésappariements de l'ADN mènerait à une instabilité des microsatellites, associée à une réponse augmentée au blocage de PD1<sup>208,209</sup>. Depuis 2018, l'évaluation du TMB commence à être utilisé comme biomarqueur dans la décision thérapeutique dans le cancer du poumon. Les patients présentant un haut niveau de TMB (défini comme plus de 10 mutations par mégabase), présenteraient une meilleure réponse à l'immunothérapie qu'avec la chimiothérapie de référence. Pour ces patients, le traitement de première ligne avec l'ipilimumab en combinaison au nivolumab a démontré un bénéfice important, avec une survie sans progression à 1 an équivalente à 42.6% en comparaison à 13.2% avec la chimiothérapie, validant le rôle du TMB comme biomarqueur pour la sélection des patients<sup>210</sup>.

Certaines altérations de gènes codant pour des protéines responsables de la présentation antigénique identifiées en clinique dans le mélanome métastatique, comme la beta 2 microglobuline, CMH-I ou la sous-régulation de HLA-I, peuvent également être responsable de la résistance à l'anti-PD-1<sup>211</sup>.

Les néo-antigènes semblent également avoir un rôle controversé dans l'apparition de la résistance acquise. Bien que les néo-antigènes clonaux soient associés à une bonne réponse des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires, l'évolution de l'environnement mutationnel a également été décrit pour des patients atteints de cancer du poumon ayant développé une résistance acquise à ces anticorps<sup>212</sup>.

Plusieurs stratégies thérapeutiques sont aujourd'hui en cours, pour augmenter la mort immunogène (comme les combinaisons d'inhibiteurs des points de contrôles avec de la radiation, ou des chimiothérapies), ou pour amplifier la présentation antigénique en stimulation des CPA et la réponse immunitaire innée (par exemple, à l'aide de virus oncolytiques ou d'administration d'IFN). La mort cellulaire immunogène est une mort cellulaire déclenchant une réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales<sup>213</sup>. Elle est différente des autres mécanismes de mort cellulaire, comme la nécrose ou l'apoptose, qui ne stimulent que faiblement le système immunitaire. A titre d'exemple, l'oxaliplatine, la doxorubicine et la cyclophosphamide sont des molécules chimiothérapeutiques induisant une mort cellulaire immunogène<sup>13,214,215</sup>. Ainsi, ces alternatives thérapeutiques permettraient la libération ou la présentation de néoantigènes dans un contexte de microenvironnement pauvre en cellules immunitaires<sup>206</sup>.

D'autres stratégies se développent également avec le blocage de facteurs immunosuppresseurs comme l'IL-10 ou le VEGF, pour promouvoir la migration, la maturation et les fonctions des CPA, et permettre l'initiation des lymphocytes T<sup>206</sup>

### *Importance des voies de signalisations oncogéniques*

Certaines voies de signalisations oncogéniques peuvent également jouer un rôle dans l'expansion et dans le type d'infiltration immunitaire intratumoral. Par exemple, dans des modèles précliniques de mélanome puis en clinique, également dans le mélanome, la perte de PTEN dans les cellules tumorales a été associée à une diminution des lymphocytes T infiltrants, et à une augmentation de VEGF et CCL2, et a été reliée à la résistance à l'anti-PD1<sup>216</sup>.

Récemment, toujours dans les cas de patients atteints de mélanome, une signature a été identifiée dans le cas de la résistance innée à l'anti-PD1 (IPRES pour Innate PD1 RESistance), qui comprend notamment l'intervention de cytokines suppressives, de

facteurs pro-angiogéniques et de facteurs de transcription de la transition épithélio-mésenchymateuse. L'un des composants de l'IPRES est le récepteur tyrosine kinase AXL, également impliqué dans la résistance aux inhibiteurs de BRAF et MEK, lorsqu'il est surexprimé.

En 2015, Sprangler *et al.* ont décrit que des altérations dans la voie de signalisation  $\beta$ -caténine/Wnt dans le mélanome humain métastatique seraient responsables de la diminution d'infiltration des cellules dendritiques, via la diminution de la chimiokine CCL4, et par conséquent de la diminution de la réponse anti-tumorale<sup>217</sup>.

Ces mutations peuvent également influencer le type d'infiltration immunitaire. Par exemple, dans un modèle préclinique d'adénocarcinome pulmonaire, Koyama and al ont démontré que la perte de certains gènes lors de mutations intervenant dans la voie de signalisation oncogénique Kras augmente la production d'IL-6, qui diminue l'infiltration des cellules T, et est associé à un niveau d'expression plus important des récepteurs responsables de l'épuisement des cellules T (tels que TIM-3 et PD1). Ces modifications sont également accompagnées d'une diminution de l'expression de PDL-1 sur les cellules tumorales<sup>218</sup>.

Enfin, dans des modèles précliniques 4T1 et CT26 peu immunogènes, Kim et al ont montré que l'altération de la méthylation de régions non-codantes du génome pourrait impacter la réponse aux anticorps inhibiteurs des points de contrôle immunitaires. Certains agents modulant la méthylation pourraient induire une réponse immunitaire innée, et ainsi influencer le recrutement des cellules T et leur action cytotoxique, mais aussi moduler les éléments immunosuppresseurs du microenvironnement, en particulier les MDSC<sup>219</sup>.

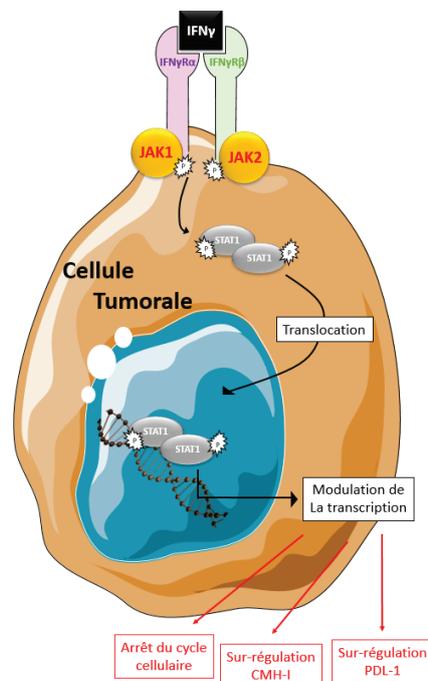
## 2. Insuffisance de la fonction anti-tumorale des cellules T

Lorsque la présentation des néo-antigènes s'effectue correctement et que l'initiation des cellules T est mise en place, ces cellules T anti-tumorales vont devoir faire face à un microenvironnement très inhospitalier, pouvant limiter l'efficacité des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire<sup>206</sup>. On observe par exemple dans certaines tumeurs un haut niveau de PDL1, ainsi que des autres checkpoints alternatifs sur les cellules T (comme PD-1, TIM-3, CTLA-4)<sup>218</sup>. Une augmentation des cytokines

immunosuppressives peut également être mise en place, et entraîner le recrutement de cellules immunosuppressives de type MDSC ou Treg<sup>205,220</sup>.

### *Impact des mutations de la voie interféron*

Des mutations dans les voies de signalisation de la fonction effectrice immunitaire peuvent aussi annuler l'efficacité anti-tumorale spécifique des cellules T. Le séquençage entier de l'exome de tumeurs de mélanome de patients ayant développé une résistance suivant le traitement à l'anti-PD1 après une réponse initiale (résistance acquise) a révélé des mutations dans les kinases Janus 1 et 2 (JAK1/JAK2)<sup>211,221</sup>. Ces mutations sont accompagnées de la délétion de l'allèle sauvage, entraînant une perte totale de la réponse interféron gamma, et notamment de son effet anti-prolifératif sur les cellules tumorales<sup>222</sup> (Figure 10).



**Figure 10 - Schéma simplifié de la voie de signalisation JAK1/JAK2.**

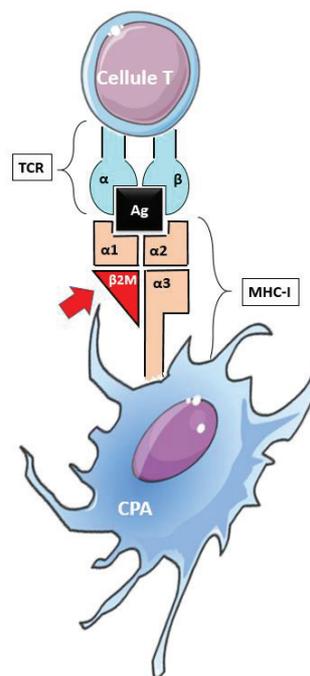
Lorsque l'interféron gamma (IFNγ) présent dans le microenvironnement se lie au domaine extracellulaire du récepteur IFNγ (constitué des 2 sous-unités IFNγRα et IFNγRβ), cela résulte en une phosphorylation de JAK1 et JAK2. L'homodimère STAT1 va alors être recruté, et phosphorylé. L'homodimère STAT1 phosphorylé va ensuite passer dans le noyau, et moduler l'expression de certains gènes, permettant l'arrêt du cycle cellulaire, et la sur-régulation du CMH-I et de PDL-1.

Ces pertes de fonction liées aux mutations des gènes JAK1/JAK2 sont confirmées *in vivo*, par une étude CRISPR dans un modèle murin de mélanome, démontrant que la

délétions de récepteurs à l'IFN $\gamma$ , et des composants de la voie JAK/STAT (JAK1, JAK2 et STAT1, Figure 10) induit une résistance à l'anti-PD1<sup>223</sup>.

Cependant, une étude pré-clinique par Benci *et al.* sur un modèle murin immunocompétent de mélanome, a prouvé que la résistance aux inhibiteurs de points de contrôles immunitaires pourrait être surmontée par l'inhibition de JAK1/JAK2<sup>224</sup>. Ainsi, la voie JAK/STAT pourrait avoir un rôle complexe dans la résistance, et devraient être largement plus approfondie dans les années à venir<sup>225</sup>.

L'étude de Zaretsky *et al.* a également démontré une mutation de B2M, et par conséquent une expression insuffisante du CMH-I, résultant en un défaut dans la présentation antigénique (Figure 11).



**Figure 11 - Schéma simplifié de l'implication de  $\beta 2M$  dans la présentation antigénique.**

La  $\beta 2$  microglobuline ( $\beta 2M$ ) est un composant essentiel du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH-I) : elle s'associe à la chaîne  $\alpha 3$  de ce dernier, et ne possède donc pas de région transmembranaire. La présentation de l'antigène (Ag) se réalise alors par la liaison entre le CMH-I sur la cellule présentatrice d'antigène (CPA) et le récepteur de la cellule T (TCR).

Ces mutations ont pour l'instant été identifiées dans peu d'études, mais une généralisation du séquençage des tumeurs devrait les confirmer et identifier de nouvelles mutations responsables de la résistance innée ou acquise aux anti-PD1/PDL-1.

### *Importance de l'expression du PDL-1*

Dans le microenvironnement tumoral, l'expression de PDL-1 est induite en réponse à des signaux cellulaires intrinsèques, et en réponse à des dérivés solubles relargués par les cellules T, tels que l'IFN $\gamma$ .<sup>222</sup> Cette expression de PDL-1 est liée à une réponse favorable dans certains types de cancers (CPNPC), et des études préliminaires de biopsies de mélanomes de patients traités à l'anti-PD1 suggèrent que l'induction de PDL-1 sur les cellules tumorales à un temps précoce durant la thérapie augmente la prédiction de réponse<sup>226</sup>. Néanmoins, comme vu précédemment dans la description des biomarqueurs, le PDL-1 reste un biomarqueur imparfait et son expression ne garantit pas toujours la réponse aux inhibiteurs de la voie PD1/PDL-1.

### *Expression de points de contrôles immunitaires alternatifs*

L'expression de points de contrôles immunitaires alternatifs a également été associée à une résistance à l'anti-PD1. A titre d'exemple, le blocage de PD1 a été associé à une surexpression de TIM3<sup>218</sup>, et la combinaison d'anticorps TIM3/PD1 a démontré une réponse augmentée dans des modèles précliniques de cancer du poumon<sup>227</sup>.

La sur-régulation de points de contrôles alternatifs a également été documentée en réponse à la monothérapie anti-PD-1, dont une augmentation de TIM-3 dans un modèle préclinique de cancer de la tête et du cou<sup>228</sup>, une sur-régulation de PD1, LAG-3 et CTLA-4 dans un modèle préclinique de cancer de l'ovaire métastatique<sup>229</sup>, et une sur-régulation de VISTA après la monothérapie ipilimumab dans un modèle préclinique de cancer de la prostate<sup>230</sup>.

Ces études suggèrent ainsi un rôle critique des sous-populations de lymphocytes T CD8 cytotoxiques PD1+ et co-exprimant d'autres points de contrôles inhibiteurs, et des études supplémentaires devraient voir le jour pour déterminer la façon de cibler les sous-populations CD8 et CD4 spécifiques pour empêcher les résistances innée et acquise.

### *Impact des cellules immunosuppressives*

Les cellules immunosuppressives influençant l'efficacité des inhibiteurs des points de contrôles immunitaires, identifiées dans des modèles précliniques incluent notamment les Treg, MDSC et M2. Les MDSC, notamment, suppriment la réplication des cellules T et leur fonction par l'intermédiaire de divers mécanismes, comme la génération de stress oxydatif, la déplétion de nutriments nécessaires spécifiquement aux lymphocytes, et l'augmentation des Treg.<sup>231</sup>

Par conséquent, la déplétion des cellules immunosuppressives augmente l'efficacité expérimentale de l'anti-PD1, et permet ainsi de surmonter la résistance innée. Par exemple, Highfill *et al.* ont décrit une augmentation de l'effet anti-tumoral de l'anti-PD1 après une thérapie anti-CXCR2, qui inhibe les MDSC infiltrants la tumeur<sup>232</sup>.

D'autre part, le catabolisme du tryptophane par l'enzyme IDO au sein du microenvironnement tumoral est reconnu comme un suppresseur de la réponse anti-tumorale. En effet, son catabolisme produit des métabolites immunosuppresseurs qui vont induire l'anergie et l'apoptose des lymphocytes T<sup>206</sup>. Des études cliniques sont par ailleurs en cours, avec le blocage d'IDO combiné aux inhibiteurs de point de contrôle immunitaire. L'arginase 1 pourrait également coopérer avec IDO pour exercer une inhibition des cellules dendritiques.

### 3. Production insuffisante de lymphocytes T mémoires

Un des aspects fondamentaux de l'engouement pour les inhibiteurs des points de contrôles immunitaires réside dans la durée de réponse à long terme. Par conséquent, même si les anti-PD1/PDL-1 permettent de régénérer les lymphocytes T temporairement, si la production des lymphocytes T mémoires est insuffisante, il existe une forte probabilité de résistance acquise et de récurrence. En effet, l'expansion des lymphocytes T<sub>EM</sub> intra tumoraux en réponse à l'inhibition de PD1 a déjà été démontrée, et est plus importante chez les patients répondant à la thérapie<sup>233</sup>. Les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'expansion des T<sub>EM</sub> ne sont pas encore bien décrits, cependant certaines études dans des modèles souris et humains d'infections virales chroniques, ont identifié des facteurs de transcription associés aux étapes d'épuisement des lymphocytes T naïfs, effecteurs et mémoires. Il semblerait que l'épuisement des lymphocytes soit associé à des changements épigénétiques distincts entre les cellules mémoires et effectrices<sup>234</sup>. Ces

modifications épigénétiques limiteraient la durée de fonctionnement des cellules T CD8 après l'inhibition de PD1. De plus, la requête d'une réponse des T<sub>EM</sub> pourrait être limitée dans certaines conditions, notamment en cas de persistance des antigènes tumoraux.

## 2. Les futurs traitements pour contourner la résistance

Pour lutter contre les phénomènes de résistance vus précédemment, de nombreux essais cliniques de combinaison d'inhibiteurs de point de contrôle immunitaire avec des chimiothérapies, thérapies ciblées, ou radiation sont actuellement en cours. Ces combinaisons sont à des stades de développement variés et pour des types tumoraux très différents<sup>235</sup>.

L'une des stratégies consiste à combiner les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire avec des agents génotoxiques<sup>236,237</sup>. Des études clés ont démontré que la mort immunogène de la cellule due à certains agents chimiothérapeutiques pouvait activer certains récepteurs de l'immunité innée, qui vont eux-mêmes promouvoir la capture des antigènes, l'activation des CPA, et faciliter l'interaction entre CPA et cellules endommagées<sup>235</sup>.

En plus des chimiothérapies, la combinaison des anti-PD1/PDL-1 avec des thérapies ciblées semble également prometteuse. Dans ce sens, une étude récente de phase I de combinaison de l'anti-PD1 avec un virus oncolytique atténué dans le mélanome a montré une réponse clinique spectaculaire de 62%, en comparaison à un taux de 30% pour l'utilisation de l'anti-PD1 en monothérapie<sup>238</sup>. D'autres méthodes consistent également à utiliser des agonistes des récepteurs de l'immunité innée. Par exemple, l'addition de STING, agoniste de ce type de récepteur, au blocage de la voie PD1/PDL-1 s'est révélée efficace sur des tumeurs établies difficiles à traiter.<sup>239</sup>. D'autres agonistes des Toll-like récepteurs sont également actuellement testés en combinaison aux anti-PD1/PDL1<sup>240</sup>.

Une alternative encourageante consiste également à combiner plusieurs inhibiteurs de point de contrôle immunitaire : par exemple, dans certains modèles pré-cliniques, le co-blocage de TIM3 et de PD1 est plus efficace que les anticorps utilisés en monothérapie, en raison d'une importante sous-population de cellules T PD1+TIM3<sup>241</sup>. De plus, Koyama *et al.* ont révélé en 2016 un haut niveau de TIM3

chez les souris ainsi que chez les patients, après une résistance acquise à la thérapie anti-PD1<sup>218</sup>. Une autre approche comporte l'élargissement des types cellulaires immunitaires ciblés. Par exemple, VISTA, un membre de la famille des Ig, est exprimé à la fois sur les cellules T mais aussi les macrophages, les cellules dendritiques, les Treg et les NK<sup>235</sup>. Ainsi, dans des modèles murins, l'anti-VISTA en combinaison à l'anti-PD1 améliore la réponse immunitaire anti-tumorale<sup>242</sup>. Dans ce sens, certaines thérapies qui ciblent spécifiquement des populations particulières du microenvironnement peuvent également être utilisées, comme des anti-CD25 (anti-Treg), qui augmentent l'efficacité de l'anti-PD1 dans des modèles de tumeurs établies<sup>243</sup>. Enfin, de nombreuses études sont également en cours, utilisant des agonistes de CD27 pour promouvoir les cellules T CD4, qui vont elle-même activer les cellules T CD8<sup>244</sup>.

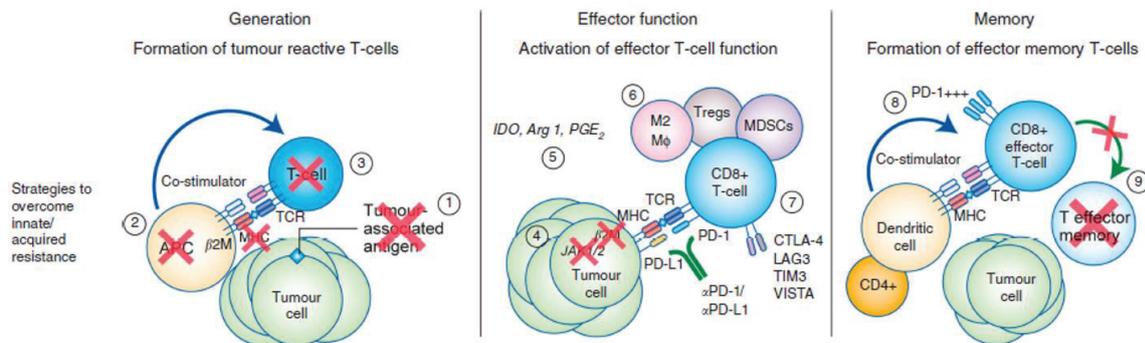
Certaines études de preuve de concept chez la souris ont ensuite démontré l'efficacité de la décitabine, un inhibiteur de la méthylation, en combinaison à l'anti-PD1 sur la prolifération des cellules T spécifiques de l'antigène, et donc une réponse anti-tumorale amplifiée dans un modèle murin de cancer de la prostate.

Une autre stratégie pour augmenter l'efficacité de l'anti-PD1 consiste à le combiner avec des agonistes d'activateur des cellules immunitaires, de type ICOS ou OX-40<sup>244</sup>. Comme nous l'avons vu précédemment, la génération d'une réponse optimale des cellules T CD8 nécessite l'activation du TCR puis la co-stimulation, qui peut être assurée par la liaison avec un membre de la famille des récepteurs TNF, dont font parti OX-40 (autrement appelé CD134), 4-1BB (CD137), et ICOS. En particulier, le traitement avec un anticorps monoclonal agoniste de OX-40 augmente la différenciation et la fonction cytolytique des lymphocytes T, favorisant ainsi l'immunité anti-tumorale<sup>245</sup>. Utilisé en clinique en monothérapie, les agonistes de OX-40 permettent d'induire une réponse immunologique chez les patients atteints de cancers métastatiques. Dans un modèle murin de cancer de l'ovaire, le blocage de PD1 en combinaison avec un agoniste de OX-40 protège de la progression tumorale de manière synergique<sup>246</sup>. De façon similaire, le traitement avec un agoniste de 4-1BB en combinaison avec l'IL-12 a démontré de très forte propriétés anti-tumorales dans le mélanome B16-F10 et dans un modèle préclinique de cancer du poumon métastatique<sup>247</sup>.

Concernant l'axe ICOS/ICOS-L, son rôle dans l'oncogenèse reste encore mal identifié. Il pourrait participer à la réponse anti-tumorale des cellules T, mais également participer à la réponse pro-tumorale en raison de sa connexion avec les Treg et leur activité suppressive. Ainsi, les agonistes et les antagonistes de la voie ICOS/ICOS-L représenteraient tous deux un intérêt dans le traitement du cancer. Dans des modèles précliniques de mélanome et de cancer de la prostate, un agoniste d'ICOS a démontré un effet synergique avec l'anti-CTLA-4, accompagné d'une augmentation des ratios CD8/Treg et CD4 Teff/Treg<sup>248</sup>. La stimulation d'ICOS a également démontré une forte activité anti-tumorale dans le modèle pré-clinique de mélanome B16<sup>249</sup>. Deux agonistes de ICOS sont actuellement évalués en clinique, l'un en phase I dans des tumeurs solides en combinaison avec le pembrolizumab<sup>250</sup>, l'autre en phase I/II, également dans des tumeurs solides, en monothérapie ou en combinaison avec le nivolumab. Les derniers rapports ont par ailleurs révélé un bon profil de tolérance<sup>251</sup>. Concernant les antagonistes anti-ICOS, l'inhibition de la voie ICOS diminuerait la prolifération et la fonction des Treg, représentant une stratégie clinique efficace pour empêcher l'échappement des cellules tumorales<sup>252,253</sup>. Notamment, dans un modèle in vitro de lymphome folliculaire, la génération des Treg diminue à la fois avec l'agoniste anti-ICOS et l'agoniste anti-ICOS-L. (Follicular B lymphomas generate regulatory T cells via the ICOS/ICOSL pathway and are susceptible to treatment by anti-ICOS/ICOSL therapy). Plus récemment, l'équipe de Mo et al. a étudié la déplétion des cellules T reg ICOS+ en combinaison à un vaccin GM-GSF modifié dans un modèle murin de cancer de la prostate. La combinaison s'est révélée plus efficace que les monothérapies, accompagné d'une diminution significative des Treg ICOS+<sup>254</sup>.

Enfin, l'implication évidente de la modification de plusieurs voies de signalisation, comme vu précédemment, font par exemple de JAK/STAT et WNT des cibles attractives dans les cas de résistance à l'anti-PD1.

La figure ci-dessous résume le rationnel de différents designs de combinaison avec les inhibiteurs des points de contrôles immunitaires, en fonction des cas (Figure 12).



Combinaison d'inhibiteurs de points de contrôles immunitaires (ICI)	Exemples	Mécanismes potentiels
Thérapie utilisant des ICI en monothérapie/ en combinaison	Anti-PD1, anti-PDL-1, anti-CTLA-4, anti-TIM3, anti-LAG3	Points de contrôle immunitaire inhibiteurs alternatifs (7) Epuisement sévère des cellules T (8)
ICI + agents activateurs de l'immunité	Anti-OX40, anti-4-1BB, anti-CD40, anti-ICOS, virus oncolytiques, agonistes du TLR, vaccins, activateurs des NK	Manque de néo-antigènes, ou niveau insuffisant (1) Altération de la présentation des antigènes tumoraux (2) Altération de l'infiltration immunitaire intra-tumorale (3) Altération du signal IFN $\gamma$ (4) Points de contrôle immunitaire inhibiteurs alternatifs (7)
ICI + inhibiteurs métaboliques	Inhibiteurs d'IDO	Médiateurs métaboliques (5) Cellules immunosuppressives (6)
ICI + thérapies ciblées	Inhibiteurs de BRAF/ MEK, de VEGF, de EGFR, de PARP, de mTOR	Altération de l'infiltration immunitaire intra-tumorale (3) Altération du signal IFN $\gamma$ (4) Points de contrôle immunitaire inhibiteurs alternatifs (7)
ICI + modulateurs épigénétiques	Agents hypométhylants	Altération de l'infiltration immunitaire intra-tumorale (3) Altération du signal IFN $\gamma$ (4) Modifications épigénétiques des cellules T (9)
ICI + chimiothérapies	Doxorubicine, paclitaxel, carboplatine, gemcitabine, et combinaisons	Manque de néo-antigènes, ou niveau insuffisant (1)
ICI + radiation	Radiations	Manque de néo-antigènes, ou niveau insuffisant (1)

**Figure 12 – Résumé des stratégies de combinaisons thérapeutiques pour lutter contre la résistance aux inhibiteurs des points de contrôle immunitaires**

(Adapté de Sharma et al., 2017)

## VI. Modèles précliniques d'étude de la résistance aux anti-PD1 et anti-PDL-1

Comme nous l'avons vu précédemment, les mécanismes responsables de la résistance aux inhibiteurs de points de contrôles immunitaires restent à ce jour peu connus. Une stratégie émergente réside à étudier les mécanismes de réponse et de résistance en réalisant des prélèvements de tumeurs au fur et à mesure du suivi de traitement<sup>255</sup>. Cependant, il existe peu de modèles précliniques modélisant la

résistance à l'heure actuelle, en vue d'obtenir des données préliminaires pouvant expliquer ces phénomènes de résistance.

Koyama et al. ont modélisé la résistance acquise à l'anti-PD1 en réalisant une répétition de traitements anti-PD1 dans des souris immunocompétentes ayant un cancer du poumon induit, jusqu'à ne plus obtenir d'effets du traitement<sup>218</sup>. Les tumeurs ayant acquis une résistance au traitement étaient alors définies comme des tumeurs ayant eu une réponse thérapeutique initiale (stabilité ou régression), suivie d'une croissance supérieure à 120% de la taille originale de la tumeur.

D'autres stratégies consistent à étudier les voies de signalisation dans les tumeurs de patients présentant une résistance aux traitements, puis d'étudier ses voies sur des modèles animaux : c'est le cas de Rivzi et al., qui ont identifié l'implication de la voie WNT/ $\beta$ -cathénine et l'absence de signature T-cell dans les tumeurs métastatiques de mélanomes de patients via une analyse moléculaire. Ils ont par la suite utilisé des modèles murins de mélanome métastatique, et ont ainsi pu identifier le mécanisme par lequel la signalisation  $\beta$ -cathénine intrinsèque à la tumeur provoque l'exclusion des cellules T, responsable de la résistance aux thérapies monoclonales anti-PDL-1 et anti-CTLA4<sup>217</sup>. Une autre étude, utilisant la culture in vitro, a également défini des mécanismes génétiques de résistance innée au blocage de PD-1 menant à l'inhibition de l'expression adaptative de PDL-1 à partir de lignées cellulaires de mélanome et de biopsies de patients<sup>221</sup>.

Ainsi, la majorité des investigations sur la résistance, innée ou acquise, se réalisent sans modèles murins, et la pertinence dans les cancers humains doit être étudiée de façon plus approfondie.

## CHAPITRE II. RÉSULTATS – ÉTUDES DE COMBINAISONS DE CHIMIOTHERAPIES AVEC LES INHIBITEURS ANTI-PD1 ET ANTI-PDL-1

Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes, le traitement de certains types de cancer par les anticorps monoclonaux anti-PD1 et anti-PDL-1 n'apporte pas de bénéfice pour la plupart des patients. On dénombre ainsi environ 60% de résistances innées à ces thérapies, et aux alentours de 25% de résistances acquises après une réponse primaire. Ainsi, de nombreuses études précliniques et cliniques ont aujourd'hui pour objectif d'optimiser la réponse aux inhibiteurs des points de contrôles immunitaires, notamment par le biais de combinaisons avec d'autres agents thérapeutiques.

Ce chapitre rapporte nos travaux visant à analyser la potentialisation éventuelle du blocage de la voie PD1/PDL-1 avec des chimiothérapies de référence, adaptées au type de cancer étudié. Pour cela, nous avons au préalable testé différents cocktails chimiothérapeutiques, et à différentes doses, pour chaque modèle tumoral. Nous avons ainsi choisi la combinaison de capécitabine + oxaliplatine comme chimiothérapie standard dans le cancer du colon MC38, la combinaison methotrexate + vincristine + doxorubicine + cisplatine (MVAC) dans le cancer de la vessie MB49 et MBT-2, et un mélange de cyclophosphamide + doxorubicine dans le cancer du sein métastatique 4T1. Nos résultats ont ainsi démontré une potentialisation de l'anti-PD1 avec la chimiothérapie dans le modèle MC38, et de l'anti-PDL-1 avec le MVAC dans le modèle MB49, aucun effet de la combinaison dans le modèle 4T1, et une inhibition de l'activité de l'anti-PDL-1 dans le modèle MBT-2. L'analyse immunophénotypique a ensuite révélé de fortes différences de base entre les modèles, qui ont toutefois en commun d'être largement infiltré par des cellules arborant un phénotype immunosuppresseur. Le ratio cellules effectrices / cellules immunosuppressives peut ensuite être inversé avec certaines combinaisons de traitements, dont c'est fortement le cas dans le modèle 4T1. Cependant, ces inversions favorables ne sont pas toujours reliées à un effet anti-tumoral *in vivo*.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication acceptée dans la revue *Frontiers In Immunology*.

# THE ANTITUMOR ACTIVITY OF COMBINATIONS OF CYTOTOXIC CHEMOTHERAPY AND IMMUNE CHECKPOINT INHIBITORS IS MODEL-DEPENDENT

## Authors

Chloé Grasselly<sup>1,2</sup>, Morgane Denis<sup>1,2</sup>, Aurore Bourguignon<sup>1,2</sup>, Nolan Talhi<sup>2</sup>, Doriane Mathe<sup>2</sup>, Anne Tourette<sup>2</sup>, Laurent Serre<sup>3</sup>, Lars Petter Jordheim<sup>1</sup>, Eva Laure Matera<sup>1</sup>, Charles Dumontet<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Anticancer Antibodies, CRCL, INSERM U1052, CNRS UMR 5286, CLB, UCBL, Lyon, France

<sup>2</sup>ANTINEO, Lyon, France

<sup>3</sup>Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, France

<sup>4</sup>Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

## Keywords

Combination therapy – PD-1 – PD-L1 – chemotherapy – oncology – tumor microenvironment – preclinical mouse models

## Acknowledgment

We acknowledge Alain Bergeron and François Radvanyi for providing MB49 and MBT-2 cell lines.

This work was supported in part by the Lyric Grant INCa-DGOS-4664.

## Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed

## Corresponding Author

Pr. Charles Dumontet, Anticancer Antibodies, CRCL, INSERM U1052, CNRS UMR 5286, CLB, UCBL, Lyon, France. ANTINEO, Lyon, France. Faculté Rockefeller, 8 avenue Rockefeller, 69008, Lyon, France. Phone: 33 4 78 77 72 36 Email: [charles.dumontet@chu-lyon.fr](mailto:charles.dumontet@chu-lyon.fr)

## Abstract

In spite of impressive response rates in multiple cancer types, immune checkpoint inhibitors (ICIs) are active in only a minority of patients. Alternative strategies currently aim to combine immunotherapies with conventional agents such as cytotoxic chemotherapies. Here, we performed a study of PD-1 or PDL-1 blockade in combination with reference chemotherapies in four fully immunocompetent mouse models of cancer. We analyzed both the *in vivo* antitumor response, and the tumor immune infiltrate four days after the first treatment. *In vivo* tumor growth experiments revealed variable responsiveness to ICIs between models. We observed enhanced antitumor effects of the combination of immunotherapy with chemotherapy in the MC38 colon and MB49 bladder models, a lack of response in the 4T1 breast model, and an inhibition of ICIs activity in the MBT-2 bladder model. Flow cytometry analysis of tumor samples showed significant differences in all models between untreated and treated mice. At baseline, all the tumor models studied were predominantly infiltrated with cells harboring an immunosuppressive phenotype. Early alterations of the tumor immune infiltrate after treatment were found to be highly variable. We found that the balance between effector cells and immunosuppressive cells in the tumor microenvironment could be altered with some treatment combinations, but this effect was not always correlated with an impact on *in vivo* tumor growth. These results show that the combination of cytotoxic chemotherapy with ICIs may result in enhanced, similar or reduced antitumor activity, in a model- and regimen-dependent fashion. The present investigations should help to select appropriate combination regimens for ICIs.

## Introduction

Immune checkpoint inhibitors (ICI), such as anti-PD-1 (Programmed cell death 1) or anti-PD-L1 (Programmed death-ligand 1) antibodies, are among the most important recent breakthroughs in oncology. As an example, monoclonal anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies (mAb) showed impressive efficacy in clinical trials for the treatment of unresectable or metastatic melanoma, metastatic non-small cell lung cancer, renal cancer, and more recently for urothelial carcinoma and Hodgkin's lymphoma (1–7). These monoclonal antibodies block the interaction between PD-1 (Programmed Death 1) molecule, expressed at the surface of T cells and other immune cells, and PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1), expressed in multiple types of cancer cells. The PD-1/PD-L1 axis induces an inhibitory signal in T cells, and PD-1/PD-L1 pathway blockade restores T cell function resulting in increased proliferation and cytotoxic activity, subsequently improving anti-tumor immune response (8).

Unfortunately, a non-negligible proportion of patients presents with innate resistance to PD-1/PD-L1 axis blockade, particularly because of lack of expression of PD-L1 by tumor cells or to the immunosuppressive effect of the tumor microenvironment. As a consequence some common cancer types have very low response rates, such as breast and prostate cancer (9,10). More alarmingly, a significant subpopulation of patients treated with ICI who presented an initial response to therapy will develop acquired resistance, with disease progression after some period of time. Zaretsky et al. highlighted mutations in beta-2-microglobulin, resulting in reduced HLA class I surface expression, as a cause for acquired resistance to anti-PD-1 mAb therapy. In an additional study, they described mutations in JAK1 and JAK2, involving the interferon gamma pathway (10–12). Further hypotheses for this resistance phenotype include genetic alterations (mutations, deletions, epigenetic modifications) which can lead to altered expression of tumor neo-antigens (10). Expression of alternative checkpoints such as LAG-3, TIGIT, TIM-3 and ICOS in the tumor microenvironment may also play a key role regarding clinical outcomes and are currently being explored. Evidence of immune checkpoint expression modulation in association with acquired resistance to anti-PD-1 has been shown by Koyama et al., with an up-regulation of TIM-3 (13).

For this reason, it is crucial to develop new therapeutic approaches to enhance the therapeutic effects of PD-1/PD-L1 blockade, and to avoid resistance phenomena. To this end, efforts are currently engaged including the use of conventional chemotherapies to improve the anti-tumor activity of monoclonal antibodies. Some of these combination strategies are currently studied in various cancer types (14–20). One of the aims of combining chemotherapy with ICI is to trigger antigen release via the cytotoxic cell death activity of chemotherapy leading to immune stimulation and improving the activity of PD-1 / PD-L1 blocking agents. Moreover, the impact of

chemotherapies on the leucocyte composition of the tumor infiltrate might be crucial: as an example, cyclophosphamide has been described to decrease the proportion of regulatory T cells (Treg) and gemcitabine has been outlined to reduce MDSC, two immunosuppressive cell populations usually associated with bad prognosis in cancer (21–23). Several clinical phase I trials combining ICI and chemotherapies are currently ongoing, in particular in NSCLC, with nivolumab in combination with associations of cisplatin and gemcitabine, cisplatin and pemetrexed or carboplatin and paclitaxel, as well as pembrolizumab in combination with two different chemotherapies (15). Overall, the cytotoxic role of chemotherapy potentially drives immune activation, supporting the study of combinations between ICI and chemotherapies (20,24,25).

To explore the possible interaction between conventional regimens and ICIs, we evaluated four preclinical models in order to determine the impact on the in vivo efficacy of these combinations, and to analyse the consequences on the tumor microenvironment.

## Results

### **The combination of cytotoxic chemotherapy regimens with anti-PD-1 or anti-PD-L1 antibodies impacts differently on anti-tumor activity**

We performed an exploratory study of various combination regimens of chemotherapies with immune checkpoint blockers anti-PD-1 and anti-PD-L1, in several murine syngeneic preclinical models. The chemotherapeutic regimens were chosen in order to be similar to those used in the chosen tumor types in patients: capecitabine and oxaliplatin for MC38 colon cancer, methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin (MVAC regimen) for MB49 and MBT-2 bladder cancers, and cyclophosphamide and doxorubicin for 4T1 breast cancer. These combination regimens were first evaluated at different dose levels chose in order to induce acceptable toxicity (no impact on animal well-being and less than 10% loss of body weight). In some cases however these maximally tolerated chemotherapy regimens did not significantly impact on the tumor growth of established tumors in some models (MC38, MB49 and MBT-2). In the case of the MVAC regimen an attempt to increase dosages was associated with unacceptable toxicity and we chose to use a regimen which was tolerable in the case of repeated administrations.

The combination of the ICI with cytotoxic regimens proved to be more effective than either regimen used separately for the combination of capecitabine/oxaliplatin with anti-PD-1 Mab in the MC38 colorectal cancer model (Fig 1D) as well as with the combination of MVAC with anti-PD-L1 Mab in the MB49 bladder cancer (Fig 1C) while anti-PD-1 in combination with the MVAC regimen did not show any improved activity in the MB49 model (FigS2B). In the 4T1 breast cancer model, the

combination of cyclophosphamide/doxorubicin with anti-PD-1 or anti-PD-L1 Mabs did not show any increased anti-tumor effect (Fig 1B and Fig S2A). Conversely, the combination of MVAC regimen with anti-PD-L1 in the MBT-2 bladder cancer model significantly reduced anti-tumor activity in comparison to single agent anti-PD-L1 (Fig 1A). While anti-PD-L1 antibodies yielded stabilization of established MBT-2 xenografts, MVAC did not have a significant impact in this model. Conversely the combination of both treatment regimens was not significantly different from untreated controls (repeated in two separate experiments). Anti PDL1 antibodies are promising agents for the treatment of patients with bladder cancer (26,27). Of interest several trials are ongoing in patients with bladder cancer comparing anti PD-L1 antibodies with other regimens but there are currently no studies comparing the combination of the classical MVAC regimen with this antibody (clinicaltrials.gov).

These results show that the combination of a cytotoxic regimen with an ICI may have different consequences, including enhanced activity, no impact of the combination or a reduced anti-tumor activity. Remarkably the MVAC regimen had a different impact when combined with anti-PD-L1 Mab in the MB49 bladder model and in the MBT2 bladder model, supporting an influence of the model on the sensitivity to combination regimens.

### **Flow cytometry analysis of tumor immune infiltrate shows a strong model-dependent heterogeneity**

We characterized the tumor immune infiltrate profiles by flow cytometry for each tumor type and for each treatment condition, four days after the first administration of treatment (Table S2, FigS1 and FigS3). This included total immune infiltrate (Fig 2), effector cells such as CD4+ T cells, CD8+ T cells, Type 1 macrophages (Fig 3) and activated CD8+ T cells with TNF $\alpha$ + cells (Fig 4). Additionally, we quantified « pro-tumor » cells including Granulocytic and Monocytic Myeloid Derived Suppressor Cells (respectively G-MDSC and M-MDSC), Type 2 macrophages (Fig 3) and T reg cells (Fig 5). The following results are expressed as the mean of the percentages of cells in each treatment group, normalized to total CD45+ cells (except for total leucocyte infiltrate which is expressed as a percentage of all events, and for TNF $\alpha$ + cells which is presented as the percentage of CD8+ T cells). Individual data are shown on FigS5.

**Total leukocyte infiltrate.** The baseline total leucocyte infiltrate, evaluated by CD45 labelling, was similar in three of the models from untreated mice with values of 36 % in 4T1, 33% in MBT2, 29% in MB49, but was lower in MC38 with a lower baseline level of 13 % (Fig 2). Among the chemotherapy regimens used only doxorubicin/cyclophosphamide induced a significant decrease of the total leukocyte infiltrate while MVAC and capecitabine/oxaliplatin had no significant impact. Anti-PD-1 therapy was associated with an increase of the total infiltrate in the MC38 and 4T1 models while anti-PD-L1 therapy had no impact. Furthermore this increase was impeded by the combination with capecitabine/oxaliplatin in the MC38 model but not by doxorubicin/cyclophosphamide in the 4T1 model.

**Immune populations.** We observed baseline differences in the percentages of CD4 and CD8 infiltrates as well as in the percentages of M1 macrophages. MDSCs were abundant in all models studied but with some remarkable differences between models. G-MDSCs were abundant in MBT-2 tumors but absent in MC38 tumors. M-MDSCs were present in all tumors and represented almost half of the immune infiltrate in MC38 tumors, as previously described (Fig 3) (28). Macrophages were present at baseline in all tumor types, representing 8 to 18 % of all immune cells with a relative preponderance of M1 macrophages in comparison with M2 cells (ratios of 1.5 to 4 depending on tumor model).

Several alterations in immune populations were observed in response to a single administration of therapy. These include a decrease of the CD4+ and CD8+ T cell infiltrates with the different chemotherapy regimens used and a strong decrease of MDSCs after treatment with anti-PD-1 antibodies but not with anti-PD-L1 antibodies. T cell infiltrates were increased after exposure to chemotherapy + anti-PD-1, to a stronger extent in the 4T1 model than in the MC38 model. Conversely T cells tended to be quantitatively reduced in mice exposed to chemotherapy + anti-PD-L1. Macrophage infiltrates (both M1 and M2) were reduced after exposure to anti-PD-1 but not to anti-PD-L1 antibodies. The analysis of activated CD8 cells (Fig 4) found a significant difference in 4T1 and MB49 bearing mice exposed to chemotherapies, with an increase of the activated cells in these groups. Treg cells were found to be significantly altered in MB49 bearing mice after exposure to anti-PDL-1 + MVAC, and an increase in 4T1 bearing mice exposed to anti-PD-1 alone or in combination with chemotherapy was observed (Fig 5).

Overall our observations reveal strong differences between models in the relative proportions of immune cell populations at the basal level as well as in variations to therapy which appear to be both dependent on the model and on the treatment administered.

### **Effect of therapy on immune checkpoint expression**

In parallel to intra-tumor T cell and immunosuppressive cell quantifications, we used our mouse models of combination regimens to investigate the expression of T cell exhaustion markers such as the T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM-3), the Lymphocyte-activation gene 3 (LAG3) and the T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT). We also evaluated PD-1 expression on the T cell surface. In addition, we also looked at the T cell activation marker, Inducible T-cell costimulator (ICOS). Indeed, some studies already described upregulation of TIM-3 as a mechanism of adaptive resistance to anti-PD-1 therapy (29). Therefore, we sought to evaluate the impact of chemotherapies and combination of chemotherapies in addition to PD-1/PD-L1 axis disruption on alternative checkpoint

expression. In this way, we analyzed these checkpoints in CD4+ and CD8+ T cells (Fig 6 and 7), as well as their expression on tumor cells (Fig 8). Individual data are shown from Fig S6 to FigS8.

In the case of CD4+ T cells (Fig 6), we found a strong increase of TIGIT and ICOS expression in response to single agent anti-PD-1 antibody, with mitigation of this effect on ICOS by combination with capecitabine/oxaliplatin but not doxorubicin/cyclophosphamide. MVAC tended to decrease the expression of the other immune checkpoints on CD4 cells, with no mitigating effect of PD-L1 antibody. In the case of CD8+ T cells (Fig 7), TIGIT and ICOS were increased in response to anti-PD-1 antibody in the 4T1 model and to a lesser extent in the MC38 model. MVAC reduced immune checkpoint levels similarly to what was observed in CD4+ T cells. Anti-PD-L1 antibodies had no effect on CD8 cells in the MB49 model while tending to reduce immune checkpoint expression in the MBT2 model.

Regarding immune checkpoint expression on tumor cells (Fig 8), we did not observe a strong modulation of their expression with anti-PD-1, anti-PD-L1 or the combinations in most cases. However, we noticed a remarkable decrease of TIGIT expression on tumor cells after exposure to the MVAC chemotherapy regimen in the MB49 model (Fig 8C and Fig S8). Interestingly, we did not find a similar collapse after MVAC exposure in the MBT-2 model (Fig 8A). Expression of PD-L1 on tumor cells has been reported to be correlated with improved survival and response rate in the context of anti-PD-1 and anti-PD-L1 trials, and has been suggested as a predictive biomarker (30). In our models treatments did not modify PD-L1 expression in tumor cells except for the combination cyclophosphamide/ doxorubicin + anti-PD-1 in the 4T1 model (Fig 8B). On the contrary, we observed an increase of PD-L1 expression on tumor cells when anti-PD-L1 monotherapy was used in the bladder cancer model MB49 (Fig 8C).

## **Discussion**

Immune checkpoint blockade is one of the most promising therapies for a wide range of cancer types. Approved therapies such as anti-PD-1 and anti-PD-L1 induce impressive responses in advanced disease and considerably improve survival in some patients. However, a non-negligible proportion of patients do not respond to these therapies. Consequently, there is an important need to find new therapeutic approaches to improve response rates. Combinations with standard regimens such as cytotoxic chemotherapy is a logical approach but raises a number of possible issues (31). As exemplified by our results combinations may have unexpected effects ranging from enhanced to reduced anti-tumor activity in comparison to single-agent therapies. We observed an improved anti-tumor activity of chemotherapies in

combination with ICI in colorectal cancer and one bladder cancer model (MB49). However, in the context of a metastatic breast cancer model, chemotherapy in combination with anti-PD-1 did not show any anti-tumor efficacy. In the worst-case scenario, chemotherapy had a negative impact on tumor growth, such as we observed in another model of bladder cancer (MBT-2).

There are potentially several mechanisms through which chemotherapeutic regimens and ICIs could interact and modulate anti-tumor activity. While cytotoxic agents cause cell death by a direct effect on tumor cells, they are also likely to enhance tumor cell death indirectly by the process of immunogenic cell death, which might secondarily facilitate the anti-tumor activity of ICIs (32). As an example, cyclophosphamide (used in the 4T1 model) appears to induce tumor cell death in a preclinical model of lymphoma, and oxaliplatin increases tumor infiltration, notably by CD8+ T cells, in a preclinical prostate cancer (33,34). Alternatively some cytotoxic agents are known to be lymphotoxic, with potential deleterious effects when acting on anti-tumor T cells or beneficial effects when acting on pro-tumor T cells such as Tregs. It is likely that cytotoxic agents could act on other immune populations as well. Additionally cytotoxic agents have shown to prime tumor cells for granzyme-mediated death (35).

Two of our preclinical models showed enhanced activity of the combination of cytotoxic agents and ICIs, the capecitabine/oxaliplatin regimen combined with anti-PD-1 antibodies in the MC38 model and the MVAC regimen combined with anti-PD-L1 antibodies in the MB49 model. In the MC38 model basal immune cells infiltration was relatively low and was increased after treatment with anti-PD-1 antibodies but this effect was mitigated in the combination regimen. Additionally MC38 tumors had a strong content in M-MDSCs which was decreased by anti-PD-1 antibodies while the CD4+ and CD8+ T cell infiltrates were proportionally increased. In the MB49 model the most remarkable modification induced by the therapeutic combination was a modification in the proportion of MDSCs and an increase of the M1/M2 macrophages ratio from 2.5 to 9 in the combination group. Remarkably in the MC38 model, ICOS expression was increased and inhibitory checkpoint expression decreased on CD4 T cells by the combination of anti-PD-1 with capecitabine/oxaliplatin. In the MB49 model inhibitory checkpoints were decreased both on CD4+ and CD8+ T cells after exposure to the cytotoxic regimen alone and to the combination regimen. These results suggest that modulation of immune checkpoints on immune cells by cytotoxic agents could impact on the potency of ICIs when these are co-administered.

We observed no benefit of the combination in the 4T1 model exposed to doxorubicin/cyclophosphamide and anti-PD-1 antibodies and an antagonistic effect in the MBT2 model exposed to MVAC and anti-PD-L1 antibodies. This result was unexpected in the 4T1 model as the combination profoundly modified the immune microenvironment with a strong decrease in MDSCs and a large increase in the CD4+ and CD8+ T cell infiltrates, including activated CD8+ T cells and increased

Tregs. However it should be emphasized that under our treatment conditions 4T1 tumors were not sensitive to single agent anti-PD-1 suggesting that the immune alterations observed were not sufficient to induce a response to these antibodies in the combination regimen. In the MBT2 model we also observed profound alterations in the microenvironment, including a decrease in CD4+ and CD8+ T cells as well as a strong increase of G-MDSCs and M2 macrophages. As MBT2 was sensitive to anti-PD-L1 antibodies but not to the MVAC regimen we hypothesize that in this case the cytotoxic agents were involved in the antagonistic effect observed. These results suggest that the same regimen, in this case MVAC, can have different consequences on the immune microenvironment depending on the baseline situation in the tumor.

There are a number of limitations to our study. The four models studied were implanted in three different strains of mice which may react differently at a systemic level to the therapeutic agents used. In spite of preliminary dose-ranging studies we were not always able to define a cytotoxic regimen which was active in certain models. Moreover, tumor models were established from tumor cells subcutaneous injection, for homogeneity purpose. Variations between subcutaneous and orthotopic models has already been discuss in the literature (36,37), and in seems to be relevant to test the combination of chemotherapies with ICIs on tumors grafted into is normal place of development.

It is important to note that different mice strains may have different immune status and thus may display different immune infiltrates in tumors. This aspect has already been shown by Sellers and al., with immune variations specific to the strain (38). However, the diversity of mice immune infiltration can also be considered to reflect the important heterogeneity observed in patients.

Additionally, immunophenotypic analyses were performed at a single time point (day 4 post-therapy) which did not allow us to compare kinetic modifications of the microenvironment in the tumor. Another key parameter is the therapeutic sequence of the cytotoxic agents and the immune checkpoint inhibitors. We chose to initiate both types of treatment simultaneously but it is likely that sequenced administration could lead to different results.

Overall our results emphasize the heterogeneity in the tumor microenvironment of syngeneic models and the diversity of response elicited by treatment combinations. While additional studies combining single agents with ICIs are required to better understand potential interactions, most ongoing clinical trials are evaluating the association of ICIs with combination chemotherapy regimens (Table S3). These trials will provide important data concerning both antitumor activity and auto-immune toxicity.

## **Materials and methods**

### **Cell culture**

Murine colon cancer MC38 cells (Kerafast, USA) were cultured in DMEM medium with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and streptomycin. The murine metastatic breast cancer cell line 4T1 (ATCC, ATCC® CRL-2539™) and the murine bladder cancer cell lines MBT-2 and MB49 (kindly provided by Alain Bergeron, Laval University) were cultured with RPMI medium with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and streptomycin. Cells were incubated in humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

### **Establishment and measure of syngeneic SC tumors**

MC38 cells and MB49 cells were injected in C57BL6 mice (Janvier Lab), 4T1 cells were injected in BALB/c mice (Charles River Lab) and MBT-2 cells were injected in C3H mice (Charles River Lab). In all cases, suspensions of exponentially growing cancer cells diluted in 0.2 mL of PBS were injected subcutaneously into the right flank of mice (2.10<sup>6</sup> cells for MC38, MB49 and MBT-2 models, 1.10<sup>6</sup> cells for the 4T1 model). When tumor volume reached 200 mm<sup>3</sup> for the MC38, MB49 and MBT-2 models, and 100 mm<sup>3</sup> for the 4T1 model, mice were randomized and the first treatment was administered (n=8 to 12 mice per group, either n=3 to 6 for tumor growth and n=5 to 6 for flow cytometry analysis). The tumor volume was measured every three days (length x width) with a caliper. The tumor volume was determined using the formula:  $\frac{4}{3} \times \pi \times r^3$ . All mice were raised in SPF environment with free access to standard food and water. This study was approved by the Animal Ethics Committee of the University Claude Bernard of Lyon.

Four days after first administration of treatment, half of the mice in each group were sacrificed to analyze their tumor microenvironment by flow cytometry, while the other mice pursued treatment in order to determine sensitivity to therapy.

### **Treatment**

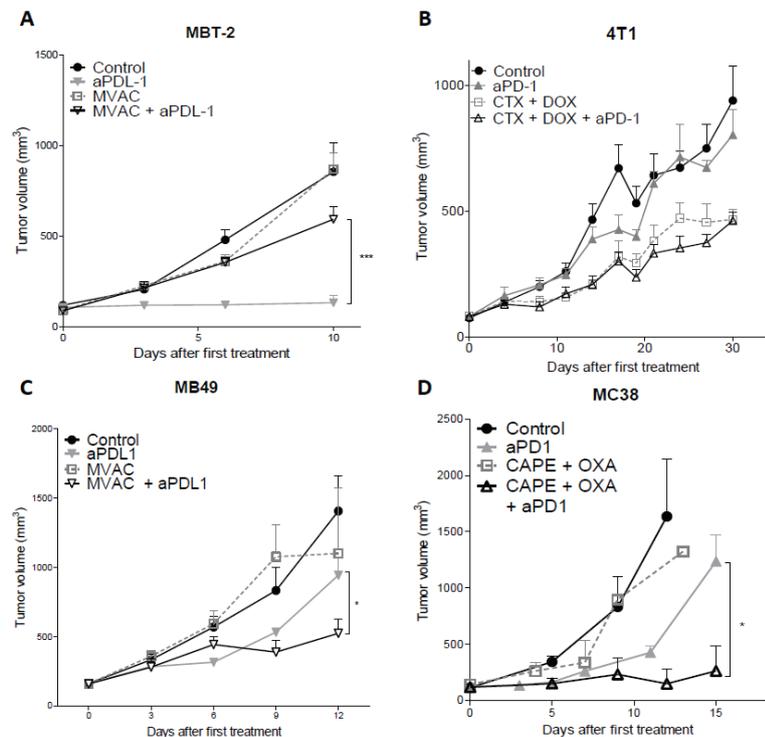
The combination regimen used for the MC38 colon adenocarcinoma mouse model was capecitabine (Actavis Group PTC ehf) administered per os five days a week at a dose of 250mg/kg and oxaliplatin (Mylan), injected i.p. once a week at a dose of 5 mg/kg + anti-PD-1 (RMP1-14, BioXCell), injected i.p. once a week at a dose of 12.5 mg/kg. For the metastatic 4T1 breast cancer mouse model, the combination was cyclophosphamide (Baxter) injected i.p. once a week at a dose of 100 mg/kg + doxorubicin (Accord Healthcare) injected i.p. once a week at a dose of 2 mg/kg + anti-PD-1 (RMP1-14, BioXCell) or anti-PD-L1 (10F.9G2, BioXCell), injected i.p. once a week at a dose of 12.5 mg/kg. For bladder cancer mouse models, the MVAC regimen consisted in a combination of methotrexate (Mylan) injected i.p. once a week at a dose of 1 mg/kg + vinblastine (EG Labo) injected i.p. once a week at a dose of 0.1 mg/kg + doxorubicin (Accord Healthcare) injected i.p. once a week at a dose of 1 mg/kg + cisplatin (Mylan) injected i.p. once a week at a dose of 1 mg/kg, + anti-PD-L1 (10F.9G2, BioXCell) injected i.p. once a week at a dose of 12.5 mg/kg and + anti-

PD-1 (RMP1-14, BioXCell) injected i.p. once a week at a dose of 12.5 mg/kg for MB49 mouse model.

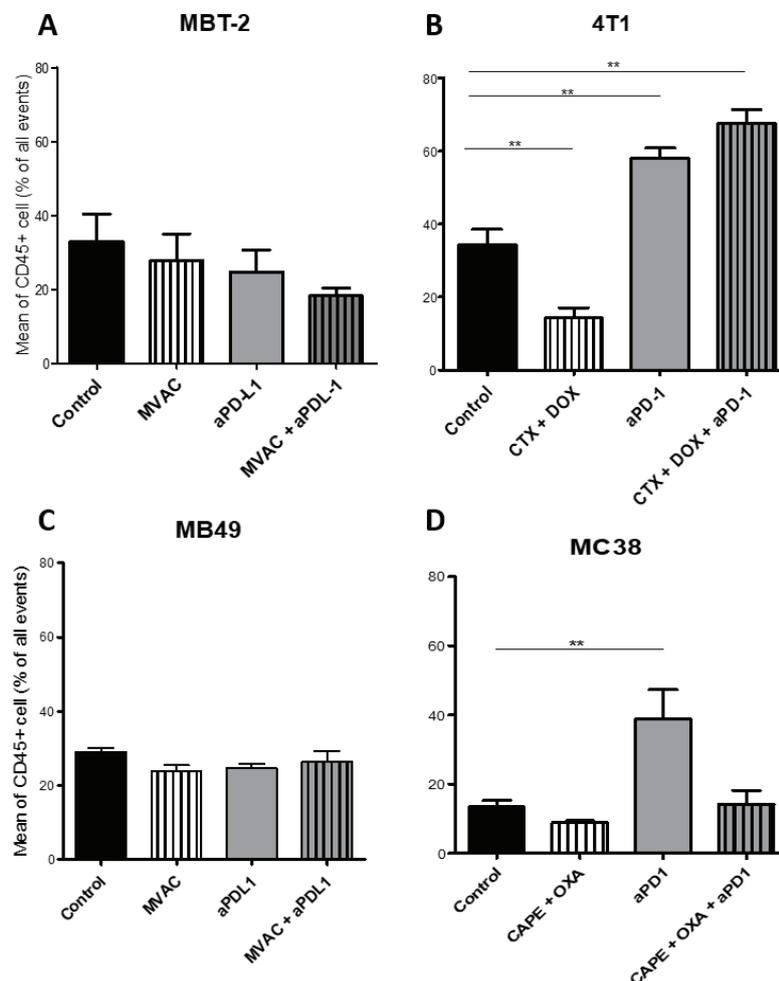
## Flow cytometry

Flow cytometry was used to analyze the tumor immune microenvironment. All tumor tissue samples per groups were collected, dilacerated, counted and cells surface were stained with the following fluorescently conjugated antibodies: anti-CD45 (30F11, BD Biosciences), anti-CD4 (RM4-5, MiltenyiBiotec), anti-CD8 (53-6.7, MiltenyiBiotec), anti-CD161 (PK136, MiltenyiBiotec), anti-CD3 (REA606, MiltenyiBiotec), anti-CD68 (FA-11, MiltenyiBiotec), anti-CD206 (C068C2, BioLegend) anti-CD11b (REA592, MiltenyiBiotec), anti-Ly-6C (1G7.G10, MiltenyiBiotec), anti-Ly6G (REA526, MiltenyiBiotec), anti-PD-1 (HA2-7B1, MiltenyiBiotec), anti-LAG3 (C9B7W, MiltenyiBiotec), anti-TIM3 (REA602, MiltenyiBiotec), anti-ICOS (REA192, MiltenyiBiotec), anti-PD-L1 (10F.9G2, BioLegend), anti-TIGIT (REA536, MiltenyiBiotec), anti-TNF $\alpha$  (REA636, MiltenyiBiotec), anti-FoxP3 (3G3, MiltenyiBiotec). After surface staining, cells were fixed and permeabilized using BD Cytfix/Cytoperm kit and then labeled with FoxP3 and TNF $\alpha$ . Flow cytometry data were acquired on the LSRII flow cytometer, FlowJo software was used for analyses and GraphPad Prism software was used for statistical analysis (Unpaired t test). Isotype controls were from MiltenyiBiotec. Gating schemes are shown on figures S4 and S5.

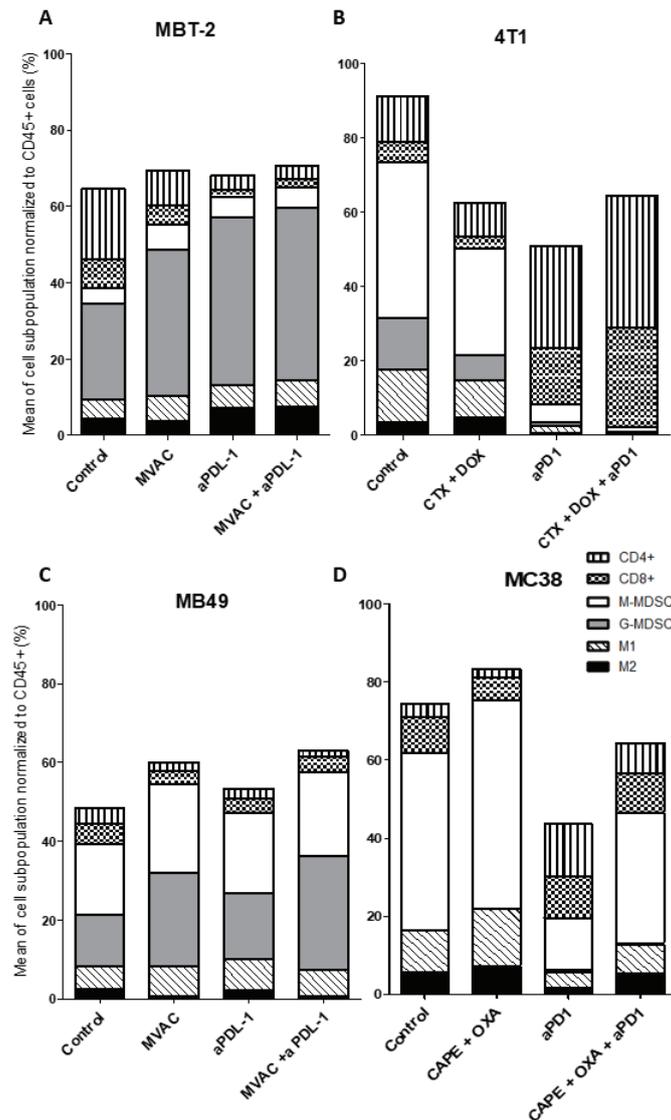
## Figures



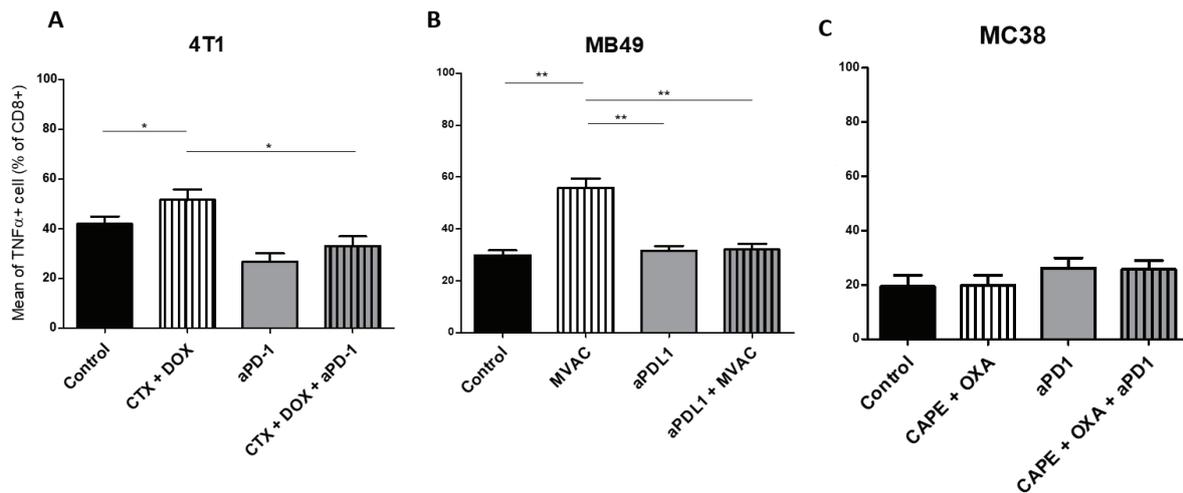
**Figure 1. *In vivo* tumor growth in mice treated with ICI alone or in combination with chemotherapy.** Anti-PD1 (clone RMP1.14) or anti-PDL1 (clone 10F.9G2) mAb (12,5 mg/kg, ip, q1wk) were administered in combination with (**A** and **C**) methotrexate (1mg/kg, ip, q1wk), vinblastine (0.1 mg/kg, ip, q1wk), doxorubicin(1mg/kg, ip, q1wk) and cisplatin(1 mg/kg,ip, q1wk, MVAC) in SC bladder cancer MB49 and MBT-2, and with (**B**) cyclophosphamide (CTX, 100mg/kg, ip, q1wk) and doxorubicin (DOX, 2mg/kg, ip, q1wk) in SC metastatic breast cancer 4T1, and with (**D**) capecitabine (CAPE, 250mg/kg, po 5 days a week) and oxaliplatin (OXA, 5mg/kg, ip, q1wk) in SC colorectal cancer MC38. Data shown are mean tumor volumes+ SEM. n=5 to 6 mice/group (**A**), n=6 mice/group (**B**), n=6 mice/group (**C**), n=3 to 6 mice/group (**D**). \*: p<0.05 and \*\*\*:p<0.001 using Student's *t*-test.



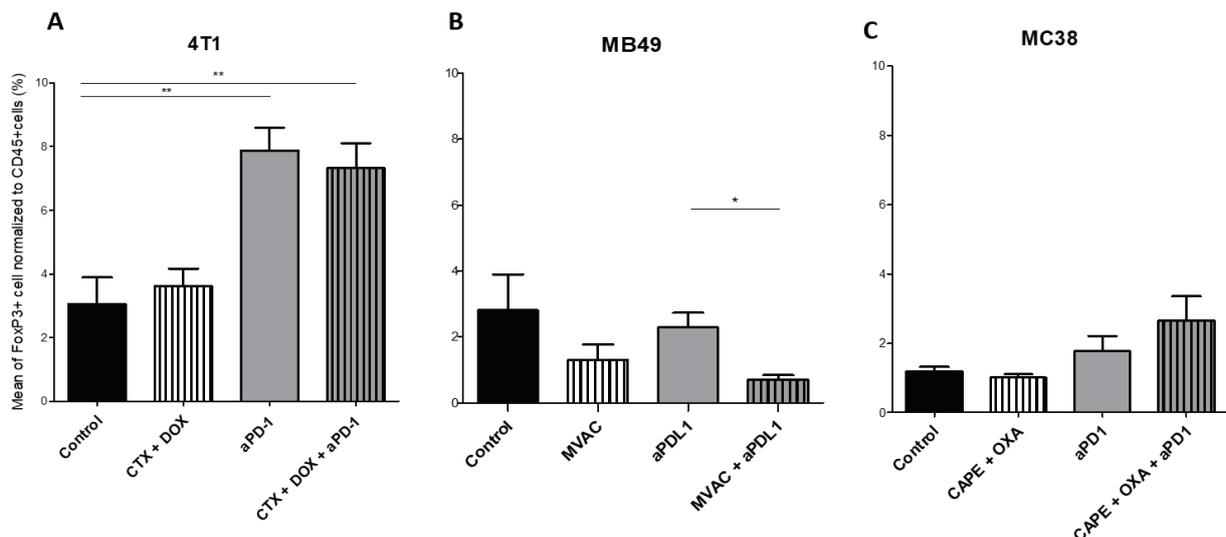
**Figure 2. Total leukocyte infiltrate in tumors from mice treated with ICI alone or in combination with chemotherapy.** Effect of chemotherapies, anti-PD1 or anti-PDL1 mAbs and their combination on total leukocyte infiltrate in various preclinical tumor models. Flow cytometry analysis of total CD45<sup>+</sup> cells of MBT-2 tumors (**A**), 4T1 tumors (**B**), MB49 (**C**) and MC38 tumors (**D**). Mice were treated as in figure 1. Data are shown as mean values+ SEM. n=5 to 6 mice/group (**A**), n=5 to 6 mice/group (**B**), n=6 mice/group (**C**), n=5 mice/group (**D**). \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*:p<0.001 using Mann-Whitney test.



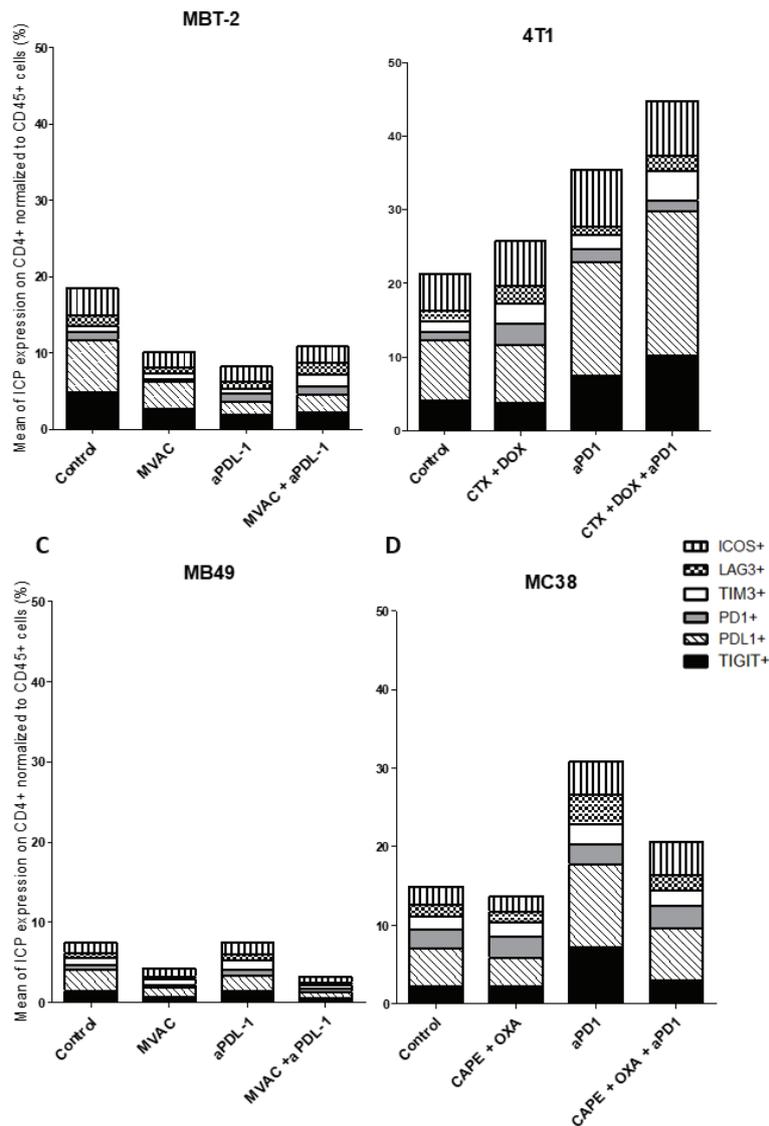
**Figure 3. All the preclinical models studied are predominantly infiltrated with cells considered as « immunosuppressive », particularly MDSCs. .Effect of chemotherapies, anti-PD1 or anti-PDL1 Mabs and their combination on immune cells subpopulations in various preclinical tumor models. Flow analysis of immune cells subpopulations of total CD45<sup>+</sup> cells of MBT-2 tumors (A), 4T1 tumors (B), MB49 (C) and MC38 tumors (D). Mice were treated as in figure 1. Data are shown as Mean of immune cells in each groups normalized from total CD45<sup>+</sup> cells, n=5 to 6 mice/group (A), n=5 to 6 mice/group (B), n=6 mice/group (C), n=5 mice/group (D).**



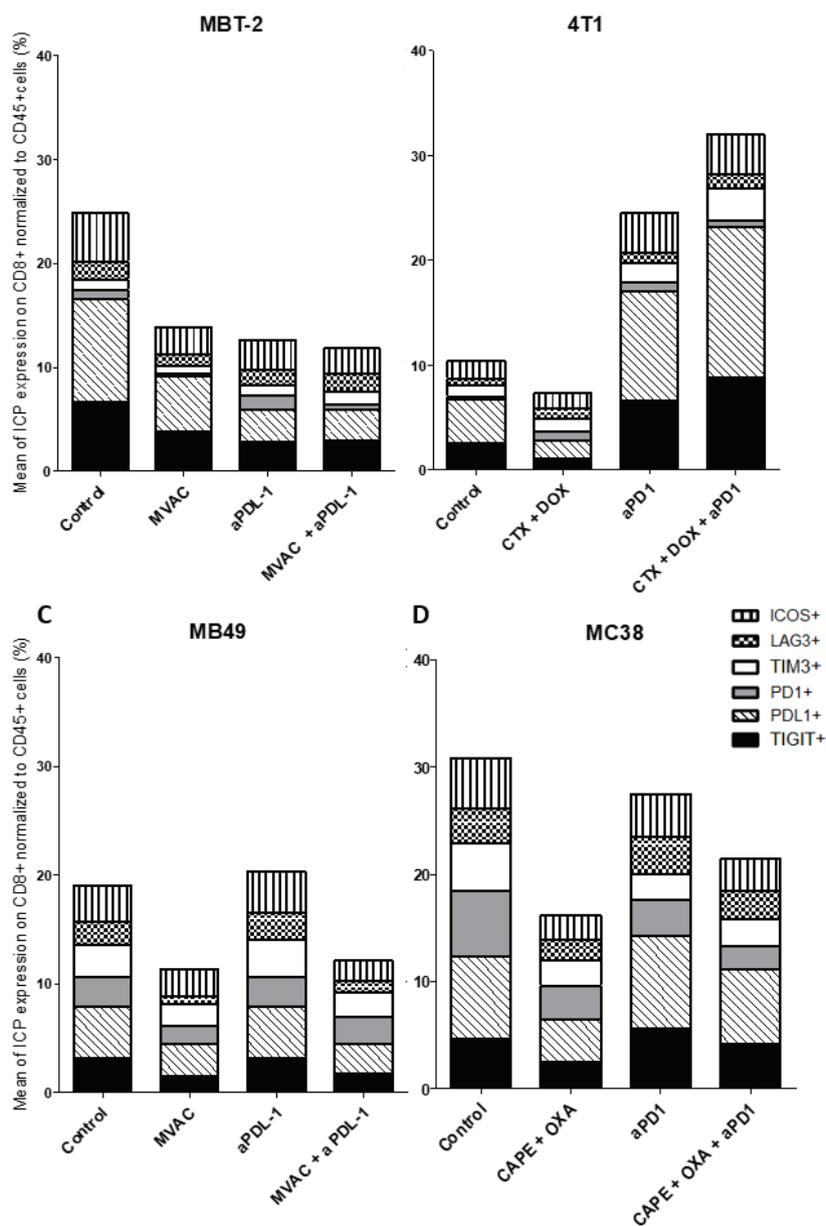
**Figure 4. Activated T cells are increased by chemotherapies in breast and bladder cancer.** Effect of chemotherapies, anti-PD1 or anti-PDL1 Mabs and their combination on T effector cells activation in various preclinical tumor models. Flow cytometric analysis of TNF $\alpha$ + CD8+ T cells of total CD45+ cells of 4T1 tumors (A), MB49 (B) and MC38 tumors (C). Mice were treated as in figure 1. Data are shown as Mean + SEM, n=5 to 6 mice/group (A), n=6 mice/group (B), n=5 mice/group (C), Mann-Whitney test: \*: P<0.05, \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0,001. Results not shown for MBT-2 bladder cancer (Figure S4)



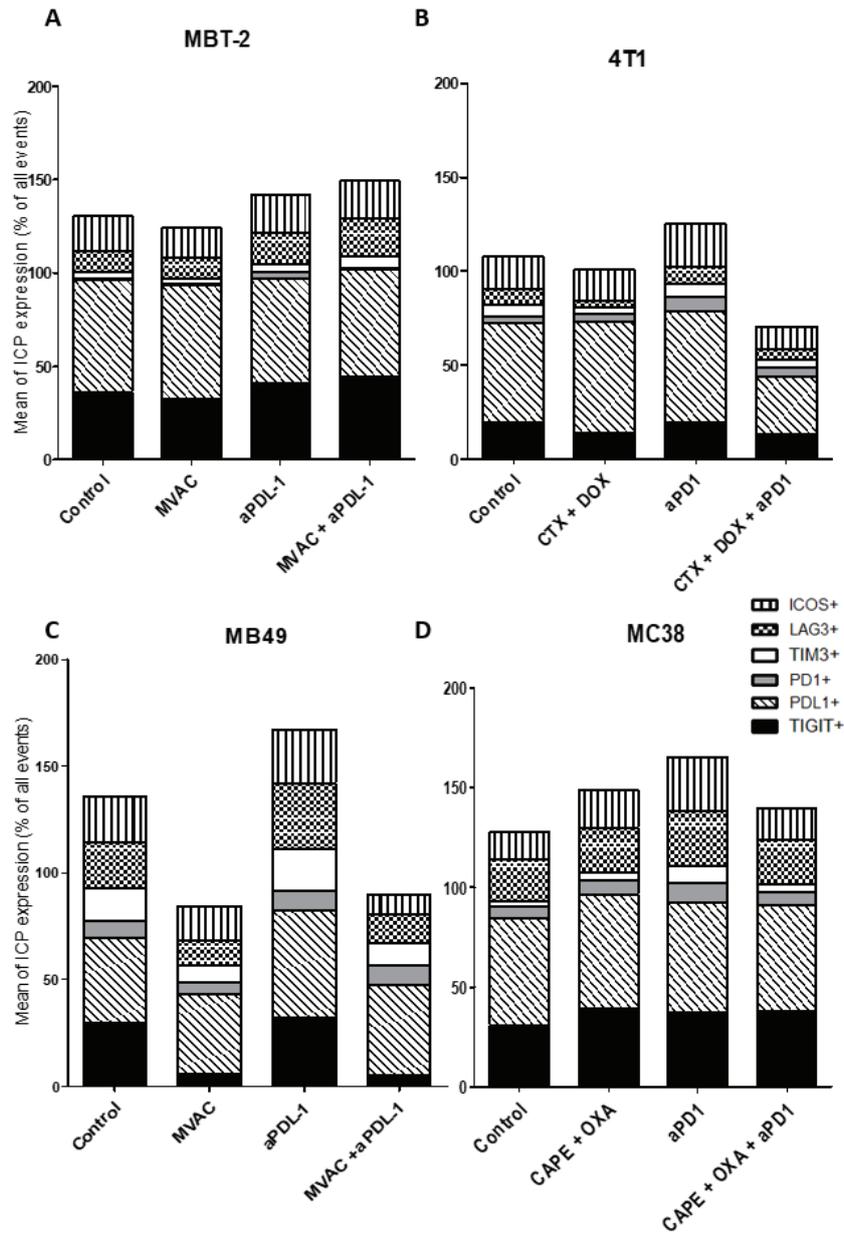
**Figure 5. Combination of MVAC with anti-PDL1 significantly reduces T reg cells infiltrate compared with anti-PDL1 single treatment in bladder cancer MB49.** Effect of chemotherapies, anti-PD1 or anti-PDL1 Mabs and their combination on T regulator cells in various preclinical tumor models. Flow cytometric analysis of FoxP3+ CD4 T cells of total CD45+ cells of 4T1 tumors (A), MB49 (B) and MC38 tumors (C). Mice were treated as in figure 1. Data are shown as Mean + SEM, n=5 to 6 mice/group (A), n=6 mice/group (B), n=5 mice/group (C), Mann-Whitney test: \*: P<0.05, \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0,001. Results not shown for MBT-2 bladder cancer (Figure S4)



**Figure 6. Combination of cyclophosphamide and doxorubicine increase inhibitory checkpoint on immune CD4+ T cells in 4T1 breast cancer model.** Effect of chemotherapies, anti-PD1 or anti-PDL1 Mabs and their combination on alternative immune checkpoints expression on CD4 T cells in various preclinical tumor models. Flow cytometric analysis of CD279 (PD-1), CD223 (LAG-3), TIM-3, CD278 (ICOS), CD274 (PDL-1), TIGIT on CD4 T cells infiltrate of total CD45<sup>+</sup> cells of MBT-2 tumors (A), 4T1 tumors (B), MB49 (C) and MC38 tumors (D). Mice were treated as in figure 1. Data are shown as Mean percentage of CD4 T cells which express the different immune checkpoint, n=5 to 6 mice/group (A), n=5 to 6 mice/group (B), n=6 mice/group (C), n=5 mice/group (D).

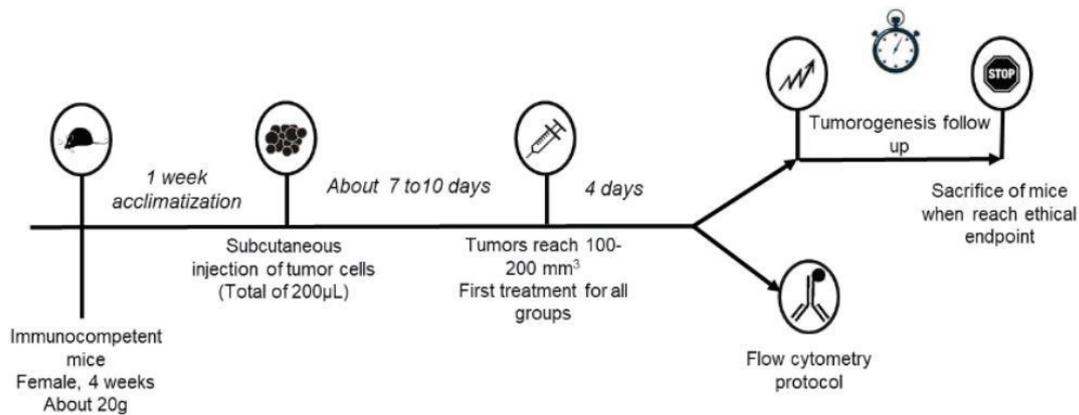


**Figure 7. Chemotherapies decrease inhibitory checkpoint expression on immune CD8+ T cells.** Effect of chemotherapies, anti-PD1 or anti-PDL1 Mabs and their combination on alternative immune checkpoints expression on CD8+ T cells in various preclinical tumor models. Flow cytometric analysis of CD279 (PD-1), CD223 (LAG-3), TIM-3, CD278 (ICOS), CD274 (PDL-1), TIGIT on CD8 T cells infiltrate of total CD45<sup>+</sup> cells of MBT-2 tumors (**A**), 4T1 tumors (**B**), MB49 (**C**) and MC38 tumors (**D**). Mice were treated as in figure 1. Data are shown as Mean percentage of CD8+ T cells which express the different immune checkpoint, n=5 to 6 mice/group (**A**), n=5 to 6 mice/group (**B**), n=6 mice/group (**C**), n=5 mice/group (**D**).

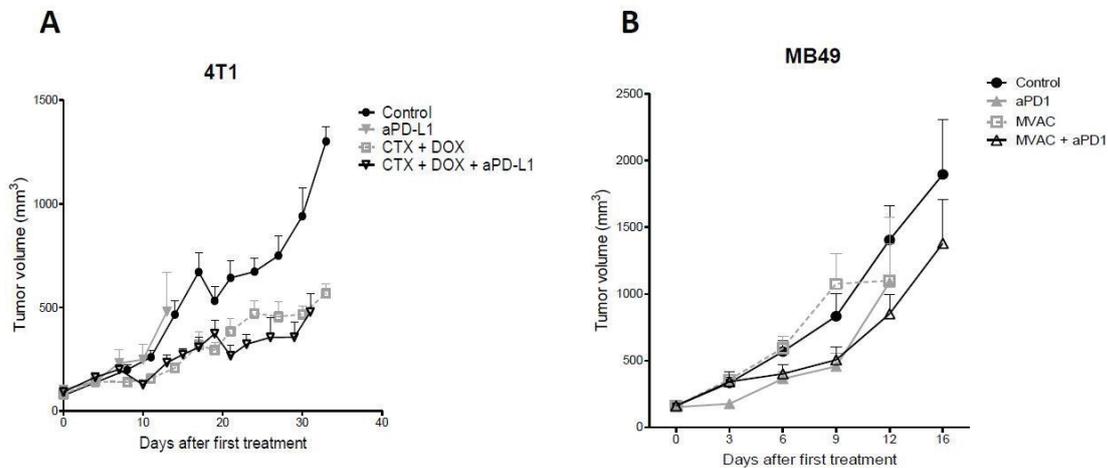


**Figure 8. MVAC chemotherapy regimen induces a large decrease of TIGIT expression on tumor cells in MB49 bladder cancer.** Effect of chemotherapies, anti-PD1 or anti-PDL1 Mabs and their combination on alternative immune checkpoints expression on tumor cells in various preclinical tumor models. Flow cytometric analysis of CD279 (PD-1), CD223 (LAG-3), TIM-3, CD278 (ICOS), CD274 (PDL-1), TIGIT on tumor cells of total CD45<sup>+</sup> cells of MBT-2 tumors (A), 4T1 tumors (B), MB49 (C) and MC38 tumors (D). Mice were treated as in figure 1. Data are shown as Mean percentage of tumor cells which express the different immune checkpoint, n=5 to 6 mice/group (A), n=5 to 6 mice/group (B), n=6 mice/group (C), n=5 mice/group (D).

**Supplementary figures:**

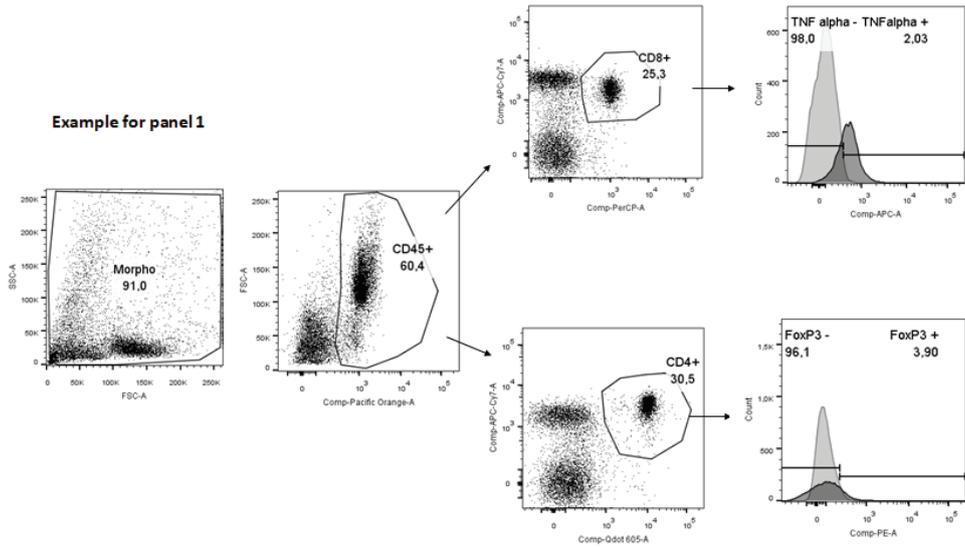


**Figure S1. Experimental design of combination experiments**

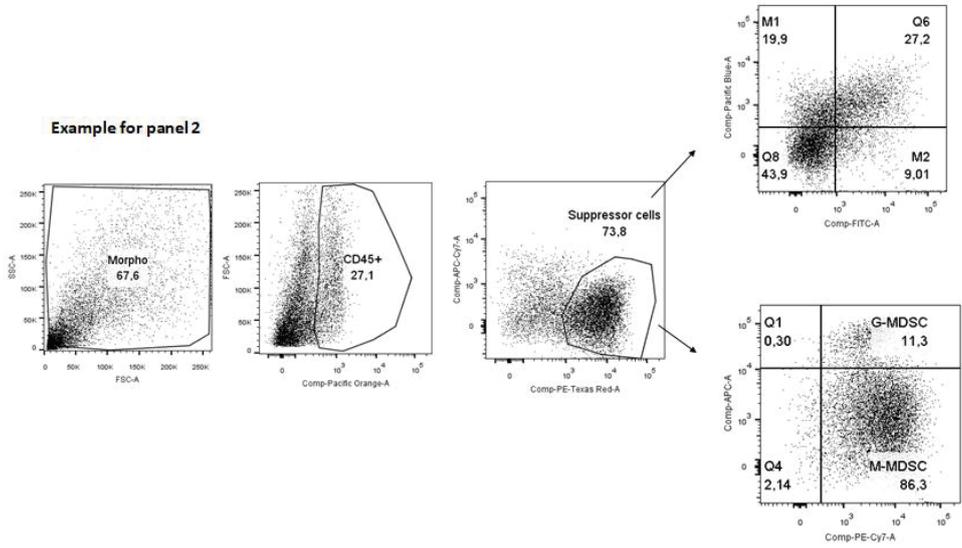


**Figure S2. Effect of anti-PD1 (clone RMP1.14) or anti-PDL1 (clone 10F.9G2) antibody, 12,5 mg/kg, i.p., q1wk, in combination with cyclophosphamide (CTX) 100mg/kg, i.p, q1wk and doxorubicin (DOX) 2mg/kg, i.p, q1wk in SC metastatic breast cancer 4T1 (A), methotrexate 1mg/kg, i.p, q1wk and vinblastine 0,1 mg/kg, i.p, q1wk and doxorubicin 1mg/kg, i.p, q1wk and cisplatin 1 mg/kg i.p, q1wk (MVAC) in SC bladder cancer MB49 (B), Data are shown as Mean + SEM, n=5 to 6 (A), n=6 (B).**

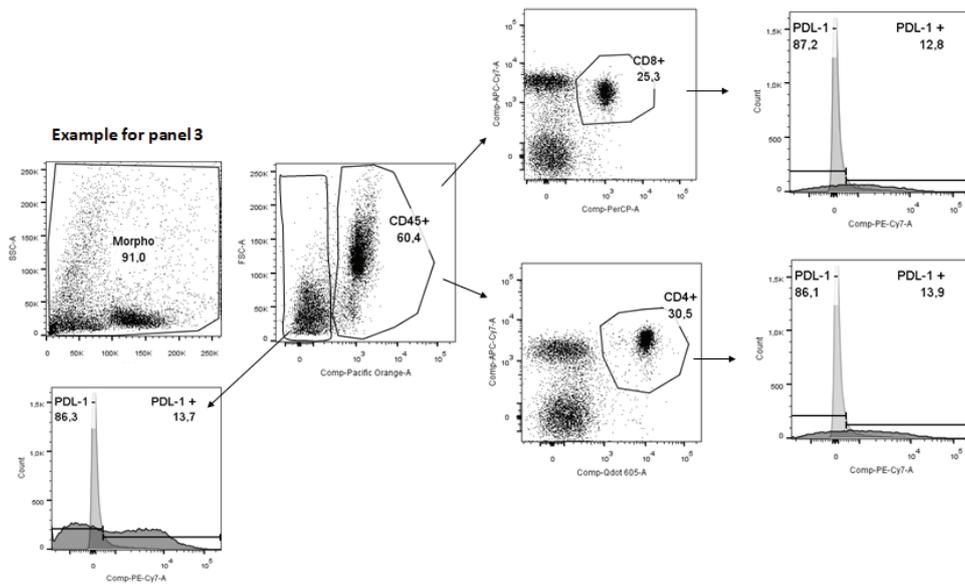
**Example for panel 1**



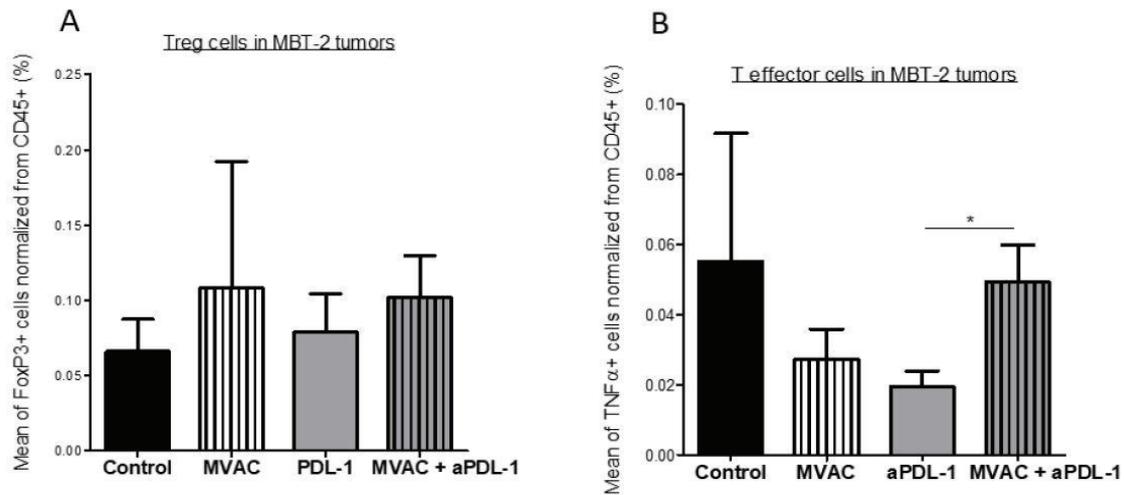
**Example for panel 2**



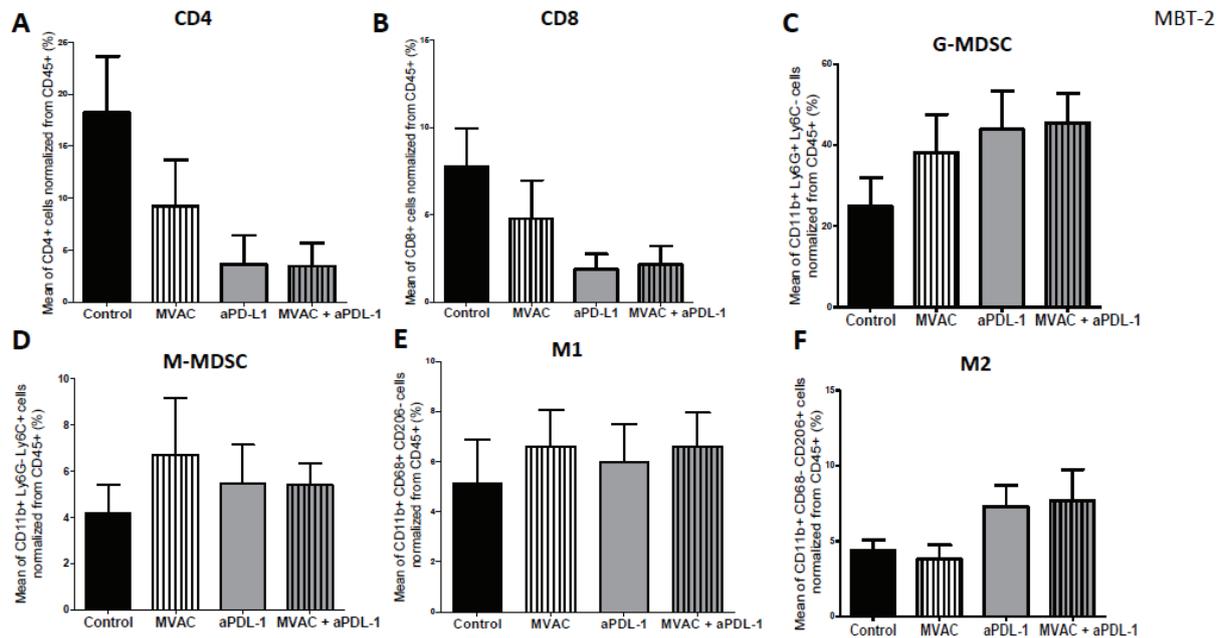
**Example for panel 3**

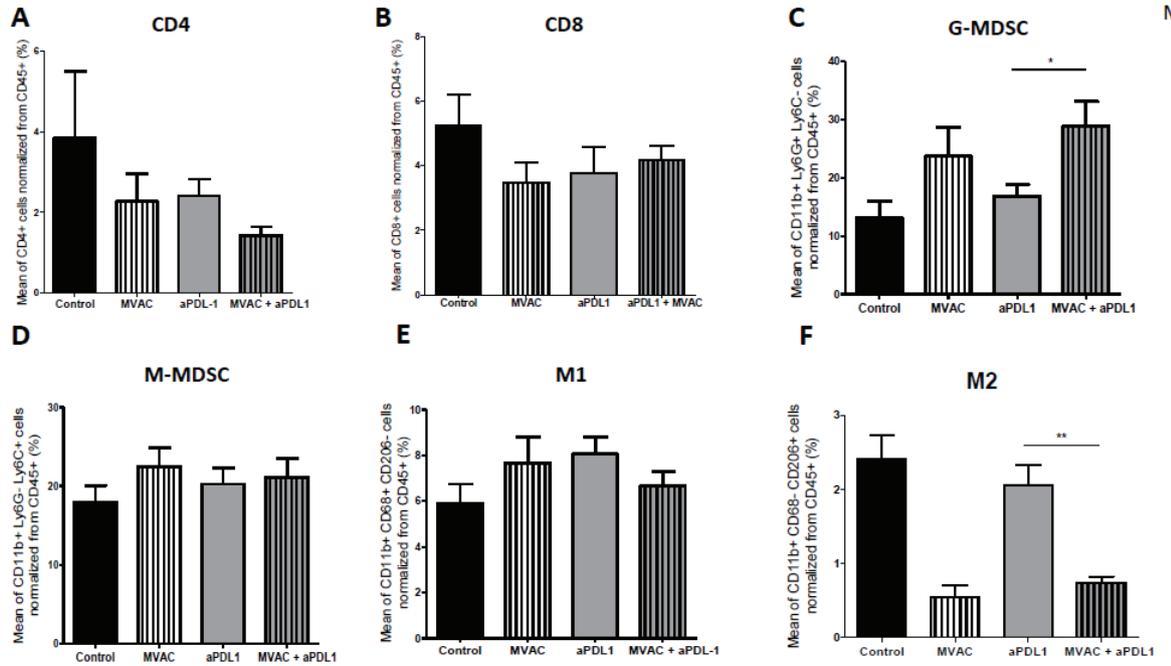
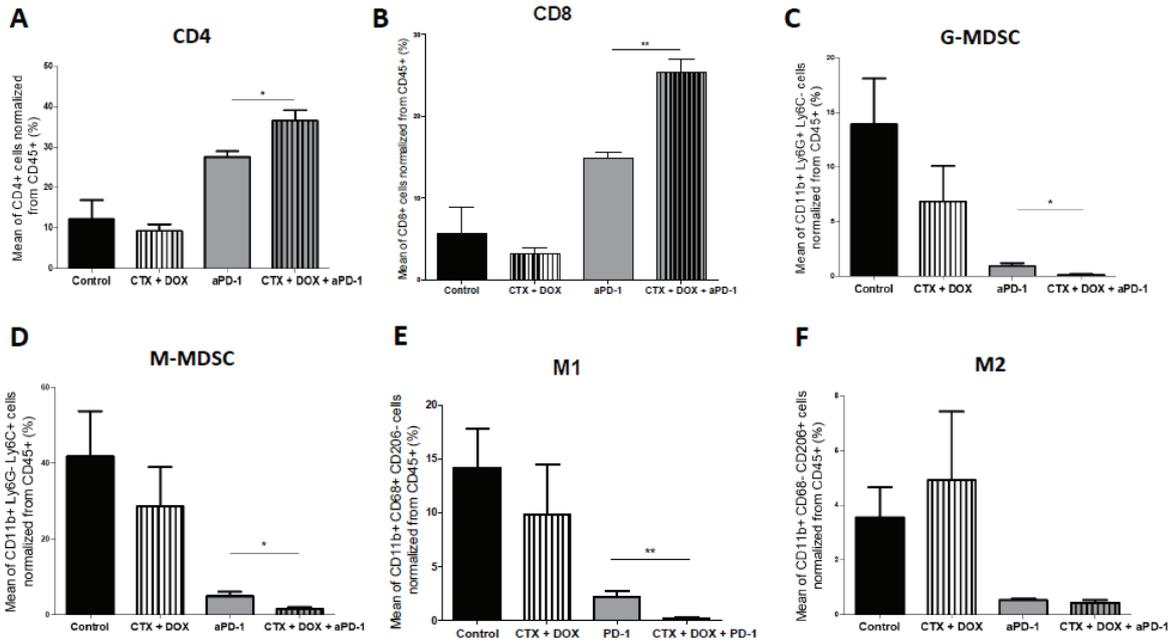


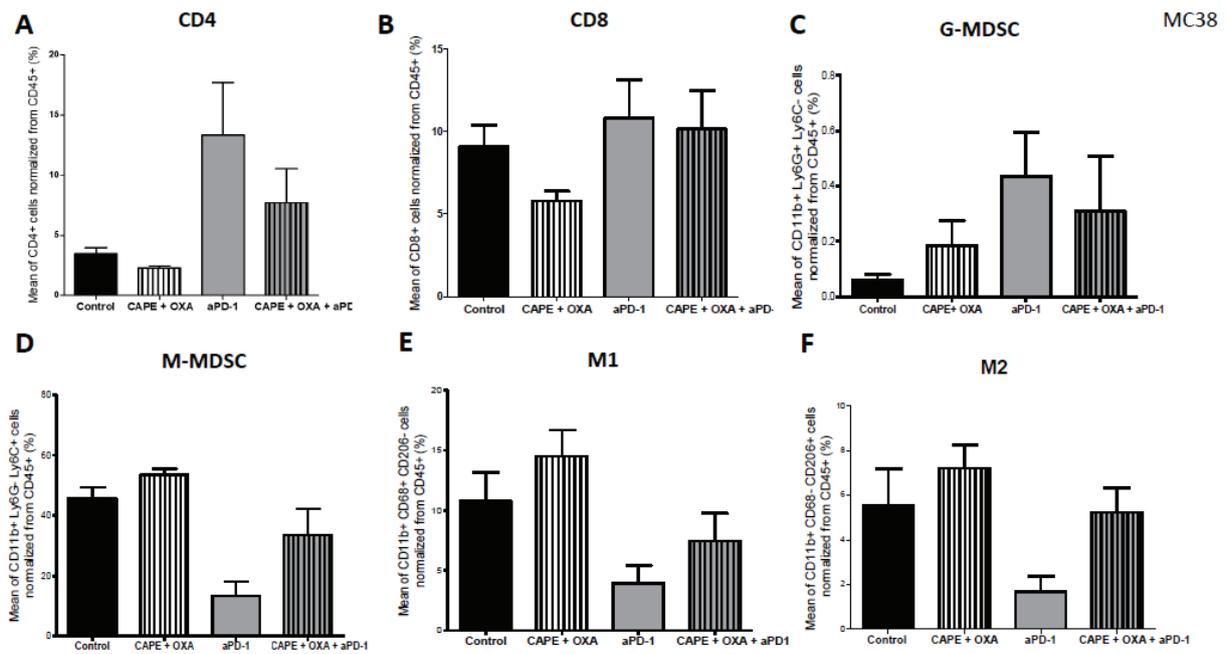
**Figure S3.** Example of gating strategy for immune cell infiltrate study. Example of flow cytometry analysis results of tumors from SC breast cancer 4T1



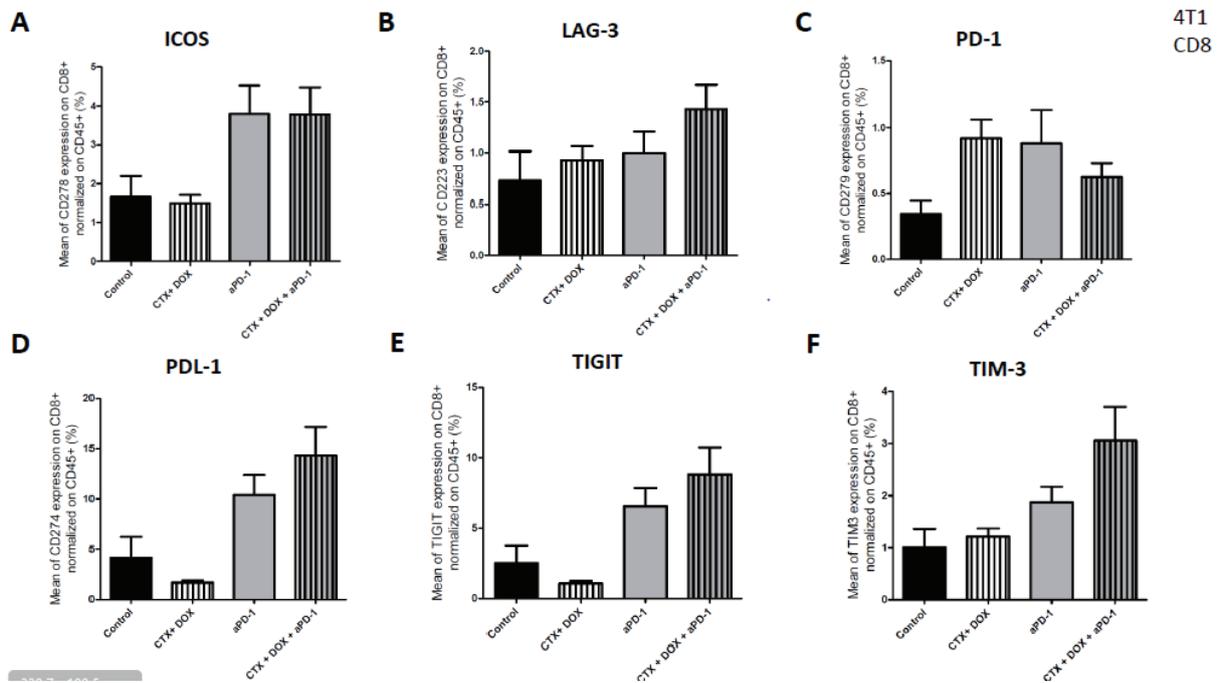
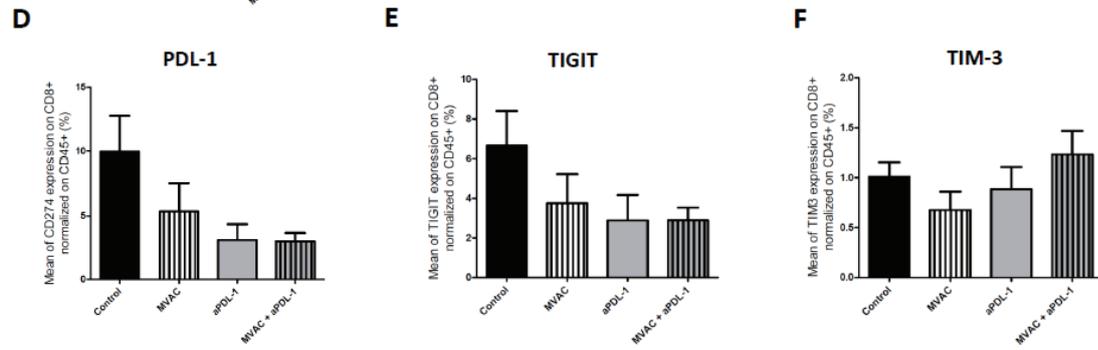
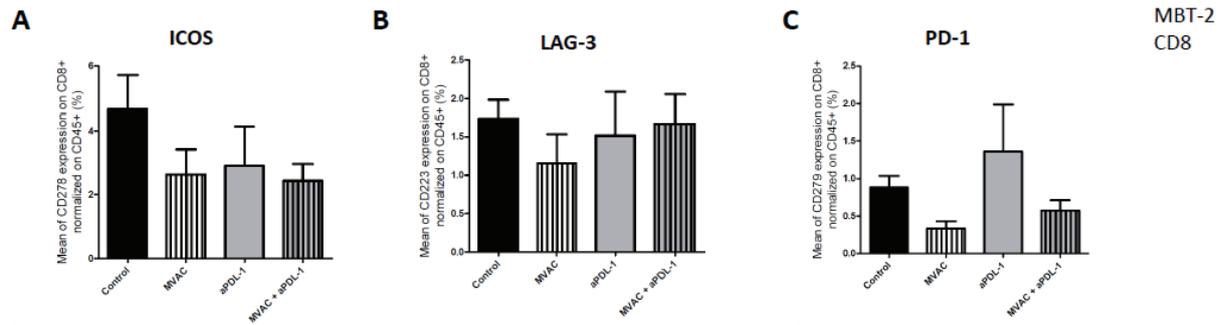
**Figure S4.** Effect of chemotherapies, anti-PDL1 Mab and their combination on T reg cells (A) and T effector cells activation (B) in MBT-2 preclinical tumor model. Flow cytometric analysis of TNF $\alpha$ + CD8+ T cells of total CD45+ cells (A), FoxP3+ CD4+ T cells of total CD45+ cells (B). Mice were treated as in Table S1. Data are shown as Mean + SEM, n=5 to 6, Mann-Whitney test: \*: P<0.05

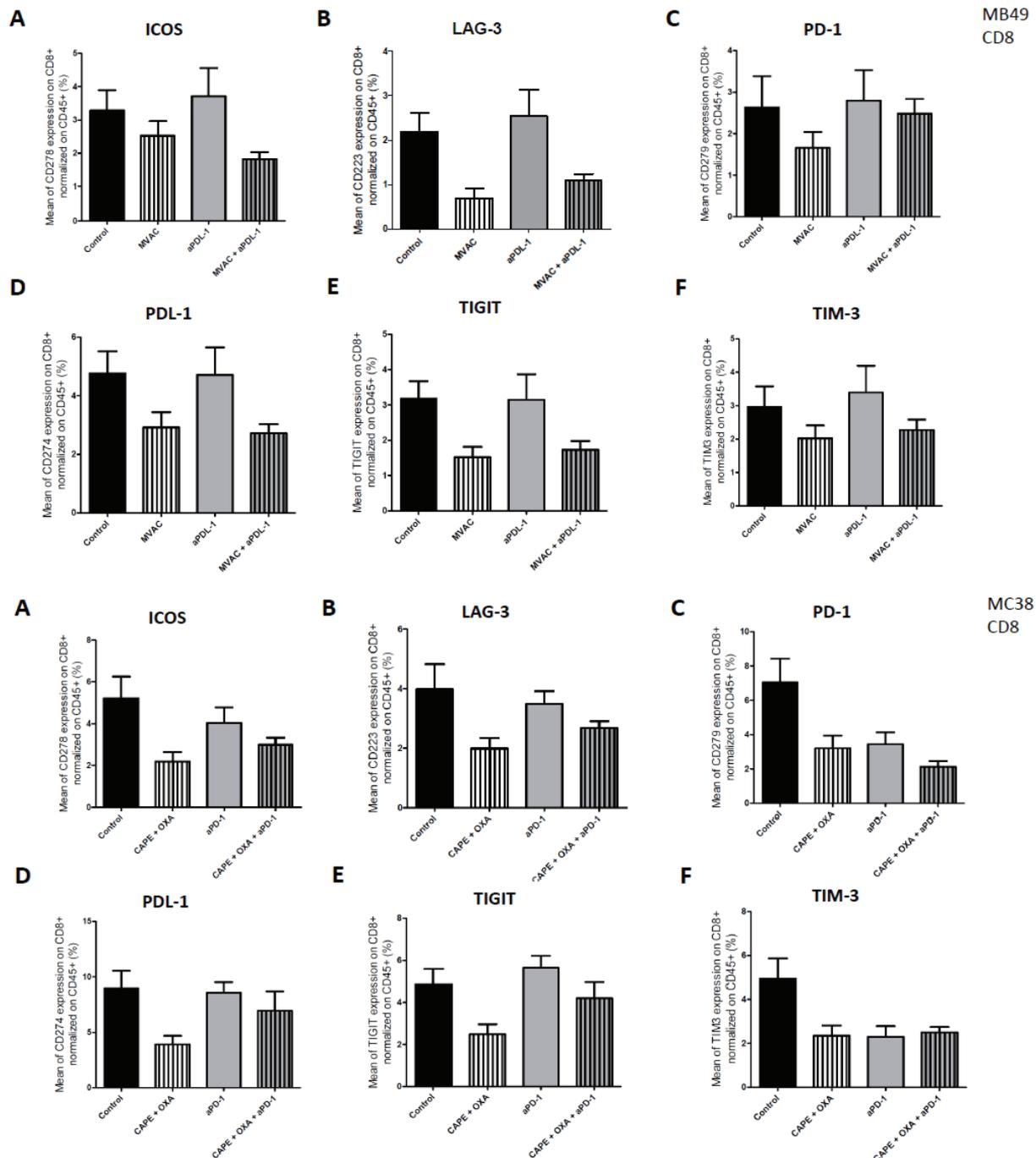




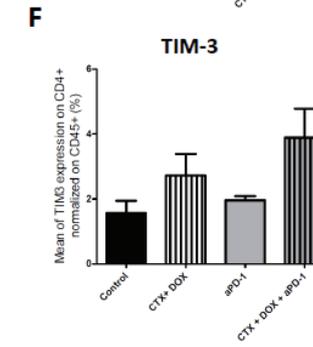
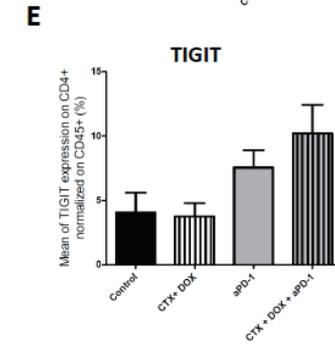
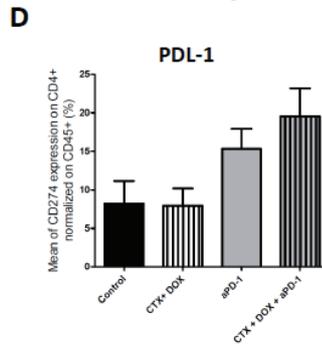
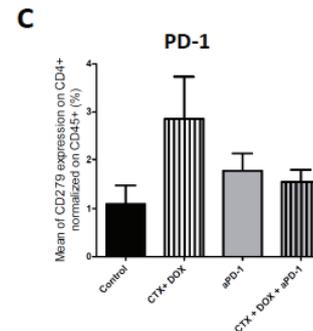
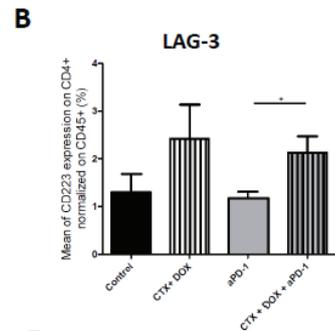
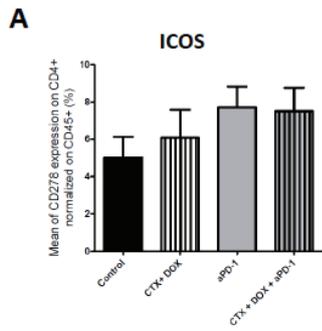
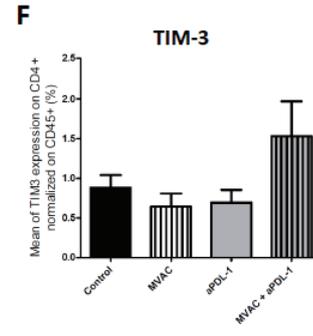
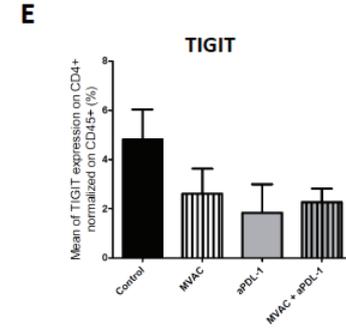
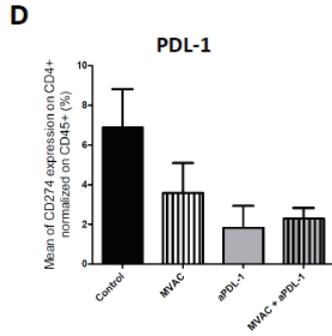
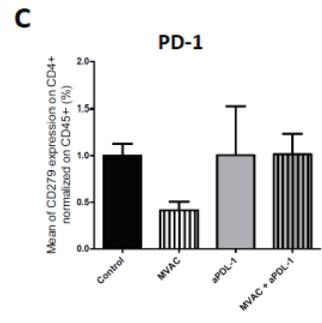
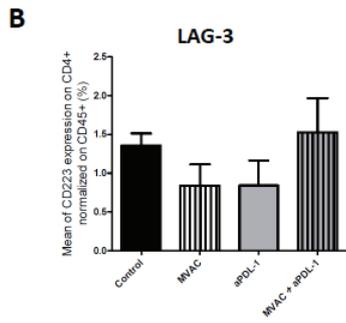
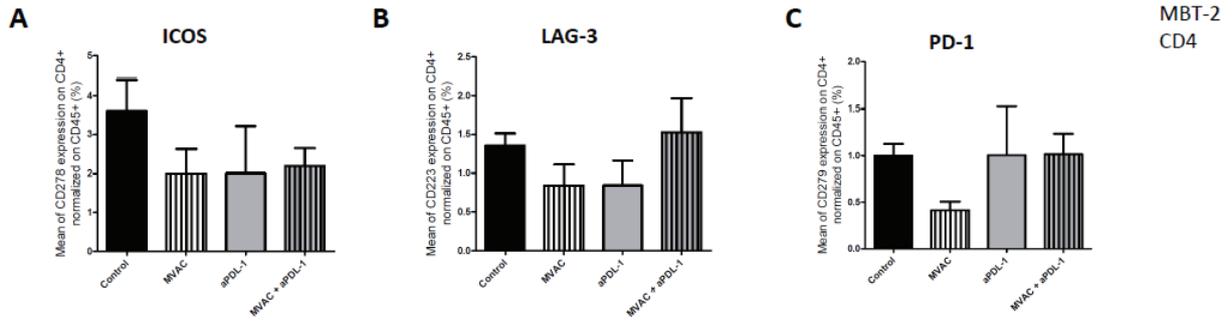


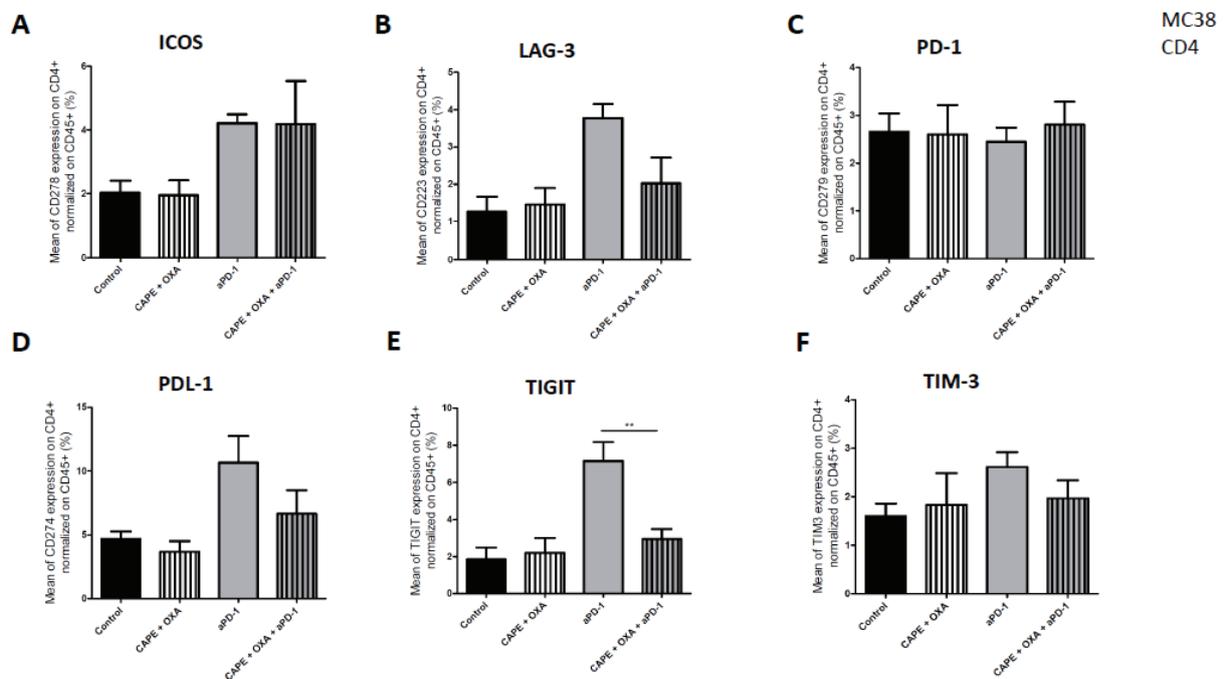
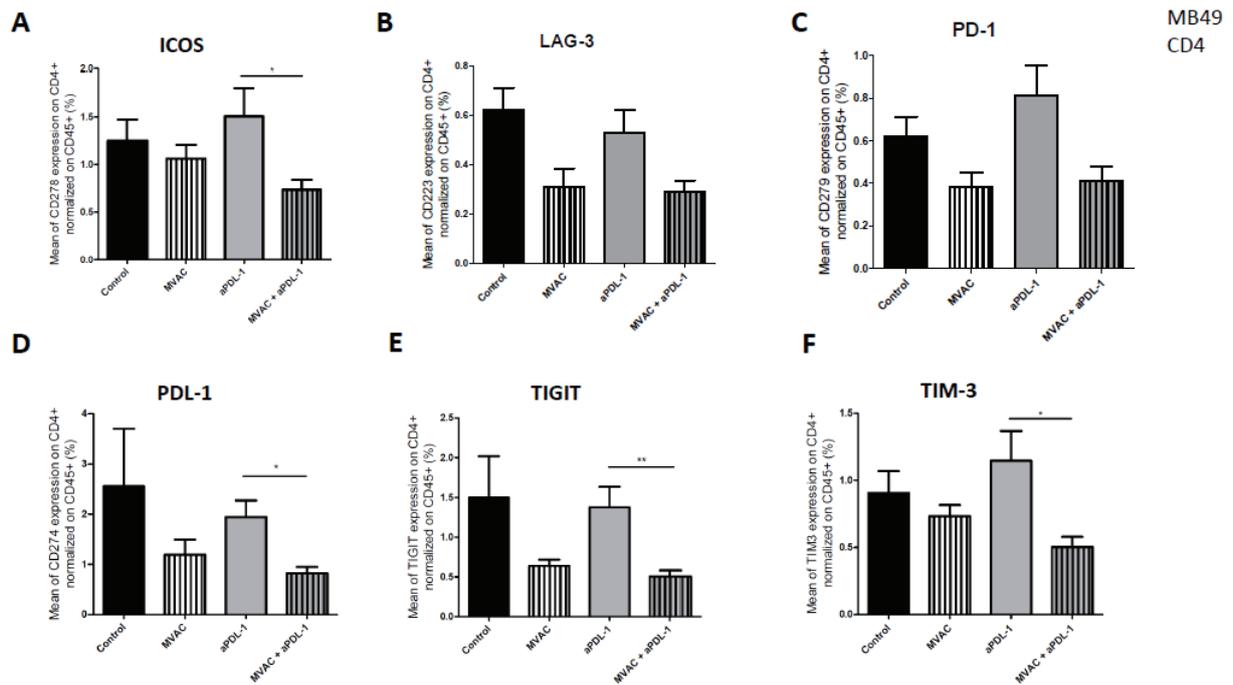
**Figure S5.** Effect of chemotherapies, anti-PD1 or anti-PDL1 mAbs and their combination on leucocyte infiltrate subpopulations in MBT-2, 4T1, MB49 and MC38 preclinical tumor models. Flow cytometric analysis of total CD4+ T cells : CD45+CD3+CD4+ (**A**), CD8+ T cells CD45+ CD3+CD8+ (**B**), Granulocytic Myeloid Derived Suppressor Cells (G-MDSC) : CD45+ CD3- CD11b+ Ly6G+ Ly6C- (**C**) Monocytic Myeloid Derived Suppressor Cells (M-MDSC) : CD45+ CD3- CD11b+ Ly6G- Ly6C+ (**D**), M1 macrophages : CD45+ CD3- CD11b+ CD68+ CD206- (**E**), M2 macrophages : CD45+ CD3- CD11b+ CD68- CD206+ (**F**). Mice were treated as in Table S1. Data are shown as mean values+ SEM, n=5 to 6 mice/group (**A**), n=5 to 6 mice/group (**B**), n=6 mice/group (**C**), n=5 mice/group (**D**). \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*:p<0.001 using Mann-Whitney test.



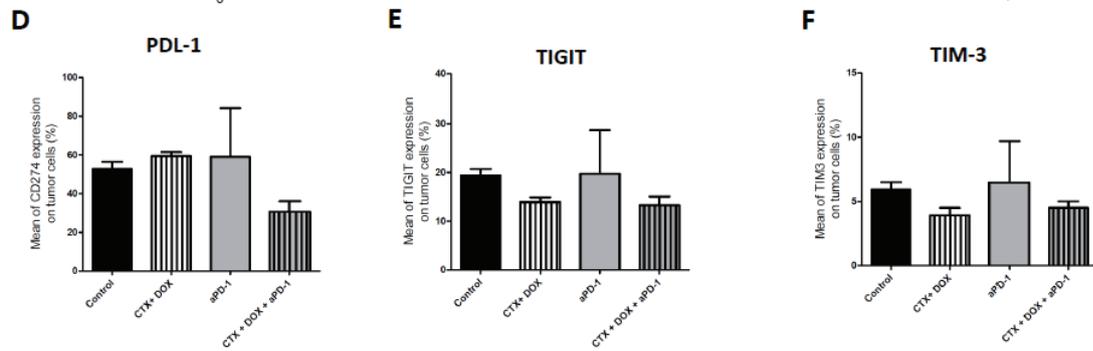
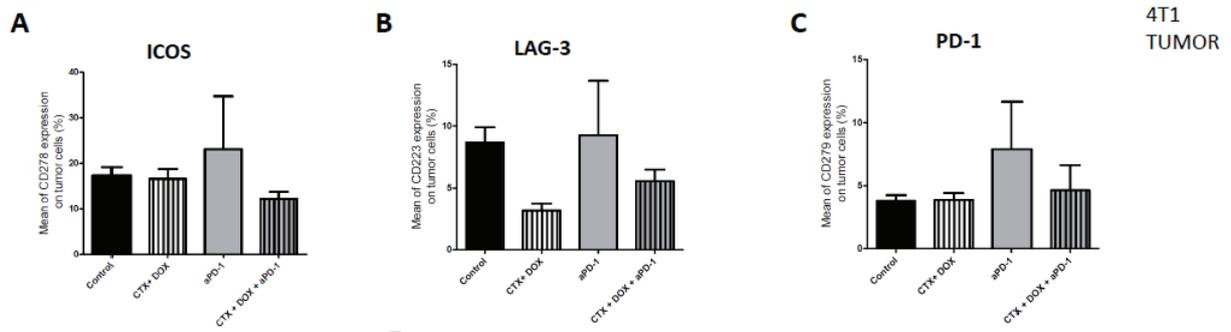
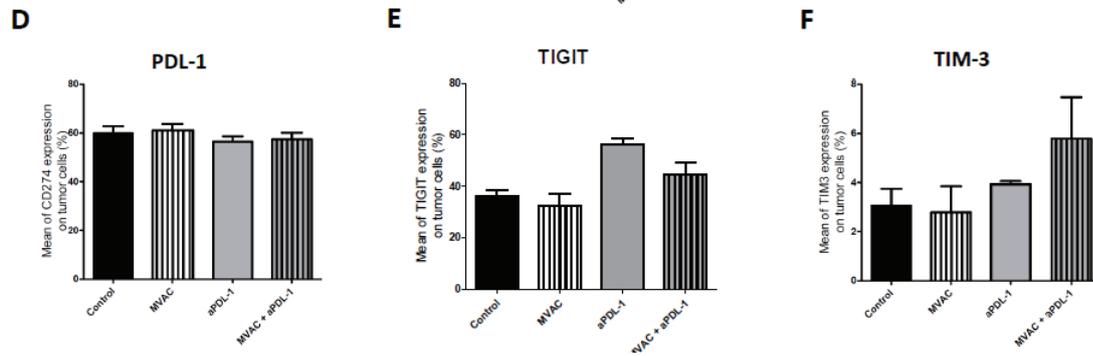
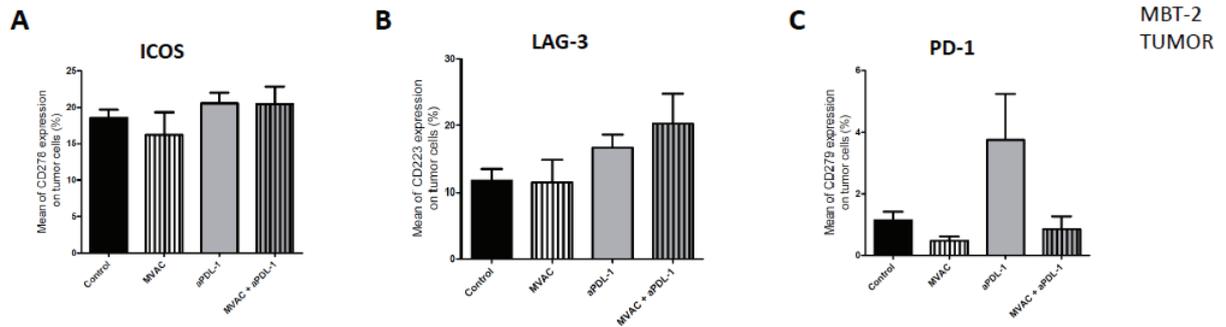


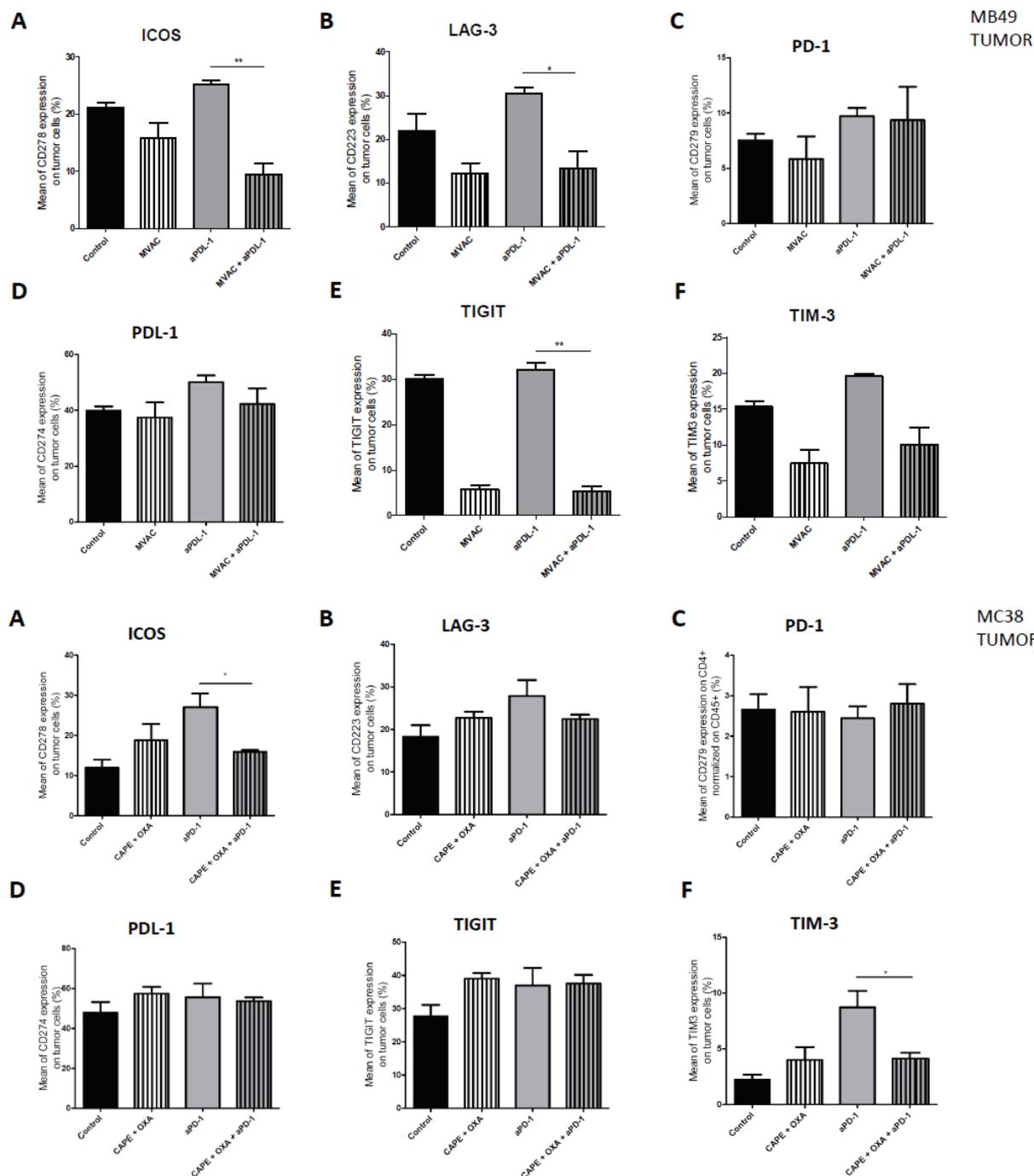
**Figure S6.** Effect of chemotherapies, anti-PD1 or anti-PDL1 Mabs and their combination on alternative immune checkpoints expression on CD8+ T cells in MBT-2, 4T1, MB49 and MC38 preclinical tumor models. Flow cytometric analysis of CD278 (ICOS) (**A**), CD223 (LAG-3) (**B**), CD279 (PD-1) (**C**), CD274 (PDL-1) (**D**), TIGIT (**E**) and TIM-3 (**F**) on CD8+ T cells infiltrate of CD45+ cells. Mice were treated as in Table S1. Data are shown as mean values+ SEM, n=5 to 6 mice/group (**A**), n=5 to 6 mice/group (**B**), n=6 mice/group (**C**), n=5 mice/group (**D**). \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*:p<0.001 using Mann-Whitney test.





**Figure S7.** Effect of chemotherapies, anti-PD1 or anti-PDL1 Mabs and their combination on alternative immune checkpoints expression on CD4+ T cells in MBT-2, 4T1, MB49 and MC38 preclinical tumor models. Flow cytometric analysis of CD278 (ICOS) (A), CD223 (LAG-3) (B), CD279 (PD-1) (C), CD274 (PDL-1) (D), TIGIT (E) and TIM-3 (F) on CD4+ T cells infiltrate of CD45+ cells. Mice were treated as in Table S1. Data are shown as mean values+ SEM, n=5 to 6 mice/group (A), n=5 to 6 mice/group (B), n=6 mice/group (C), n=5 mice/group (D). \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*:p<0.001 using Mann-Whitney test.





**Figure S8.** Effect of chemotherapies, anti-PD1 or anti-PDL1 Mabs and their combination on alternative immune checkpoints expression on tumor cells in MBT-2, 4T1, MB49 and MC38 preclinical tumor models. Flow cytometric analysis of CD278 (ICOS) (**A**), CD223 (LAG-3) (**B**), CD279 (PD-1) (**C**), CD274 (PDL-1) (**D**), TIGIT (**E**) and TIM-3 (**F**) on tumor cells infiltrate (CD45- cells). Mice were treated as in Table S1. Data are shown as mean values+ SEM, n=5 to 6 mice/group (**A**), n=5 to 6 mice/group (**B**), n=6 mice/group (**C**), n=5 mice/group (**D**). \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*:p<0.001 using Mann-Whitney test.

**Supplementary tables:**

Tumor type	Group	Treatment	Dose (mg/kg)	Route	Treatment schedule
Colorectal cancer MC38	1	Non treated (control)	-	-	-
	2	anti-PD-1	12.5	IP	1/ week
	3	capecitabine	250	Per Os	5 days/week
		oxaliplatin	5	IP	1/week
	4	capecitabine	250	Per Os	5 days/week
		oxaliplatin	5	IP	1/week
		anti-PD-1	12.5	IP	1/ week
Bladder cancer MB49	1	Non treated (control)	-	-	-
	2	anti-PD-1	12.5	IP	1/ week
	3	anti-PD-L1	12.5	IP	1/ week
	4	methotrexate	1	IP	1/week
		vinblastine	0.1	IP	1/week
		doxorubicin	1	IP	1/week
		cisplatin	1	IP	1/week
	5	methotrexate	1	IP	1/week
		vinblastine	0.1	IP	1/week
		doxorubicin	1	IP	1/week
		cisplatin	1	IP	1/week
		anti-PD-1	12.5	IP	1/ week
	6	methotrexate	1	IP	1/week
		vinblastine	0.1	IP	1/week
		doxorubicin	1	IP	1/week
		cisplatin	1	IP	1/week

		anti-PD-L1	12.5	IP	1/ week
Metastatic breast cancer 4T1	1	Non treated (control)	-	-	-
	2	anti-PD-1	12.5	IP	1/ week
	3	anti-PD-L1	12.5	IP	1/ week
	4	cyclophosphamide	100	IP	1/ week
		doxorubicin	2	IP	1/week
	5	cyclophosphamide	100	IP	1/ week
		doxorubicin	2	IP	1/week
		anti-PD-1	12.5	IP	1/ week
	6	cyclophosphamide	100	IP	1/ week
		doxorubicin	2	IP	1/week
		anti-PD-L1	12.5	IP	1/ week
	Bladder cancer MB49	1	Non treated (control)	-	-
2		anti-PD-L1	12.5	IP	1/ week
3		methotrexate	1	IP	1/week
		vinblastine	0.1	IP	1/week
		doxorubicin	1	IP	1/week
		cisplatin	1	IP	1/week
4		methotrexate	1	IP	1/week
		vinblastine	0.1	IP	1/week
		doxorubicin	1	IP	1/week
		cisplatin	1	IP	1/week
		anti-PD-L1	12.5	IP	1/ week

**Table S1.** In vivo experiments design overview

Tube 1	
Population	Label

Teff	CD45+ CD3+ CD4- CD8+ TN $\alpha$ +
Treg	CD45+ CD3+ CD4+ CD8- FoxP3+
<b>Tube 2</b>	
<b>Population</b>	<b>Label</b>
Total MDSC	CD45+ CD3- CD11b+
M-MDSC	CD45+ CD3- CD11b+ Ly6G- Ly6C+
G-MDSC	CD45+ CD3- CD11b+ Ly6G+ Ly6C-
Total TAM	CD45+ CD3- CD11b+
M1 TAM	CD45+ CD3- CD11b+ CD68+ CD206-
M2 TAM	CD45+ CD3- CD11b+ CD68- CD206+
<b>Tube 3</b>	
<b>Population</b>	<b>Label</b>
PD-1	CD45+ CD3+ CD4+/CD8+ CD279+ ; CD45- CD279+
LAG-3	CD45+ CD3+ CD4+/CD8+ CD223+; CD45- CD223+
TIM-3	CD45+ CD3+ CD4+/CD8+ TIM-3+; CD45- TIM-3+
ICOS	CD45+ CD3+ CD4+/CD8+ CD278+; CD45- CD278+
PDL-1	CD45+ CD3+ CD4+/CD8+ CD274+; CD45- CD274+
TIGIT	CD45+ CD3+ CD4+/CD8+ TIGIT+; CD45- TIGIT+

**Table S2.** Flow cytometry assay design overview

	<b>ICI alone</b>	<b>ICI in combination with reference treatment</b>
<b>Bladder cancer</b>	7	11

<b>Colorectal cancer</b>	8	35
<b>Breast cancer</b>	3	41

**Table S3.** Current Phase I-II clinical trials using anti-PD-1 or anti-PDL-1 in breast, colorectal and bladder cancer (from [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), searched items “nivolumab” and “atezolizumab”, 2018, ICI= Immune Checkpoint Inhibitor)

1. Kersten K, Salvagno C, de Visser KE. Exploiting the Immunomodulatory Properties of Chemotherapeutic Drugs to Improve the Success of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2015;6:516.
2. Raedler LA. Opdivo (Nivolumab): Second PD-1 Inhibitor Receives FDA Approval for Unresectable or Metastatic Melanoma. *Am Health Drug Benefits*. 2015 Mar;8(Spec Feature):180–3.
3. Kazandjian D, Suzman DL, Blumenthal G, Mushti S, He K, Libeg M, et al. FDA Approval Summary: Nivolumab for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer With Progression On or After Platinum-Based Chemotherapy. *The Oncologist*. 2016;21(5):634–42.
4. Powles T, Eder JP, Fine GD, Braithel FS, Loriot Y, Cruz C, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*. 2014 Nov 27;515(7528):558–62.
5. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2013 Jul 11;369(2):122–33.
6. Galanina N, Kline J, Bishop MR. Emerging role of checkpoint blockade therapy in lymphoma. *TherAdvHematol*. 2017 Feb;8(2):81–90.
7. Lee C-H, Motzer RJ. Immune Checkpoint Therapy in Renal Cell Carcinoma. *Cancer J Sudbury Mass*. 2016 Apr;22(2):92–5.
8. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 22;12(4):252–64.
9. Shin D, Garcia-Diaz A, Zaretsky J, Escuin-Ordinas H, Hu-Lieskovan S, Palaskas NJ, et al. Innate resistance of PD-1 blockade through loss of function mutations in JAK resulting in inability to express PD-L1 upon interferon exposure. *J Immunother Cancer*. 2015 Nov 4;3(Suppl 2):P311.
10. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*. 2017 Feb 9;168(4):707–23.
11. O'Donnell JS, Smyth MJ, Teng MWL. Acquired resistance to anti-PD1 therapy: checkmate to checkpoint blockade? *Genome Med* [Internet]. 2016 Oct 25 [cited 2017 Dec 19];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5080691/>
12. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma — *NEJM* [Internet]. [cited 2017 Dec 19]. Available from: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1604958#t=article>
13. Koyama S, Akbay EA, Li YY, Herter-Sprue GS, Buczkowski KA, Richards WG, et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat Commun*. 2016 Feb 17;7:ncomms10501.

14. Swart M, Verbrugge I, Beltman JB. Combination Approaches with Immune-Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Front Oncol* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2017 Dec 19];6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5088186/>
15. Harris SJ, Brown J, Lopez J, Yap TA. Immuno-oncology combinations: raising the tail of the survival curve. *Cancer Biol Med*. 2016 Jun;13(2):171–93.
16. Safety and efficacy of MPDL3280A (anti-PDL1) in combination with bevacizumab (bev) and/or FOLFOX in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC).: *Journal of Clinical Oncology: Vol 33, No 3\_suppl* [Internet]. [cited 2017 Dec 19]. Available from: [http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2015.33.3\\_suppl.704](http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2015.33.3_suppl.704)
17. Amin A, Plimack ER, Infante JR, Ernstoff MS, Rini BI, McDermott DF, et al. Nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558, ONO-4538) in combination with sunitinib or pazopanib in patients (pts) with metastatic renal cell carcinoma (mRCC). *J ClinOncol*. 2014 May 20;32(15\_suppl):5010–5010.
18. Phase I study combining anti-PD-L1 (MEDI4736) with BRAF (dabrafenib) and/or MEK (trametinib) inhibitors in advanced melanoma.: *Journal of Clinical Oncology: Vol 33, No 15\_suppl* [Internet]. [cited 2017 Dec 19]. Available from: [http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2015.33.15\\_suppl.3003](http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.3003)
19. Antonia SJ, Brahmer JR, Gettinger S, Chow LQ, Juergens R, Shepherd FA, et al. Nivolumab (Anti-PD-1; BMS-936558, ONO-4538) in Combination With Platinum-Based Doublet Chemotherapy (PT-DC) in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J RadiatOncol • Biol • Phys*. 2014 Nov 15;90(5):S2.
20. Pfirschke C, Engblom C, Rickelt S, Cortez-Retamozo V, Garris C, Pucci F, et al. Immunogenic Chemotherapy Sensitizes Tumors to Checkpoint Blockade Therapy. *Immunity*. 2016 Feb 16;44(2):343–54.
21. van der Most RG, Currie AJ, Mahendran S, Prosser A, Darabi A, Robinson BWS, et al. Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* CII. 2009 Aug;58(8):1219–28.
22. Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. *Immunity*. 2013 Jul 25;39(1):74–88.
23. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev ClinOncol*. 2011 Mar;8(3):151–60.
24. Cui S. Immunogenic Chemotherapy Sensitizes Renal Cancer to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Preclinical Models. *Med SciMonitInt Med J ExpClin Res*. 2017 Jul 11;23:3360–6.

25. Dosset M, Vargas TR, Lagrange A, Boidot R, Végran F, Roussey A, et al. PD-1/PD-L1 pathway: an adaptive immune resistance mechanism to immunogenic chemotherapy in colorectal cancer. *Oncol Immunology*. 2018 Feb 8;0(ja):00–00.
26. Faiena I, Cummings AL, Crosetti AM, Pantuck AJ, Chamie K, Drakaki A. Durvalumab: an investigational anti-PD-L1 monoclonal antibody for the treatment of urothelial carcinoma. *Drug Des Devel Ther*. 2018 Jan 23;12:209–15.
27. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Lond Engl*. 2016 May 7;387(10031):1909–20.
28. Mosely SIS, Prime JE, Sainson RCA, Koopmann J-O, Wang DYQ, Greenawalt DM, et al. Rational Selection of Syngeneic Preclinical Tumor Models for Immunotherapeutic Drug Discovery. *Cancer Immunol Res [Internet]*. 2016 Dec 6 [cited 2017 Oct 10]; Available from: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/content/early/2016/12/19/2326-6066.CIR-16-0114>
29. Shayan G, Srivastava R, Li J, Schmitt N, Kane LP, Ferris RL. Adaptive resistance to anti-PD1 therapy by Tim-3 upregulation is mediated by the PI3K-Akt pathway in head and neck cancer. *Oncoimmunology*. 2017;6(1):e1261779.
30. Mino-Kenudson M. Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) expression by immunohistochemistry: could it be predictive and/or prognostic in non-small cell lung cancer? *Cancer Biol Med*. 2016 Jun;13(2):157–70.
31. Wargo JA, Reuben A, Cooper ZA, Oh KS, Sullivan RJ. Immune Effects of Chemotherapy, Radiation, and Targeted Therapy and Opportunities for Combination With Immunotherapy. *Semin Oncol*. 2015 Aug;42(4):601–16.
32. Kepp O, Pol J, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic Stress and Death of Cancer Cells in Natural and Therapy-Induced Immunosurveillance. In: *Oncol Immunology [Internet]*. Springer, Cham; 2018 [cited 2017 Dec 19]. p. 215–29. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-62431-0\\_12](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-62431-0_12)
33. Gotwals P, Cameron S, Cipolletta D, Cremasco V, Crystal A, Hewes B, et al. Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2017 Mar 24;17(5):nrc.2017.17.
34. Fournier C, Rivera Vargas T, Martin T, Melis A, Apetoh L. Immunotherapeutic properties of chemotherapy. *Curr Opin Pharmacol [Internet]*. 2017 May 24 [cited 2017 Nov 13]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147148921730019X>
35. Ramakrishnan R, Assudani D, Nagaraj S, Hunter T, Cho H-I, Antonia S, et al. Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *J Clin Invest*. 2010 Apr;120(4):1111–24.

36. Shaw TJ, Senterman MK, Dawson K, Crane CA, Vanderhyden BC. Characterization of intraperitoneal, orthotopic, and metastatic xenograft models of human ovarian cancer. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2004 Dec;10(6):1032–42.
37. Du Q, Jiang L, Wang X-Q, Pan W, She F-F, Chen Y-L. Establishment of and comparison between orthotopic xenograft and subcutaneous xenograft models of gallbladder carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2014;15(8):3747–52.
38. Sellers RS, Clifford CB, Treuting PM, Brayton C. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. *VetPathol*. 2012 Jan;49(1):32–43.

Dans ce chapitre II, nous avons ainsi démontré dans plusieurs modèles *in vivo* que la modulation de l'infiltrat immunitaire par des agents cytotoxiques de chimiothérapies pouvait impacter fortement l'efficacité des inhibiteurs des points de contrôles immunitaires. Ainsi, nous avons observé une potentialisation dans des modèles de colon et vessie, une inhibition dans un autre modèle préclinique de vessie, et aucun effet dans un modèle de cancer du sein métastatique.

Nous avons pour objectif de mimer la réalité de la pratique clinique, en choisissant des chimiothérapies représentatives du type de cancer étudié. Cependant, concernant le cancer du côlon MC38, la chimiothérapie standard utilisée en première ligne de traitement est généralement le FOLFIRI, un mix d'acide folinique, de fluorouracil et d'irinotécan. Cependant, cette chimiothérapie administrée chez la souris s'est révélée très toxique, et nous avons ainsi préféré nous diriger vers un mélange de capécitabine et oxaliplatine, également utilisée dans le traitement du cancer du côlon. Ce type de combinaisons de chimiothérapies avec des inhibiteurs de PCI est par ailleurs largement étudié en clinique : à titre d'exemple, 87 essais cliniques de combinaisons sont actuellement en cours pour les cancers du côlon, du sein et de la vessie.

Toujours dans une volonté de représentativité de la réalité de la pratique clinique, nous avons réalisé nos essais de combinaisons sur différents modèles tumoraux, et dans des modèles de souris syngéniques, afin de bénéficier d'une immunité complète. Pour éviter toute forme de rejet, nous avons utilisé des fonds génétiques adaptés au type de cancer : C57Bl/6 pour les lignées cellulaires MB49 et MC38, BALB/c pour la lignée 4T1 et C3H pour la lignée MBT-2. Ces différences peuvent inclure un biais car la composition immunitaire peut varier entre les souches. A titre d'exemple, dans la revue de Mestas et al. en 2004, puis de Sellers et al., en 2012, on note des différences de prédominance Th1/ Th2 entre les souris C57Bl/6 et les BALB/c<sup>256</sup>. Ces variations sont importantes à prendre en considération, dans l'analyse de l'infiltrat immunitaire. Cependant, pour une prise tumorale efficace, le choix de souches différentes reste obligatoire, et on peut également extrapoler cette diversité aux différences que l'on peut trouver chez les patients.

Pour des raisons de facilité de mise en place, et de reproductibilité, nous avons décidé d'étudier la réponse anti-tumorale de nos combinaisons anti-PD1/ PDL-1 avec les chimiothérapies sur des modèles de tumeurs sous-cutanées. Il serait également

intéressant de comparer ces modèles à des modèles orthotopiques. En effet, le fait d'injecter les cellules tumorales à leur emplacement anatomique habituel pourrait simuler de manière plus réaliste le cancer observé en clinique, et cela permettrait de comparer la cohérence dans l'analyse du microenvironnement tumoral entre ces deux méthodes de prise tumorale après traitement.

Lors de notre étude, nous avons constaté que l'ensemble des modèles étudiés étaient à l'origine largement infiltré par des cellules de phénotype immunosuppresseur, et le traitement par les anticorps seuls pouvait déjà agir de façon importante pour inverser le ratio cellules immunosuppressives/ effectrices. Par exemple, le traitement anti-PD1 en monothérapie dans le modèle MC38 augmente l'infiltrat leucocytaire total, les cellules T CD4 et CD8. En revanche, cette inversion n'est pas toujours corrélée à une efficacité in vivo. C'est le cas pour le modèle 4T1, on l'administration de la combinaison cyclophosphamide/ doxorubicine avec l'anti-PD1 entraîne une augmentation spectaculaire de l'infiltrat CD4, CD8 et écrase l'infiltrat de base de cellules immunosuppressives, sans pour autant qu'on observe le moindre effet anti-tumoral in vivo. Cependant, une explication probable à cette observation réside dans le fait qu'une seule observation dans la fenêtre thérapeutique a été réalisée. En effet, nous avons prélevé les tumeurs et réalisé notre étude de cytométrie en flux au jour J4 après l'administration des traitements sur tumeurs établies, car il s'agit d'une cinétique assez utilisée dans la littérature. Il serait préférable, dans de futures expérimentations, de réaliser plusieurs « timepoint », dont un en point final, pour connaître l'évolution du phénotype immunitaire dans une cinétique plus importante.

Un autre point important à soulever reste l'absence de certains marqueurs dans notre stratégie d'immunophénotypage. Nous nous sommes focalisés sur les cellules effectrices, immunosuppressives et l'expression de plusieurs points de contrôles immunitaires. Il aurait été bien de connaître par exemple l'infiltrat de cellules B, ou de DC. De la même manière, notre seul marqueur d'activation des lymphocytes T est le TNF $\alpha$ . Nous avons débuté une modification du panel de cytométrie pour intégrer également des marqueurs du granzyme B et de la perforine, pour avoir une vision plus complète du statut d'activation des lymphocytes T.

Nous avons choisi de réaliser une co-administration des traitements, ce qui est parfois le cas dans la prise en charge des patients (par exemple, dans le cancer du côlon, avec la combinaison du nivolumab et des chimiothérapies de référence,

NCT03414983). L'administration de la chimiothérapie en amont des anticorps anti-PD1, anti-PDL-1, pourrait permettre la libération d'antigènes tumoraux, permettant une immunostimulation et donc une meilleure action des anticorps monoclonaux. Ainsi, en plus de cette étude que nous avons réalisé en co-administration, il aurait été intéressant de tester une autre approche thérapeutique d'administration en première ligne de chimiothérapies, puis de l'anti-PD1/PDL-1. Moduler ces schémas et fréquences d'administration devrait permettre d'aider à la décision d'un design entraînant une réponse in vivo amplifiée.

Nos résultats sont intéressants et nous nous sommes rapprochés aux mieux de la réalité de la pratique clinique, et devraient aider aux choix de certaines chimiothérapies en combinaison aux inhibiteurs des points de contrôles immunitaires en fonction du type de cancer. La future direction de cette étude devrait consister à élargir les modèles d'études, moduler les designs expérimentaux pour ensuite valider nos observations et nos hypothèses dans des échantillons de tumeurs de patients.

### CHAPITRE III. RÉSULTATS – ÉTABLISSEMENT ET CARACTÉRISATION DE MODÈLES RÉSISTANTS IN VIVO

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que les anticorps inhibiteurs des points de contrôles immunitaires pouvaient être potentialisés par la chimiothérapie dans certains types cancéreux. Ce genre de combinaisons pourrait être une des solutions au phénomène de résistance primaire, par exemple lorsque les tumeurs sont décrites comme peu immunogènes.

Il existe en revanche peu de solutions concernant les résistances acquises, survenant après une réponse primaire aux anti-PD1 et anti-PDL-1. Ce manque de solutions est également lié au peu d'informations concernant la mise en place de ce type de résistance.

Dans ce chapitre III, nous avons consacré notre recherche à l'établissement et à la caractérisation de modèles in vivo de résistance acquise aux anti-PD1 et anti-PDL-1, dans 4 modèles tumoraux de cancer du colôn (MC38), de la vessie (MB49 et MBT-2) et du rein (RENCA). Nous avons en premier lieu observé le microenvironnement immunitaire, et démontré une diminution des macrophages de type M1, au rôle anti-tumoral, dans les modèles de résistance acquise à l'anti-PD1. Dans les modèles de résistance acquise à l'anti-PDL-1, nous avons retrouvé une augmentation des cellules immunosuppressives T régulatrices en commun.

De plus, nous avons constaté une augmentation de l'expression de certains points de contrôles immunitaires inhibiteurs, sur les cellules T CD4 et CD8, ainsi que sur les cellules tumorales. Nous avons par conséquent testé l'inhibition de ces points de contrôles alternatifs dans le modèle de cancer du rein résistant à l'anti-PD1, et constaté une potentialisation de l'anti-PD1, qui n'a plus aucun effet en monothérapie.

Nous avons ensuite exploré le profil moléculaire des tumeurs résistantes via une étude RNAseq, et comparé la modulation des gènes entre les tumeurs sauvages et les tumeurs résistantes. Nous avons identifié la modification de 5 gènes communs aux modèles résistants à l'anti-PD1 ou à l'anti-PDL-1. Nous avons vérifié l'expression de ces gènes par PCR, puis l'expression protéique par Western Blot. La sous-

régulation des gènes SERPINF1 et FCNA semblent particulièrement intéressante, ces gènes ayant été décrits comme anti-tumoraux.

# CHARACTERIZATION OF ACQUIRED RESISTANT MODELS TO IMMUNE CHECKPOINT INHIBITORS DEMONSTRATES A MODEL-DEPENDANT PHENOMENA

## Authors

Chloé Grasselly<sup>1,2</sup>, Morgane Denis<sup>1,2</sup>, Joyce Lévy<sup>1,2</sup>, , Aurore Bourguignon<sup>1,2</sup>, Nolan Talhi<sup>2</sup>, Kamel Chettab<sup>1</sup>, Eva Laure Matera<sup>1</sup>, Lars Petter Jordheim<sup>1</sup>, Charles Dumontet<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Anticancer Antibodies, CRCL, INSERM U1052, CNRS UMR 5286, CLB, UCBL, Lyon, France

<sup>2</sup>ANTINEO, Lyon, France

<sup>3</sup>Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

## Keywords

Preclinical models – Drug resistance – PD-1 – PDL-1 – Oncology – tumor microenvironment

## Acknowledgment

We acknowledge Alain Bergeron and François Radvanyi for providing MB49 and MBT-2 cell lines.

This work was supported in part by the Lyric Grant INCa-DGOS-4664 and sponsored by the CIFRE convention number 2015/1066.

## Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed

## Corresponding Author

Pr. Charles Dumontet, Anticancer Antibodies, CRCL, INSERM U1052, CNRS UMR 5286, CLB, UCBL, Lyon, France. ANTINEO, Lyon, France. Faculté Rockefeller, 8 avenue Rockefeller, 69008, Lyon, France. Phone: 33 4 78 77 72 36 Email: charles.dumontet@chu-lyon.fr

## Introduction

Immune checkpoint inhibitors directed against Programmed death 1 (PD-1) and Programmed death ligand 1 (PDL-1) have shown an impressive clinical efficacy in a wide range of cancer types. These monoclonal antibodies (mAbs) have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of patients with various tumors including melanoma, non-small cell lung cancer (NSCLC), Hodgkin's disease, bladder cancer and renal cell carcinoma<sup>1-7</sup>. The action of anti-PD1 and anti-PDL-1 mAbs consists in restoring T cells antitumor functions<sup>8</sup>.

However, a large proportion of patients will present a de novo resistance to these therapies, or will relapse after a primary response. The clinical outcome of patients treated with immune checkpoints mAbs mainly depends on the presence of tumor-infiltrating lymphocytes, and the expression of PDL-1 on tumor cells<sup>9,10</sup>. Mutations in human melanomas inducing  $\beta$ -catenin activation have been linked to primary resistance to anti-PD-L1 and anti-CTLA-4 treatment correlated with T-cell evasion<sup>11</sup>. Moreover, other mechanisms of acquired resistance to anti-PD-1 have been identified such as a mutation in  $\beta$ 2 microglobulin causing inefficient antigen presentation by type I HLA<sup>12</sup>. Mutations of janus kinase 1 and janus kinase 2 genes, causing a total loss of interferon response, have also been identified as a mechanism of adaptive resistance in melanoma<sup>12</sup>. Furthermore, a preclinical model of acquired resistance to PD-1 blockade, using a genetically engineered mouse model of lung cancer, has shown an upregulation of the alternative immune checkpoint T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM-3)<sup>13</sup>. In clinical samples, a correlation between increased expression of inhibitory immune checkpoints and progression of lung cancer disease has also been demonstrated<sup>14</sup>. Nonetheless, the underlying mechanisms of innate and acquired resistance still remain largely unknown, and need to be further explored, notably through the establishment and analysis of robust in vivo models of resistance to immune checkpoint antibodies.

Thus, in this study we used immunocompetent mouse models of diverse type of cancers (colorectal, bladder and renal cancers), initially responding to PD-1/ PDL-1 axis blockade. We then chose to develop in vivo models of resistance from those sensitive models. We studied the characteristics of the resistant models, in comparison to sensitive models, by focusing on the modulation of immune cells infiltrate subsets (both immunosuppressive and activating cells), and on alternative immune checkpoint expression on both tumor cells and T cell infiltrates, such as the inhibitory checkpoints TIM-3, Lymphocyte-Activation Gene 3 (LAG-3), PD-1, PDL-1 and TIGIT, and the activating immune checkpoint Inducible T-cell COStimulator (ICOS). We also observed tumor cell genetic alterations, via an RNA sequencing analysis, and identified 5 genes of interest with an altered expression in resistant tumors.

Our results suggest novel potential therapeutic strategies to overcome resistance to immune checkpoint blockade, particularly using combination therapies.

## Materials and Methods

## **Cell culture**

Murine colon cancer MC38 cells (Kerafast, USA) were cultured in DMEM medium with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and streptomycin. The murine renal cell carcinoma cell line RENCA (ATCC, ATCC® CRL-2947™) and the murine bladder cancer cell lines MBT-2 and MB49 (kindly provided by Alain Bergeron, Laval University, Canada) were cultured with RPMI medium with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and streptomycin. Cells were incubated in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

## **Establishment of resistant models**

MC38 cells and MB49 cells were injected in C57BL6 mice (Janvier Lab), RENCA cells were injected in BALB/c mice (Charles River Lab) and MBT-2 cells were injected in C3H mice (Charles River Lab). In all cases, suspensions of exponentially growing cancer cells diluted in 0.2 mL of PBS were injected subcutaneously into the right flank of mice (2.10<sup>6</sup> cells for MC38, MB49 and MBT-2 models, 5.10<sup>6</sup> cells for the RENCA model). When tumor volume reached 200 mm<sup>3</sup>, mice were randomized and the first treatment was administered (n=5 to 6 for tumor growth and flow cytometry analysis). The tumor volume was measured every three days (length x width) with a caliper. The tumor volume was determined using the formula:  $\frac{4}{3} \times \pi \times r^3$ . To establish the resistant models, mice tumor initially responding to anti-PD-1 (RMP1-14, BioXCell) or anti-PD-L1 (10F.9G2, BioXCell), were serially implanted subcutaneously into new groups of naive mice and treated once a week to keep a selection pressure. At least 5 passages were necessary to induce acquired resistance. All mice were raised in SPF environment with free access to standard food and water. This study was approved by the Animal Ethics Committee of the University Claude Bernard of Lyon.

Four days after first administration of treatment, half of the mice in each group were sacrificed to analyze their tumor microenvironment by flow cytometry, while the other mice pursued treatment in order to determine sensitivity to therapy.

## **Cross resistance in vivo assay**

RENCA, MBT-3 and MC38, MB49 resistant tumors pieces were implanted into the right flank of respectively immunocompetent BALB/C, C3H and C57Bl/6 mice in subcutaneous way. When tumors volume reached 200 mm<sup>3</sup>, mice were randomized and the first treatment was administered (n=4 to 6 mice per group). Mice implanted with anti-PD-1 resistant tumors were treated with anti-PDL-1 (10F.9G2, BioXCell, IP, once a week), and mice implanted with anti-PDL-1 resistant tumors were treated with anti-PD-1 (RMP1-14, BioXCell, IP, once a week).

## **Treatments with alternative immune checkpoint inhibitors**

RENCA and MC38 anti-PD-1 resistant tumor fragments were implanted subcutaneously into the right flank of immunocompetent BALB/C and C57Bl/6 mice,

respectively. When tumor volume reached 200 mm<sup>3</sup>, mice were randomized and the first treatment was administered (4 to 6 mice per group). Groups of treatment were performed as follows: anti-IgG2a as a control (clone 2A3, BioXCell, 250 µg/week once a week), anti-PD-1 (clone RMP1-14, BioXCell, 250 µg/week once a week), anti-TIM-3 (clone RMT3-23, BioXCell, 250 µg twice a week), anti-LAG-3 (clone C9B7W, BioXCell, 200 µg twice a week), anti-CTLA-4 (clone 9D9, BioXCell, 100 µg twice a week) and the combinations anti-PD-1 with anti-TIM3, anti-PD-1 with anti-LAG-3, anti-PD-1 with anti-CTLA-4.

### **Flow cytometry analysis**

The tumors were collected, mechanically dissociated, gently flushed in PBS and counted. Cells surface were stained with the fluorescently labeled antibodies, according to manufacturer's recommendation. Three panels were designed: the panel 1 to observe CD4 and CD8 T cells, T reg and T effector cells. The panel 2 to observe suppressive cells MDSC and M2 macrophage, but also M1 macrophages, and the panel 3 to observe immune checkpoint expression on CD4 T cells, CD8 T cells and tumor cells, including PD1, PDL-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT and ICOS. The first panel used Pacific orange coupled anti-CD45 (30F11, BD Biosciences), BV605 coupled anti-CD4 (RM4-5, Miltenyi Biotec), Percp coupled anti-CD8 (53-6.7, Miltenyi Biotec), APC cy7 coupled anti-CD3 (REA606, Miltenyi Biotec), APC coupled anti-TNFα (REA636, Miltenyi Biotec) and PE coupled anti-FoxP3 (3G3, Miltenyi Biotec). The second panel used Pacific orange coupled anti-CD45 (30F11, BD Biosciences), APC cy7 coupled anti-CD3 (REA606, Miltenyi Biotec) Pacific blue coupled anti-CD68 (FA-11, Miltenyi Biotec), PE Texas Red coupled anti-CD11b (REA592, Miltenyi Biotec), PE-cy7 coupled anti-Ly-6C (1G7.G10, Miltenyi Biotec), APC coupled anti-Ly6G (REA526, Miltenyi Biotec) and FITC coupled anti-CD206 (C068C2, BioLegend).

The third panel used Pacific orange coupled anti-CD45, BV605 coupled anti-CD4 (RM4-5, Miltenyi Biotec), APC cy7 coupled anti-CD3 (REA606, Miltenyi Biotec), Percp coupled anti-CD8 (53-6.7, Miltenyi Biotec), Pacific blue coupled anti-CD279 for PD-1 (HA2-7B1, Miltenyi Biotec), AF488 coupled anti-CD223 for LAG3 (C9B7W, Miltenyi Biotec), PE coupled anti-TIM3 (REA602, Miltenyi Biotec), PE Texas Red coupled anti-ICOS (REA192, Miltenyi Biotec), PE cy7 coupled anti-CD274 for PD-L1 (10F.9G2, BioLegend) and APC coupled anti-TIGIT (REA536, Miltenyi Biotec). After surface staining, cells were fixed and permeabilized using BD Cytfix/Cytoperm kit and then labeled with FoxP3 and TNFα. Flow cytometry data were acquired on the LSRII flow cytometer, FlowJo software was used for analyses and GraphPad Prism software was used for statistical analysis (ANOVA with Bonferroni post-test or t-test). Isotype controls were from Miltenyi Biotec.

### **RNAseq**

The RNA sequencing was performed by ProfileXpert LCMT platform using wild-type MB49, anti-PD-1 and anti-PDL-1 resistant 200 mm<sup>3</sup> tumors. For wild-type and anti-

PD-1 resistant MC38 tumors, wild-type and anti-PDL-1 resistant MBT-2 tumors, and wild-type, anti-PD-1 and anti-PDL-1 resistant RENCA tumors, the RNA sequencing was performed by Roche platform, with samples of 200mm<sup>3</sup>.

## **RT-qPCR**

RNA was extracted using the QIAamp RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Random primers (Life Technologies) were used for reverse transcription. Primer sequences were based on Roche database (FigS18) and quantitative PCR was performed using the LightCycler 480 Real-Time PCR system (Roche Life Science, Indianapolis, IN, USA).

## **Western blot**

After tumors dissociation, proteins were extracted with RIPA buffer (RIPA buffer, 1 mM DTT, 1M NaF, 100 mM sodium orthovanadate and protease and phosphatase inhibitors). After SDS PAGE separation, and transfer onto a PVDF membrane by iBlot dry blotting system (Invitrogen), membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies: SepinF1/PEDF (AF1149, R&D SYSTEMS), PADI2 (ab50257, Abcam), FCNA (LS-C293939, LSBio), UGT1A7 (orb313418, Biorbyt) and ENDOU (SAB106581, Sigma Aldrich) (FigS19), and 1h at room temperature with secondary antibodies (IRDye Infrared Dyes from LI-COR Biosciences). Membranes were scanned using Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences) and densitometric quantification was performed with Odyssey software. Quantification of Western Blot was performed using Image J software (Rasband, W.S., National Institutes of Health). Expression levels of proteins were normalized against  $\beta$ -actin.

## **Results**

### **Induction of in vivo resistance to anti-PD-1 and anti-PDL-1 mAbs**

We established resistant models for bladder cancer MB49 and MBT-2, renal cell carcinoma RENCA, and colorectal cancer MC38. During the first passages, mice were randomized when tumors were well-established and treated when the tumor reached a volume of 200mm<sup>3</sup>. Treatments with anti-PD-1 (aPD-1) and anti-PDL-1 (aPDL-1) Mabs were administered at that time (D0), and parental tumors were found to be highly sensitive to therapies, except for MBT-2 which was not sensitive to anti-PD1 Mab (Figure 1 and data not shown). Statistically significant differences were found between NT and aPD-1 or anti-PDL-1 in tumor volumes at end point, except for aPDL-1 treatment in the MB49 bladder cancer model even if an evident trend of tumor growth decline is observed (Figure 1D). In order to mimic an acquired resistance, serial reimplantation of these responding tumors, and equal

treatments design were performed. After five cycles of consecutive reimplantation and treatments, tumors progressively became resistant to aPD-1 and aPDL-1 therapy. At that time, there was no longer significant differences in term of tumor volume between NT control groups and groups treated with aPD-1 and aPDL-1 (Figure 2). For MBT-2 bladder cancer model, a primary response was only obtained for aPDL-1 (Figure 1C). As a consequence, only the aPDL-1 resistant model was developed (Figure 2C).

### **Strong heterogeneity of immune cell subsets upon acquisition of resistant phenotypes**

The tumor microenvironment infiltrate profile was characterized by flow cytometry, by analyzing each sensitive and resistant tumor type at baseline and four days after a single treatment administration. This characterization included the quantification of the total immune infiltrate, cells considered as having anti-tumor function including CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells, type 1 macrophages, and the ratio TNF $\alpha$ +CD8<sup>+</sup> T cells to total CD8 T cells (activated T cells). Furthermore, we quantified « pro-tumor » cells including Granulocytic and Monocytic Myeloid Derived Suppressor Cells (respectively G-MDSC and M-MDSC), type 2 macrophages and the proportion of T reg cells among CD4 cells via the ratio FoxP3+CD4<sup>+</sup>/total CD4<sup>+</sup> cells. The results were expressed as the mean of the percentages of cells in each treatment group, normalized to total CD45<sup>+</sup> cells. The gating strategy is shown in FigS1 and Table S1.

Total leukocyte infiltrate was quantified as the percentage of CD45<sup>+</sup> events in the total tumor suspension.

**Total leukocyte infiltrate.** A decrease in total leukocyte infiltrate was observed in both aPD-1 and aPDL-1 resistant models at baseline (respectively R aPD-1 NT and R aPDL-1 NT), in comparison with wild-type non-treated tumors. (Figure 3, FigS15), in the case of MB49 bladder cancer model. Interestingly, on the contrary in the other bladder cancer preclinical tumors MBT-2, the leukocyte infiltrate was increased in both R aPDL-1 NT and treated resistant tumors (R aPDL-1 T) (Figure 3, Fig S11). This increase was also found in the MC38 resistant to aPDL-1 non-treated group (R aPDL-1 NT) (Figure 3, FigS7). The renal cell carcinoma model RENCA was the only one model where there was no change between wild-type and resistant tumors, in all treatment conditions. (Figure 3, FigS3).

**Immune populations.** We observed a decrease of CD4 T cells infiltrate after a single anti-PD-1 treatment administration in the RENCA and MC38 models (R aPD-1 T) (Figure 3, FigS3, FigS7). An opposite trend was observed in the MBT-2 model, both with anti-PDL-1 treatment (R aPDL-1 T) and in non-treated tumors (R aPDL-1 NT) (Figure 3, FigS11). No significant differences were observed for the MB49 model (Erreur ! Source du renvoi introuvable., FigS15). Regarding CD8 T cells infiltrate, resistant models did not display any changes in comparison with

wild-type tumors in the case of MB49 and RENCA (Figure 3, FigS3, FigS15). However, in the MC38 models, we observed a remarkable decrease of CD8 cells in non-treated and treated aPD-1 resistant models (R aPD-1 NT and R aPD-1 T). This decrease of CD8 T cells was also observed in non-treated resistant aPDL-1 model (R aPDL-1 NT) but was not recovered with a single anti-PDL-1 treatment (R aPDL1 T) (Figure 3, FigS7). Interestingly, this observation is also found in the MBT-2 resistant model (Figure3, FigS11). The CD8 T cells observed are considered as active, with a positive ratio of TNF $\alpha$ + / CD8 observed in all conditions in MC38 model and MBT-2 model (Figure 3, FigS7, FigS11). A positive ratio was also found following one anti-PD-1 treatment in MB49 model (R aPD-1 T), and conversely with anti-PDL-1 in RENCA model (R aPDL-1 T) (Figure 3, FigS3, FigS15). In PDL-1 resistant MB49 and MBT-2 bladder tumors, we observed an increase of NK cells, whereas a decrease was shown in RENCA tumors (Figure 3, FigS4, FigS12, FigS16).

Surprisingly, immunosuppressive M-MDSC were largely decreased in most of the resistant models, except in MBT-2 model where no changes were observed (Figure 3, FigS12). The G-MDSC population was less affected, and was less abundant in the MB49 model in both non-treated and treated aPD-1 resistant models (R aPD-1 NT and R aPD-1 T) (Figure 3, FigS16). An opposite effect of anti-PDL-1 treatment was found in RENCA and MBT-2 resistant tumors (Figure 3 + FigS4, FigS12). An interesting common decrease in anti-tumor M1 was found in all non-treated anti-PD-1 resistant condition, in all tumor types (Figure 3, FigS4, FigS8, FigS16), suggesting a common immune signature linked to anti-PD-1 resistance. Similarly, FoxP3+ cells were significantly increased in both non-treated and treated aPDL-1 resistant models (R aPDL-1 NT and R aPDL-1 T) for RENCA, MC38 and MBT-2 models, suggesting there too a common resistance mechanism, and giving the opportunity of therapeutic strategies using T reg suppressors agents to reverse the resistance. The M2 infiltrate was decreased in RENCA R aPDL-1 treated tumors, and was increased in MB49 and MBT-2 resistant models, respectively in anti-PD-1 treated group and anti-PDL-1 treated group (Figure 3, FigS12, FigS16).

### **Alternative immune checkpoint expression is strongly upset in resistant models, in a tumor type dependent fashion**

In addition to intra-tumor T cell and immunosuppressive cell quantifications, we used our mouse models of resistance to investigate the expression of T cell exhaustion markers such as the T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM-3), the Lymphocyte-activation gene 3 (LAG3) and the T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT). We also evaluated PD-1 expression on the T cell surface. In addition, we also looked at the T cell activation marker, Inducible T-cell costimulator (ICOS). Indeed, some studies already described upregulation of TIM-3 as a

mechanism of adaptive resistance to anti-PD-1 therapy. Therefore, we sought to evaluate the impact of PD-1/PD-L1 resistance on alternative checkpoint expression<sup>13</sup>.

Regarding CD4<sup>+</sup> T cells, we observed an impressive significant increase of approximately all the ICP, except for PDL-1 expression, in all the resistant MB49 tumor conditions (Figure4A, FigS17). In the RENCA model, anti-PD-1 treatment involved a decrease of all ICPs except for PD-1 (R aPD-1 T), whereas anti-PDL-1 only caused an upregulation of LAG-3 (Figure4A, FigS5). In MC38 tumors, a decreasing trend was observed in resistant tumors treated with anti-PDL-1 (R aPDL-1 T) (Figure4A, FigS9). In the MBT-2 model, no particular modifications were observed in resistant tumors, except a significant decrease of TIM-3 in anti-PDL-1 resistant non-treated tumors (R aPDL-1 NT) (Figure4A, FigS13). In the case of CD8<sup>+</sup> T cells, there was no change in ICP expression in MB49 resistant models, contrary to CD4<sup>+</sup> T cells (Figure4A, FigS17). In the RENCA model, an increase of all ICP expression was observed in the case of tumors aPDL-1 resistant non-treated (R aPDL-1 NT), and this increase was shared with aPD-1 resistant non-treated tumors (R aPD-1 T) for LAG-3, PD-1 and TIM-3 (Figure4B, FigS5). In the case of MC38 resistant model, the trend is the same than on CD4 T cells, with a decrease of all ICP expression in resistant tumors treated with anti-PDL-1 (R aPDL-1 T) (Figure4B, FigS9), and which had also been found in tumors treated with anti-PD-1 (R aPD-1 T) (Figure4B, FigS9).

In tumor cells, we mainly observed an overall increase of ICPs in RENCA and MC38 models, particularly in TIM-3 expression (Figure4C, FigS5, FigS9). This last interesting observation opened the perspective of new treatment strategies combining anti-PD-1 and anti-PDL-1 with alternative ICP blockers to reverse the resistance phenomena.

### **Combination of anti-PD-1 with alternatives immune checkpoint inhibitors considerably improve the antitumor effect in anti-PD-1 resistant RENCA model**

We first tested the cross-resistance of resistant models to other ICP blockers. To that end, we experimented the antitumor efficacy of anti-PD-1 mAb in anti-PDL-1 resistant models, and conversely anti-PDL-1 treatment in anti-PD-1 resistant models. Interestingly, we showed that resistance mechanisms to anti-PD-1 and anti-PDL-1 seemed to be correlated: as we observed a cross-resistance, suggesting that the resistance phenotype was not limited to the antibody used for selection of resistant models (Figure 5).

On the basis of the ICP expression analysis previously described, we then performed an in vivo antitumor efficacy study of alternative ICP blockade anti-LAG-3, anti-TIM-3 and anti-CTLA-4 in combination with anti-PD-1 in anti-PD-1 resistant RENCA model. We observed a slight anti-tumor effect of anti-LAG-3 mAb, whereas anti-TIM-3 and anti-CTLA-4 used as single agents did not show any efficacy in this resistant model (Figure 6). However, in all combinations of alternative immune checkpoint antibodies with anti-PD-1, a significant delay in tumor growth was assessed in comparison with ICP inhibitors used in monotherapy (Figure 6). Moreover, we did not observe adverse toxic effects of those combinations (no effect on body weight or on animal well-being).

### **Identification of genes implicated in resistance phenomena**

In parallel to immune cell infiltrate characterization, an investigation of gene expression modification was performed, to compare wild-type versus non-treated resistant established tumors. Using RNAseq analysis, we identified 5 genes, commonly affected in several anti-PDL-1 and anti-PD-1 resistant models (Figure 7): ENDOU, PADI2, UGT1A7C, FCNA and SERPINF1. Interestingly, SERPINF1 gene encodes for PEDF protein, which induces anti-angiogenic, anti-tumorigenic and anti-metastatic functions<sup>15-17</sup>. Downregulation of this gene may thus be a direct cause of resistance. Furthermore, FCNA was described as an activator of CD8+ T cells, and having antitumor properties<sup>18</sup>. PADI2 has been identified as a potential therapeutic target, because of its tumorigenic role<sup>19,20</sup>. UGT1A7C belongs to the family of UDP-glucuronosyltransferases, and has been associated with pancreatic cancer and gastrointestinal carcinoma<sup>21,22</sup>.

We performed a RT-qPCR in order to verify the level of gene expression (Figure 8). We found a downregulation of SERPINF1 in MC38 and MB49 tumor types (Figure 8). We also observed a decrease of FCNA gene expression in MC38 and MB49 tumor types in RNAseq results, which was confirmed by RT-qPCR in MB49 anti-PD-1 R (Figure 8). As a result, we decided to explore the protein level of SERPINF1 and FCNA in MC38 and MB49 wild-type and resistant tumors (Figure 9). We confirmed a downregulation of FCNA in MB49 resistant tumors to anti-PD-1 and anti-PDL-1, and the decrease of SERPINF1 in MB49 tumors resistant to anti-PD-1 (Figure 9). A slight decrease of FCNA was also observed for MC38 resistant to anti-PD1, but not for SERPINF1. (Figure 9). Thus, we hypothesized that the inhibition of SERPINF1 or FCNA, by CRISPR/Cas9, in wild-type tumor cells, could lead to a resistant profile.

### **Discussion**

In spite of an impressive clinical efficiency, inhibition of immune checkpoint anti-PD-1 and anti-PD-L1 have been found to fail in patients. Indeed, some patients will present an innate resistance, or will relapse after treatment initiation. For instance, only 30% of patient with advanced renal cell carcinoma experience a durable tumor regression using an anti-PD-1 treatment<sup>23</sup>. Understanding mechanisms governing this resistance may offer new opportunity of treatment. Analysis of resistant tumors to treatment may also allow to identify biomarker and so patient failing to response<sup>10</sup>

To elucidate acquired resistance mechanisms, we firstly analyzed tumor microenvironment in syngeneic models of colorectal cancer MC38, bladder cancers MB49 and MBT-2, and renal cell carcinoma RENCA. Our results showed an impressive increase the ratio FoxP3/CD4 in anti-PDL-1 resistant RENCA, MB49 and MBT-2 models compared to sensitive model, showing the activation of regulatory T cells. It could be of great interest to performed a Treg depletion assay, with an in vivo anti-CD25 antibody<sup>24</sup>, in those anti-PDL-1 resistant models, to re-sensitize tumors. Interestingly, we found a reduction of type 1 antitumor macrophages in all anti-PD-1 resistant models. This could be a common immune signature that needs to be explored further in anti-PD-1 resistant models.

We observed an overall increase of all ICP expression on CD4 T cells in MB49 bladder cancer, which was not found on CD8 T cells. On the contrary, MC38 tumors resistant and treated with anti-PD-1 and anti-PDL-1 presented a decrease of most ICP on CD4 and CD8 T cells infiltrate, including ICOS, an activator of T cells. Interestingly, in RENCA model, we have shown an increase of LAG-3 on both CD4 T cells and CD8 T cells, and all ICP expression was increased on CD8 T cells infiltrate in anti-PDL-1 non-treated tumors. This increase is consistent with the acknowledgement that upregulation of ICP expression has shown to be associated with resistance to anti-PD-1. Indeed, Koyama and al observed ICP overexpression in T cells associated with adaptive resistance to anti-PD-1<sup>13</sup>. Besides, Thommen and al established a correlation between ICP on CD8 T cells and the disease progression<sup>14</sup>. They observed an increase expression in ICP including PD-1 and TIM-3 in advanced tumor stage. Expression of ICP was gradually acquired with an early expression of PD-1 and a late expression of LAG-3. Finally, they discovered that a high PD-1 expression was correlated with a T cell dysfunction<sup>14</sup>.

Furthermore, TIM-3 was increased on tumor cells in RENCA resistant model together with MC38 model. Previous investigations have found TIM-3 expression in liver cancer, melanoma, lung cancer and renal cancer and this TIM-3 expression was linked with a poor prognosis<sup>25,26</sup>. TIM-3 expression on clear renal cell carcinoma has notably been demonstrated to contribute to drug resistance such as the standard chemotherapy sunitinib<sup>27</sup>. Moreover, cell lines expressing TIM-3 had stronger self-renewal activities compared to cells with no TIM-3 expression<sup>27</sup>. Unfortunately, the TIM-3 ligand recognized by tumor cells remain unknown. However, recent studies have shown that TIM-3 can activate the NF $\kappa$ B pathway<sup>28</sup>. This pathway may contribute to acquired resistance as it confers oncogenic properties such as cancer stemness acquisition<sup>29</sup>.

As we have shown, other ICP such as have shown to be overexpressed in tumor cells. These ICI may share similar function as TIM-3. The hypothesis is that tumor cells escape the immune system by expressing the same receptor as T cells. Regarding state-of-the-art, all the previously described modifications naturally led us to test an in vivo anti-TIM-3, but also anti-CTLA-4 and anti-LAG-3 in those two preclinical models. We demonstrated a significant antitumor effect of combinations of anti-TIM-3, anti-LAG-3 and anti-CTLA-4 with anti-PD-1 in MC38 and RENCA anti-PD-1 resistant models, giving hope for new efficient clinical therapeutic strategies.

In the context of anti-PD-1 acquired resistance, Zaretsky and al described mutations in Jak1 and Jak2 genes in resistant melanoma tumors<sup>12</sup>. In order to identify genetic alterations between wild-type and resistant tumors, we performed an RNAseq study. We determined common modifications of 5 genes between anti-PD-1 and anti-PDL-1 resistant all types tumors, in comparison with their wild-type tumors. We confirmed the downregulation of SERPINF1 in MC38 anti-PDL-1 resistant model, as well as in MB49 both anti-PD-1 and anti-PDL-1 resistant tumors, via RT-qPCR. Moreover, FCNA gene was also found to be underexpressed in MC38 anti-PD-1 resistant tumors, and MB49 anti-PD-1 and anti-PDL-1 resistant. This decrease was verified by western blot analysis in MB49 and MC38 tumor types. On the basis of these results, we hypothesized that a KO of SERPINF1 and FCNA genes, in MC38 and MB49 wild-type cell lines, could lead to a resistance profile in vivo. We are currently performing a CRISPR/Cas9 method to inhibit those genes that may be a common denominator in anti-PD-1 and anti-PDL-1 mAbs resistance.

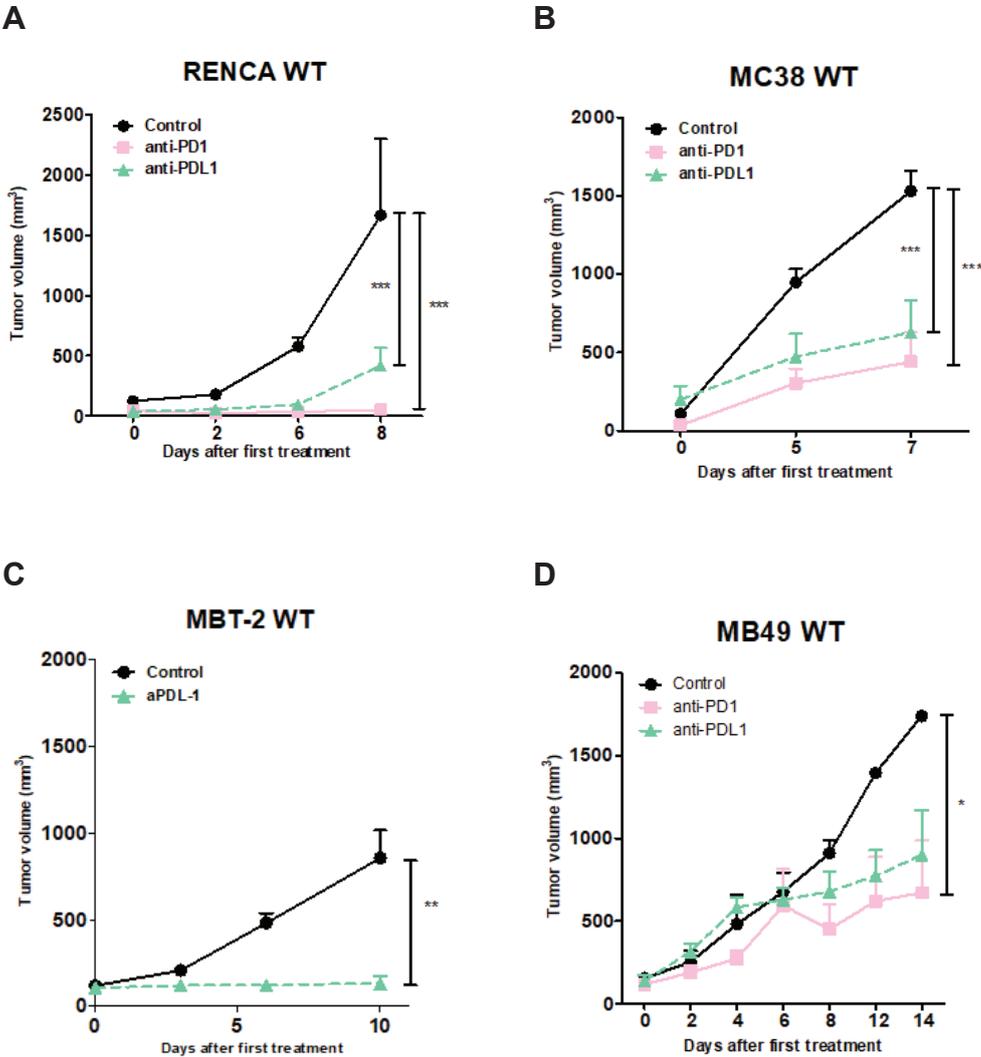
Understanding the dynamics of resistance mechanisms, by means of well-established and well-characterized preclinical models in early stages, will allow identifying alternative therapeutic strategies that can improve efficiency of immune checkpoint blockade, and thereby improve patients survival.

1. Raedler, L. A. Opdivo (Nivolumab): Second PD-1 Inhibitor Receives FDA Approval for Unresectable or Metastatic Melanoma. *Am. Health Drug Benefits* **8**, 180–183 (2015).
2. Topalian, S. L. *et al.* Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 1020–1030 (2014).
3. Safety and clinical activity of MEDI4736, an anti-programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) antibody, in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC):. *Journal of Clinical Oncology: Vol 33, No 15\_suppl.* Available at: [http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2015.33.15\\_suppl.8032](http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.8032). (Accessed: 28th July 2018)
4. Schulze, A. B. & Schmidt, L. H. PD-1 targeted immunotherapy as first-line therapy for advanced non-small-cell lung cancer patients. *J. Thorac. Dis.* **9**, E384–E386 (2017).
5. Nivolumab Approved for Bladder Cancer by European Commission. *Medscape* Available at: <http://www.medscape.com/viewarticle/881115>. (Accessed: 28th July 2018)
6. Imfinzi a New PD-L1 Approved for Bladder Cancer After Platinum-Based Chemotherapy. (2017).
7. Treatment of Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **374**, 888–890 (2016).
8. Alsaab, H. O. *et al.* PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front. Pharmacol.* **8**, (2017).
9. Patel, S. P. & Kurzrock, R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 847–856 (2015).
10. Maleki Vareki, S., Garrigós, C. & Duran, I. Biomarkers of response to PD-1/PD-L1 inhibition. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **116**, 116–124 (2017).
11. Spranger, S., Bao, R. & Gajewski, T. F. Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signaling prevents anti-tumor immunity. *Nature* **523**, 231–235 (2015).
12. Zaretsky, J. M. *et al.* Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **375**, 819–829 (2016).
13. Koyama, S. *et al.* Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat. Commun.* **7**, 10501 (2016).
14. Thommen, D. S. *et al.* Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors. *Cancer Immunol. Res.* **3**, 1344–1355 (2015).

15. Becerra, S. P. & Notario, V. The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 258–271 (2013).
16. He, X., Cheng, R., Benyajati, S. & Ma, J. PEDF and its roles in physiological and pathological conditions: implication in diabetic and hypoxia-induced angiogenic diseases. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **128**, 805–823 (2015).
17. Nwani, N. G. *et al.* Melanoma Cells Block PEDF Production in Fibroblasts to Induce the Tumor-Promoting Phenotype of Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Res.* **76**, 2265–2276 (2016).
18. Ding, Q. *et al.* Ficolin-2 triggers antitumor effect by activating macrophages and CD8+ T cells. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **183**, 145–157 (2017).
19. McElwee, J. L. *et al.* Identification of PADI2 as a potential breast cancer biomarker and therapeutic target. *BMC Cancer* **12**, 500 (2012).
20. Wang, H. *et al.* PADI2 gene confers susceptibility to breast cancer and plays a tumorigenic role via ACSL4, BINC3 and CA9 signaling. *Cancer Cell Int.* **16**, 61 (2016).
21. Zhang, Y. *et al.* Genetic polymorphisms in human UDP-glucuronosyltransferases 1A7 and the risk of gastrointestinal carcinomas: A systematic review and network meta-analysis. *Oncotarget* **8**, 66371–66381 (2017).
22. Yilmaz, L. *et al.* Increased UGT1A3 and UGT1A7 expression is associated with pancreatic cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **16**, 1651–1655 (2015).
23. Ascierto, M. L. *et al.* The Intratumoral Balance between Metabolic and Immunologic Gene Expression Is Associated with Anti-PD-1 Response in Patients with Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunol. Res.* **4**, 726–733 (2016).
24. Setiady, Y. Y., Coccia, J. A. & Park, P. U. In vivo depletion of CD4+FOXP3+ Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by Fcγ3+ phagocytes. *Eur. J. Immunol.* **40**, 780–786 (2010).
25. Zhou, E. *et al.* Up-regulation of Tim-3 is associated with poor prognosis of patients with colon cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 8018–8027 (2015).
26. Zhang, Y., Cai, P., Liang, T., Wang, L. & Hu, L. TIM-3 is a potential prognostic marker for patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* **8**, 31705–31713 (2017).
27. Komohara, Y. *et al.* The Coordinated Actions of TIM-3 on Cancer and Myeloid Cells in the Regulation of Tumorigenicity and Clinical Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinomas. *Cancer Immunol. Res.* **3**, 999–1007 (2015).
28. Tomkowicz, B. *et al.* TIM-3 Suppresses Anti-CD3/CD28-Induced TCR Activation and IL-2 Expression through the NFAT Signaling Pathway. *PLoS One* **10**, e0140694 (2015).

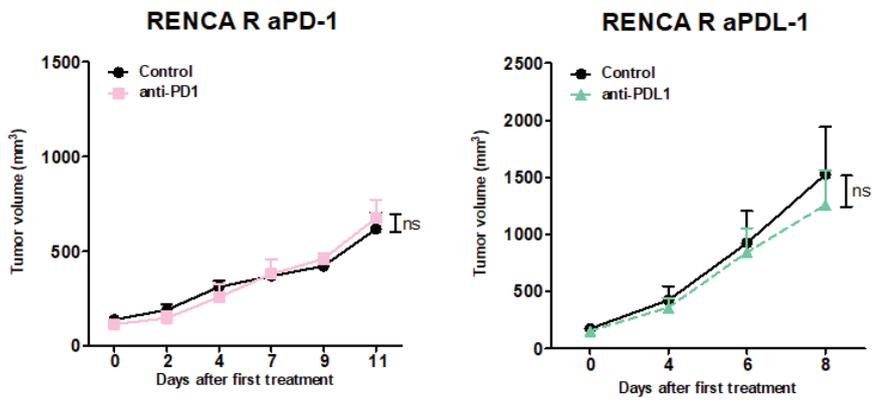
29. Xia, Y., Shen, S. & Verma, I. M. NF- $\kappa$ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 823–830 (2014).

Figures

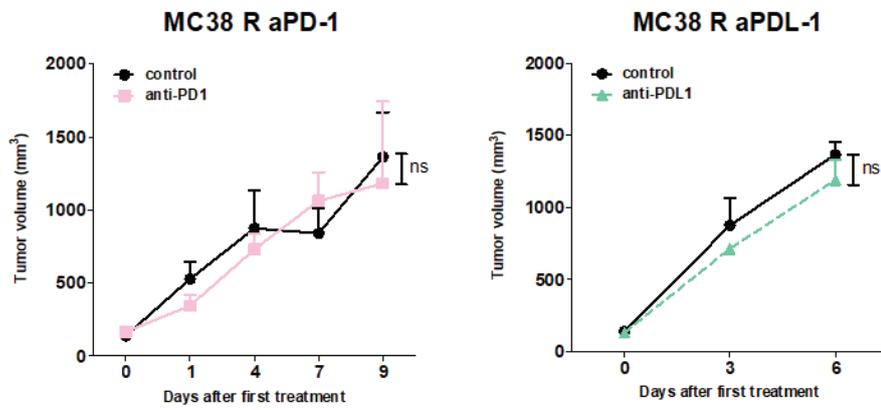


**Figure 1. In vivo efficacy of anti-PD-1 and/or anti-PDL-1 antibodies in four preclinical syngeneic models.** Treatments anti-PD-1 (RMP1-14, BioXCell) and/or anti-PDL-1 (10F.9G2, BioXCell) were administrated in I.P at a dose of 250 µg/mouse, at D0. Mouse models used were RENCA, renal cell carcinoma (A), MC38, colorectal cancer (B), MBT-2, bladder cancer (C) and MB49 bladder cancer (D). Data shown are mean tumor volumes+ SEM. n=5 to 6 mice/group, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*:p<0.001 using Student t.test.

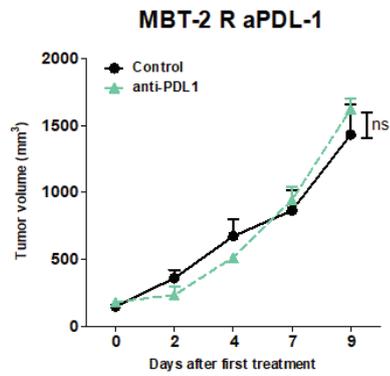
A



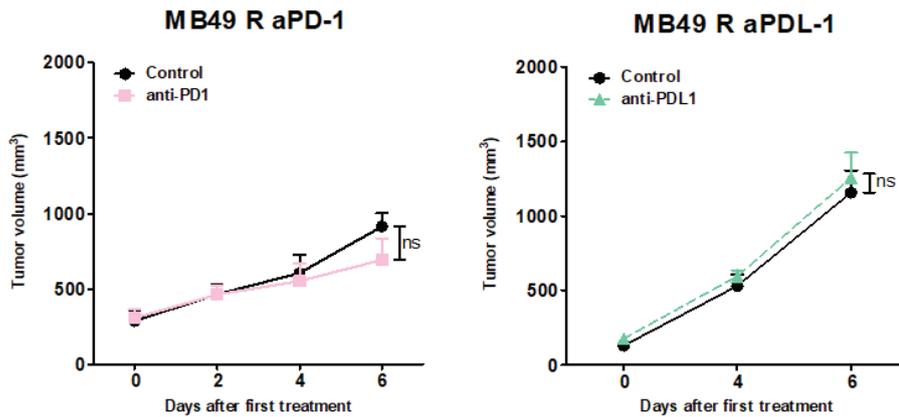
B



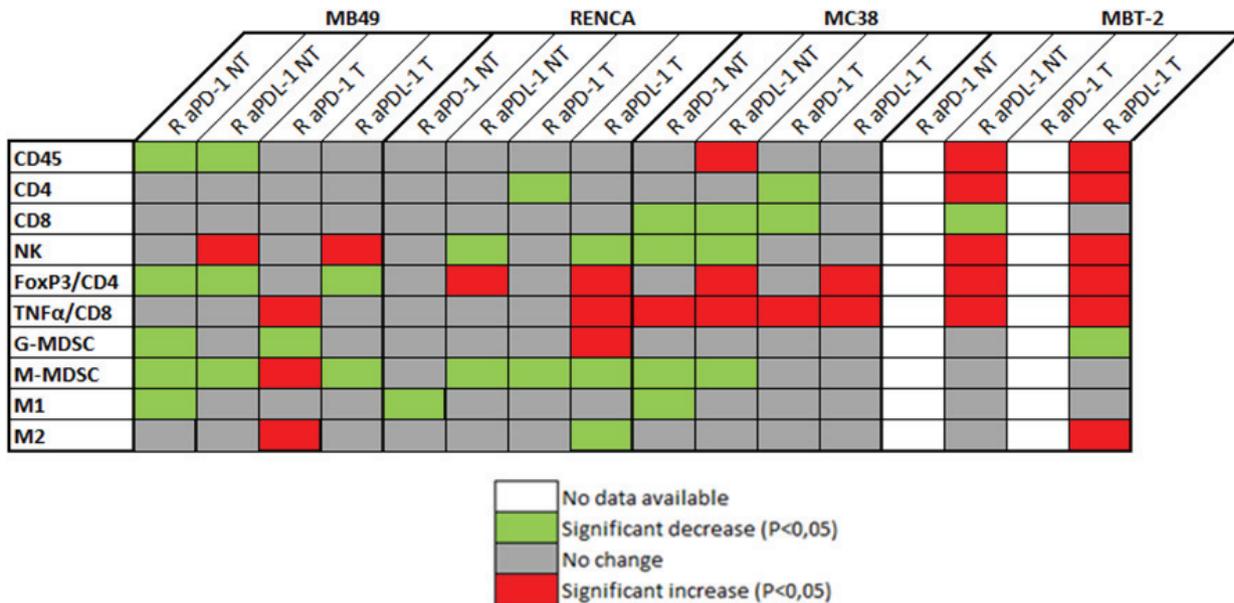
C



D



**Figure 2 – Initially sensitive models became resistant in vivo to anti-PD-1 and/or anti-PDL-1.** Tumors from sensitive models were serially reimplanted and treated, until a resistant phenotype were obtained. Treatments anti-PD-1 (RMP1-14, BioXCell) and/or anti-PDL-1 (10F.9G2, BioXCell) were administrated in I.P at a dose of 250 µg/mouse, at D0. Mouse models used were RENCA, renal cell carcinoma (A), MC38, colorectal cancer (B), MBT-2, bladder cancer (C) and MB49 bladder cancer (D). Data shown are mean tumor volumes+ SEM. n=5 to 6 mice/group, ns: p>0.05, using Student t.test.



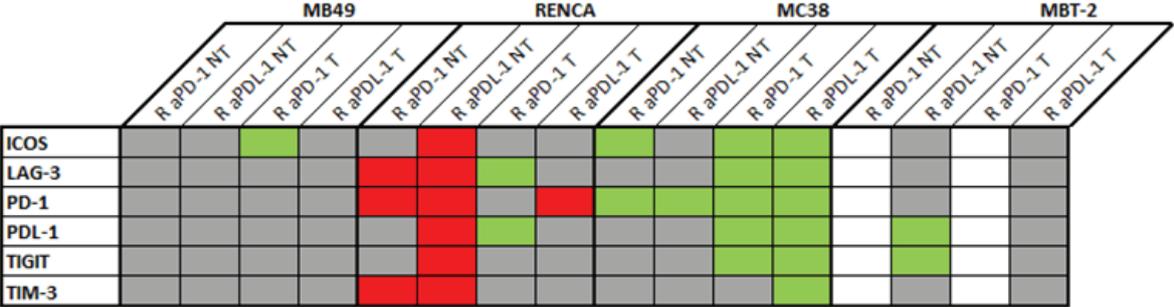
**Figure 3 – Heatmap of immune cells infiltrate in resistant tumors.** Non treated tumors resistant to anti-PD-1 (R aPD-1 NT) or to anti-PDL-1 (R aPDL-1 NT) were compared with wild-type non treated tumors. Resistant tumors treated with anti-PD-1 (R aPD-1 T) or anti-PDL-1 (R aPDL-1 T) were compared respectively with wild-type tumors treated with anti-PD-1 or anti-PDL-1. Flow cytometry analysis was performed at day 4 after the first treatment administration. The gating strategy is presented in Annex ???. Significant decreases and increases were assessed by a two-way ANOVA statistical test, with Bonferroni post test. n = 4 to 6 tumors per group. NK= Natural Killer, FoxP3= Forkhead box 3, TNFα = Tumor Necrosis Factor α, G-MDSC =

Granulocyte-like Myeloid Derived Suppressor Cells, M-MDSC = Monocytic Myeloid Derived Suppressor Cells, M1 = Type 1 Macrophages, M2 = Type 2 Macrophages.

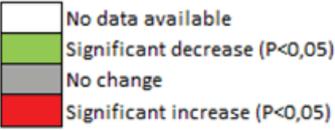
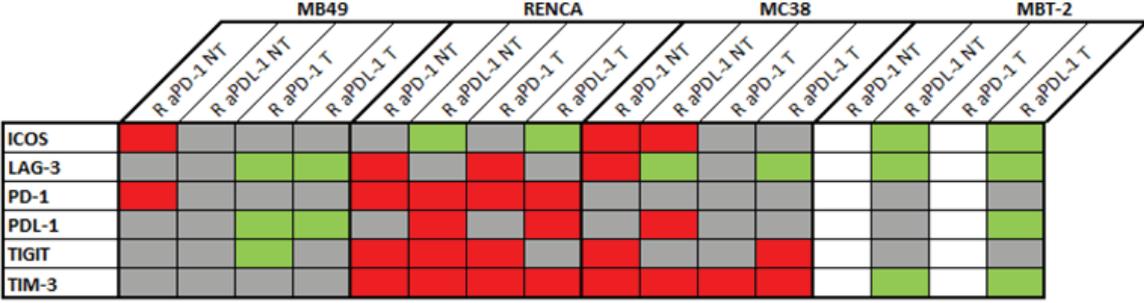
A



B



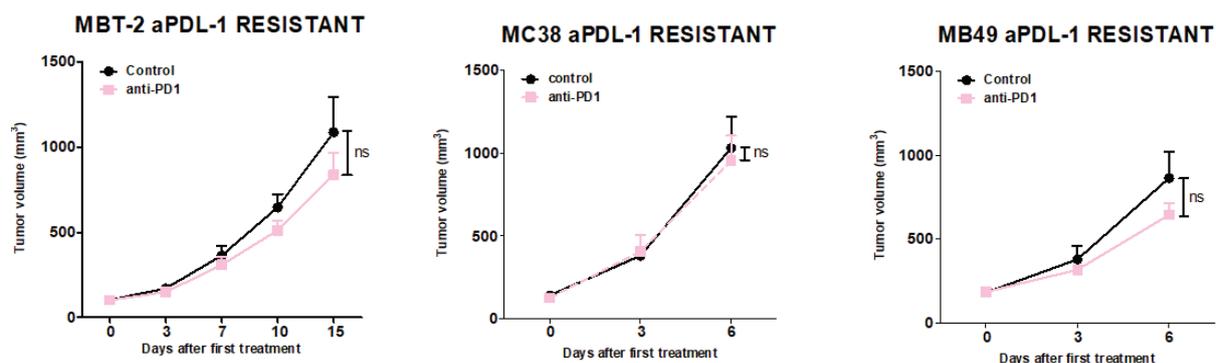
C



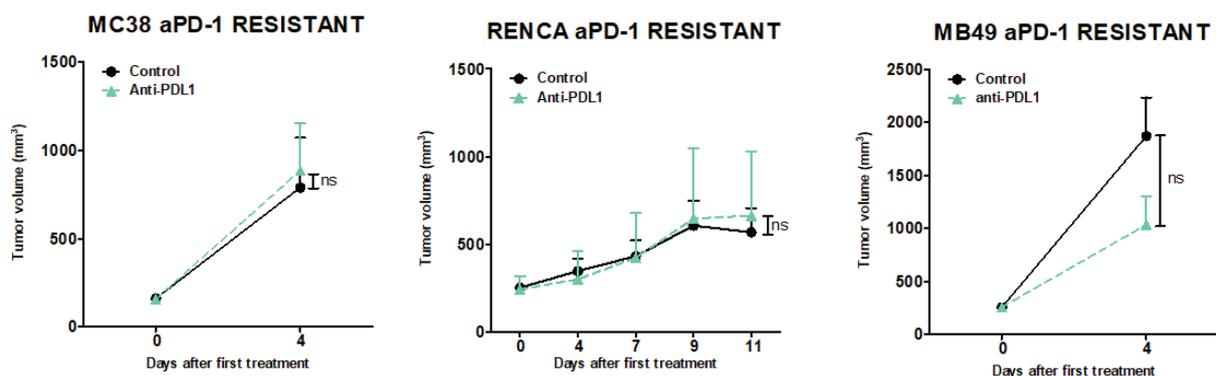
**Figure 4 - Heatmap of immune checkpoints expression in resistant tumors.** Non treated tumors resistant to anti-PD-1 (R aPD-1 NT) or to anti-PDL-1 (R aPDL-1 NT) were compared with wild-type non treated tumors. Resistant tumors treated with anti-PD-1 (R aPD-1 T) or anti-PDL-1 (R aPDL-1 T) were compared respectively with wild-type tumors treated with anti-PD-1 or anti-PDL-1. Flow cytometry analysis was performed at day 4 after the first treatment administration. Immune checkpoint

expression was observed on CD4 T cells (A), CD8 T cells (B) and tumor cells (C). The gating strategy is presented in Annex ???. Significant decreases and increases were assessed by Student t.test. n = 4 to 6 tumors per group. ICOS = Inducible T-cell COStimulator, LAG-3 = Lymphocyte-Activation gene-3, PD-1 = Programmed cell Death – 1, PDL-1 = Programmed cell Death Ligand – 1, TIM-3= T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3.

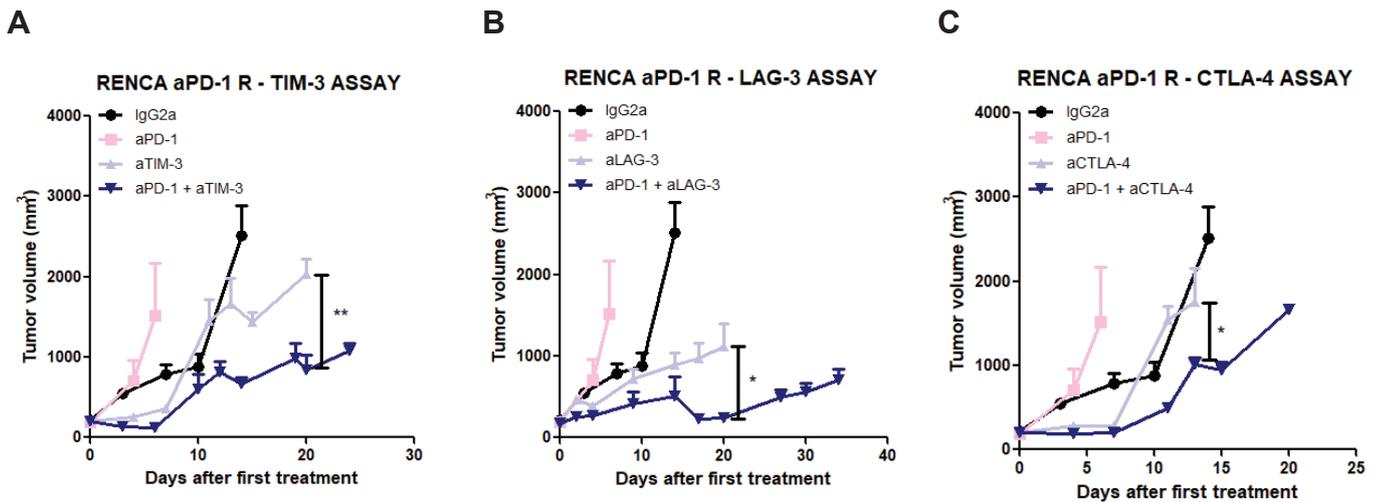
**A**



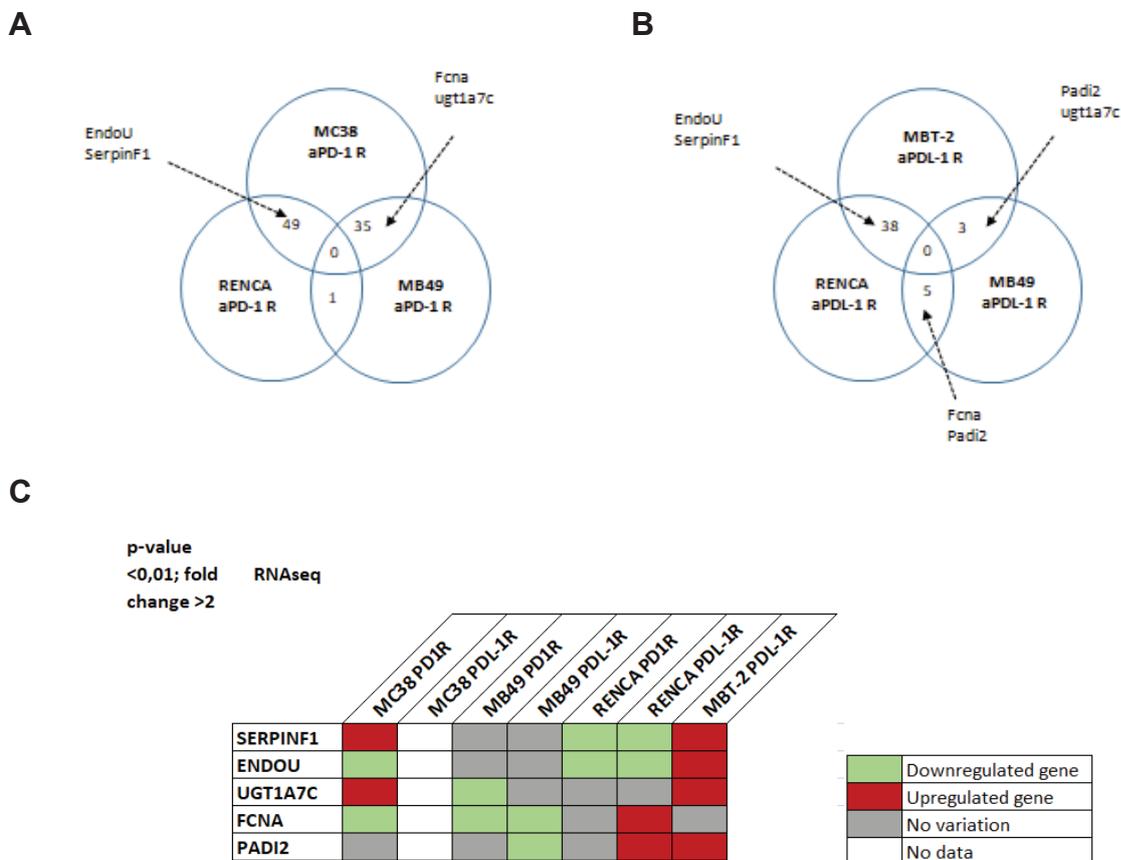
**B**



**Figure 5 - Cross-resistance in vivo assay with anti-PD-1 or anti-PDL-1 antibodies.** Anti-PDL-1 resistant tumors were implanted in naïve mice and treated with anti-PD-1 (RMP1-14, BioXCell, 250µg/mouse, IP) (A). Anti-PD-1 resistant tumors were implanted in naïve mice and treated with anti-PDL-1 (10F.9G2, BioXCell, 250µg/mouse, IP). Data shown are mean tumor volumes+ SEM. n=5 to 6 mice/group, ns: p>0.05, using Student t.test.

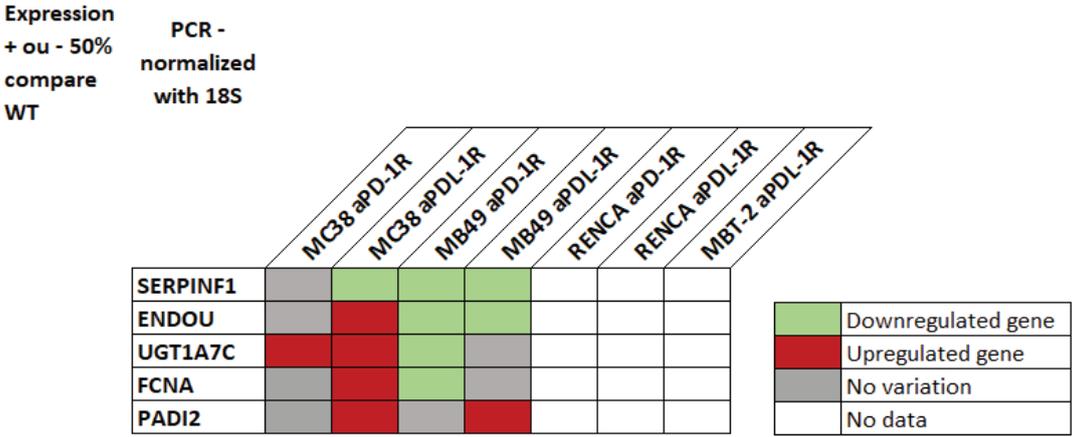


**Figure 6 - Alternative immune checkpoint in vivo efficacy in preclinical renal cell carcinoma anti-PD-1 resistant model.** Anti-PD-1 resistant RENCA tumor pieces were implanted in naïve BALB/c mice. When tumors reached 200mm<sup>3</sup>, mice were randomized and treated with an IgG2a control (BioXCell, 250 µg/ mouse Q1W), anti-PD-1 (BioXCell, 250 250 µg/ mouse Q1W), (A) Anti-TIM-3 (BioXCell, 250 µg/ mouse Q2W), anti-TIM-3 + anti-PD-1 (B) Anti-LAG-3 (BioXCell, 200 µg/ mouse Q2W), anti-LAG-3 + anti-PD-1 (C) Anti-CTLA-4 (BioXCell, 100 µg/ mouse Q2W), anti-CTLA-4 + anti-PD-1. Data shown are mean tumor volumes+ SEM. n=5 mice/group, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, using Student t.test.

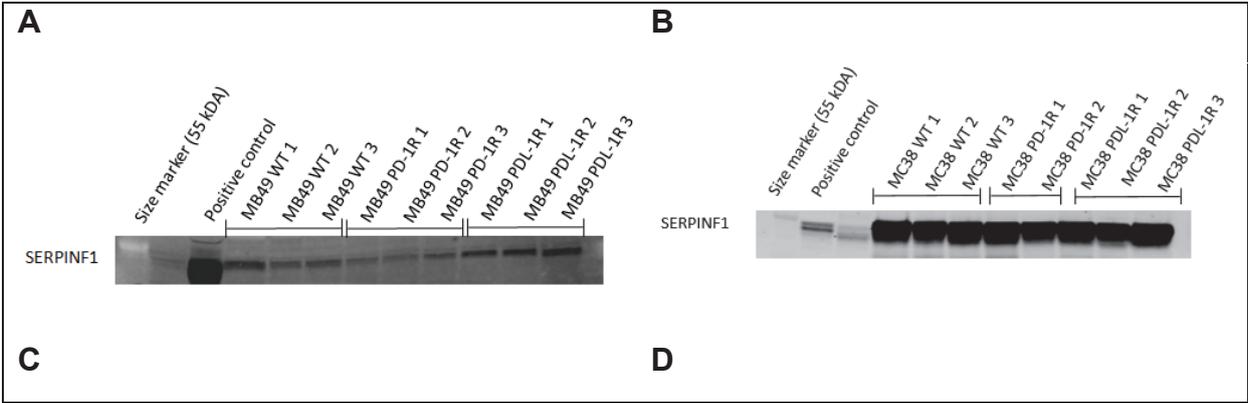


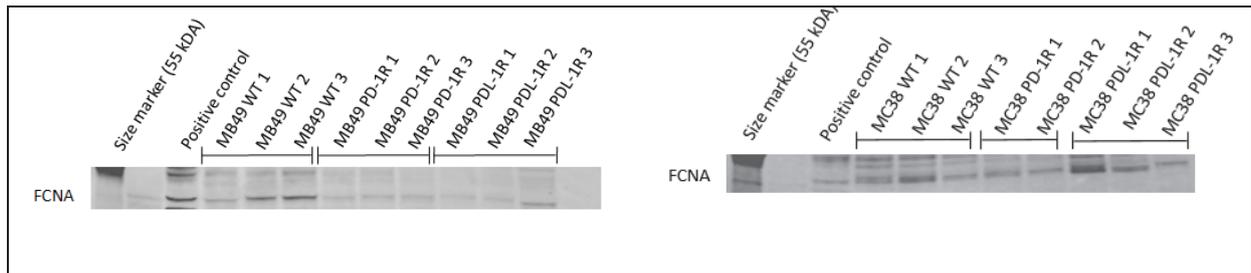
**Figure 7 - 5 genes were differently modulated between wild-type and resistant models.** Venn diagram representation of gene modulation shared with (A) anti-PD-1

resistant colorectal cancer (MC38), renal cell carcinoma (RENCA) and bladder cancer (MB49), and (B) anti-PDL-1 resistant bladder cancer (MBT-2), renal cell carcinoma (RENCA) and bladder cancer (MB49). ENDOU, SERPINF1, FCNA, UGT1A7C and PADI2 genes were identified as gene of interest. Their modulation compared with wild-type expression were shown on an heatmap (C), with a consideration of a Pvalue < 0.01 and a fold-change > 2.



**Figure 8 - SERPINF1, ENDOU, UGT1A7C, FCNA and PADI2 genes expression in resistant models.** In response to RNAseq analysis, a PCR analysis was performed to observe gene expression modulation in anti-PD-1 and anti-PDL-1 resistant colorectal cancer (respectively MC38 aPD-1R and MC38 aPDL-1R), and anti-PD-1 and anti-PDL-1 resistant bladder cancer (respectively MB49 aPD-1R and MB49 aPDL-1R). PCR results were normalized on 18S and downregulation or upregulation were considered when the change in expression was > 50% to the expression observed in wild-type tumors.





**Figure 9 - Protein expression level of SERPINF1 and FCNA in bladder and colorectal sensitive tumors and anti-PD-1 and anti-PDL-1 resistant tumors.** Western Blot was performed to observe SERPINF1 protein expression in bladder cancer MB49 (A) and colorectal cancer MC38 (B), in sensitive, anti-PD-1 and anti-PDL-1 resistant tumors. FCNA protein expression was also observed in MB49 (C) and MC38 (D) preclinical models.

Supplementary Files

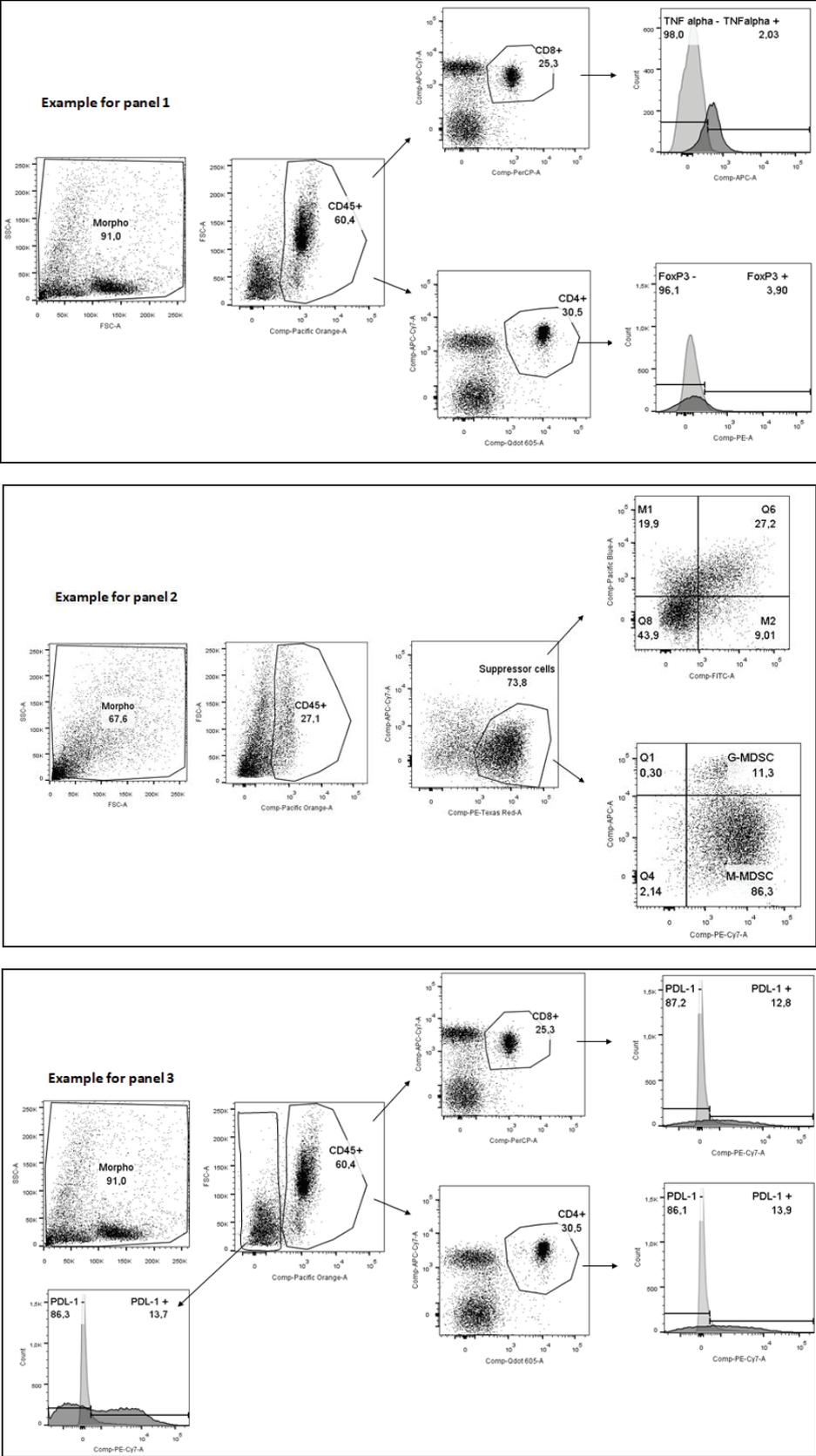
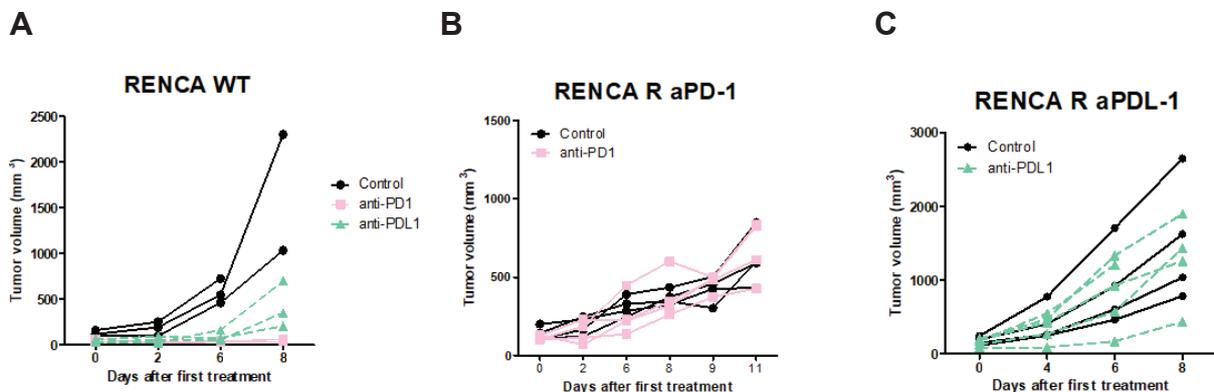


Figure S1. Gating strategy for panel 1, panel 2 and panel 3

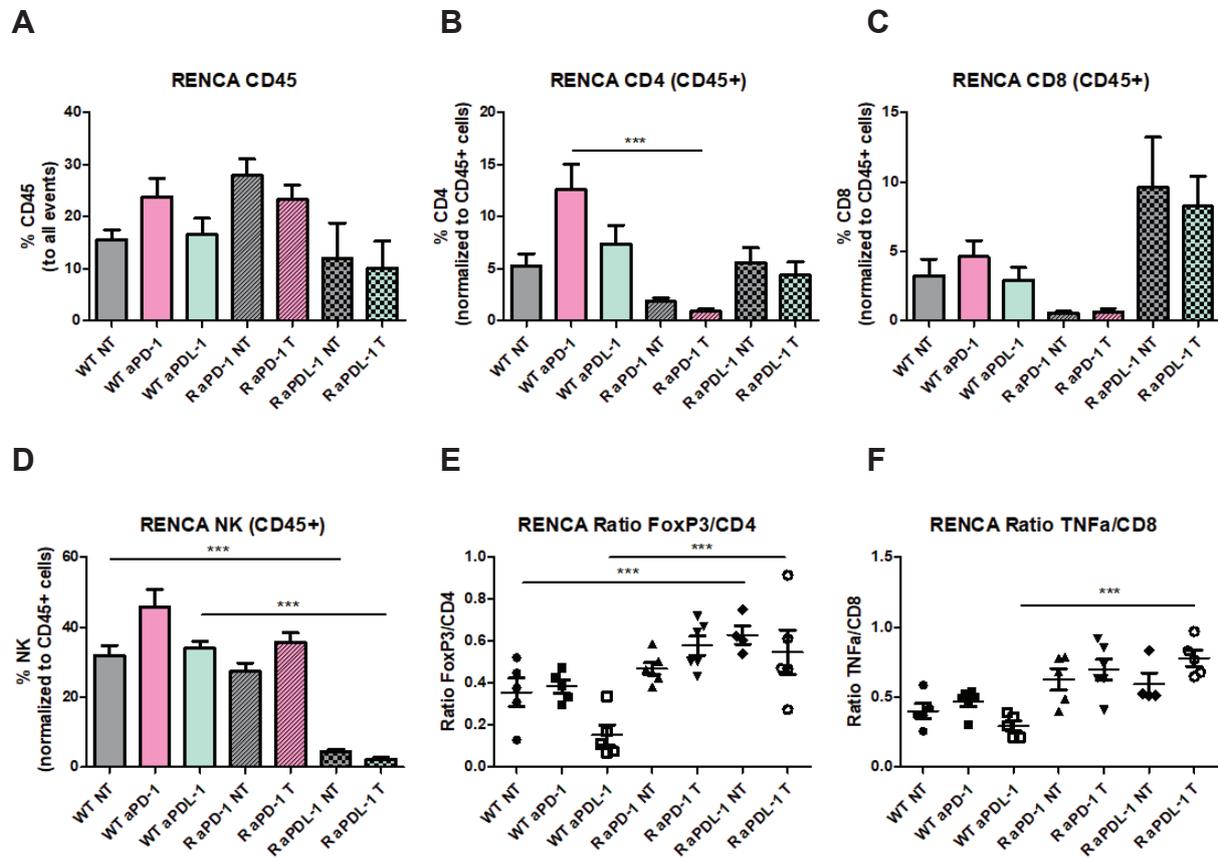
Tube 1	
Population	Label
Teff	CD45+ CD3+ CD4- CD8+ TN $\alpha$ +
Treg	CD45+ CD3+ CD4+ CD8- FoxP3+
Tube 2	
Population	Label
Total MDSC	CD45+ CD3- CD11b+
M-MDSC	CD45+ CD3- CD11b+ Ly6G- Ly6C+
G-MDSC	CD45+ CD3- CD11b+ Ly6G+ Ly6C-
Total TAM	CD45+ CD3- CD11b+
M1 TAM	CD45+ CD3- CD11b+ CD68+ CD206-
M2 TAM	CD45+ CD3- CD11b+ CD68- CD206+
Tube 3	
Population	Label
PD-1	CD45+ CD3+ CD4+/CD8+ CD279+ ; CD45- CD279+
LAG-3	CD45+ CD3+ CD4+/CD8+ CD223+ ; CD45- CD223+
TIM-3	CD45+ CD3+ CD4+/CD8+ TIM-3+ ; CD45- TIM-3+
ICOS	CD45+ CD3+ CD4+/CD8+ CD278+ ; CD45- CD278+
PDL-1	CD45+ CD3+ CD4+/CD8+ CD274+ ; CD45- CD274+
TIGIT	CD45+ CD3+ CD4+/CD8+ TIGIT+ ; CD45- TIGIT+

**Table S1. Flow cytometry assay design overview**

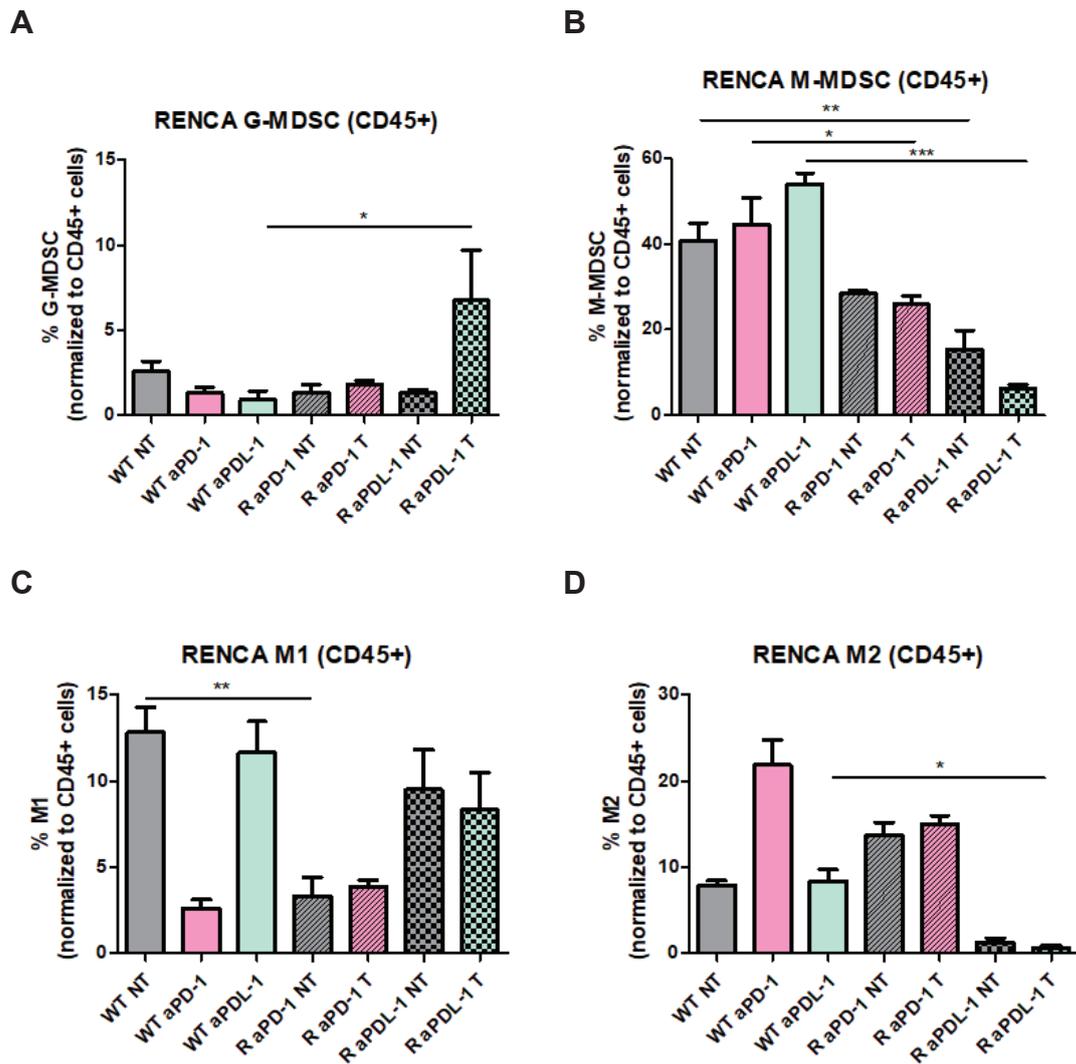


**Figure S2. RENCArenal cell carcinoma in vivo individual values.** In vivo tumor growth of RENCAWT tumors treated with anti-PD-1 (RMP1-14, BioXCell, 250  $\mu$ g/mouse) and anti-PDL-1 (10F9.G2, BioXCell, 250  $\mu$ g/mouse) (A), In vivo tumor

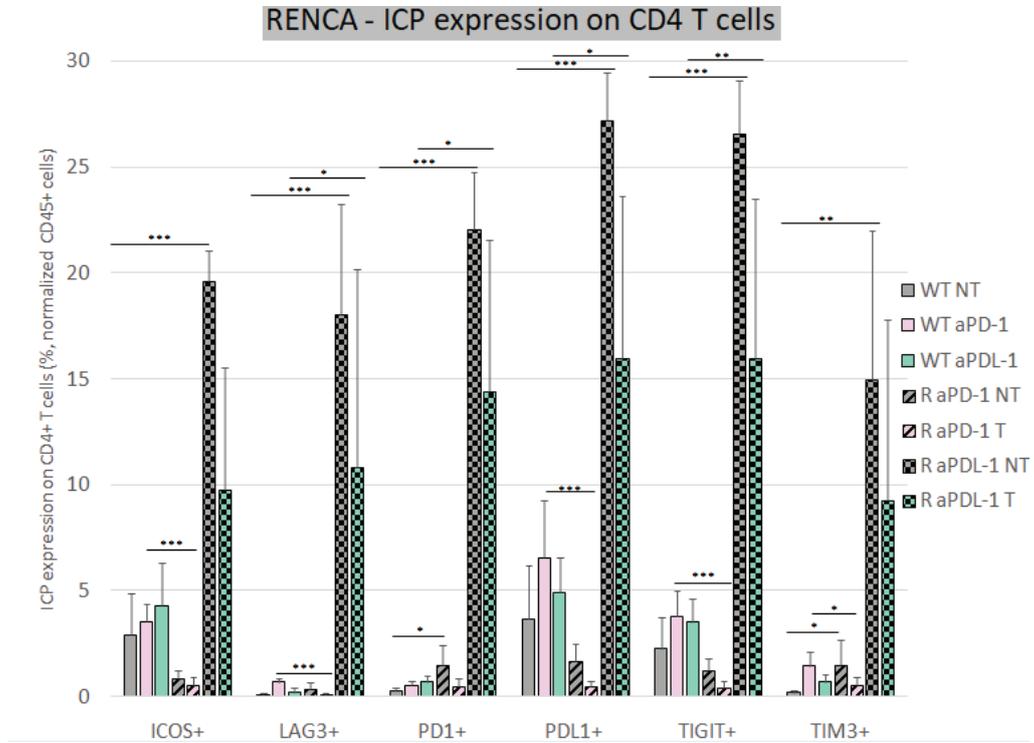
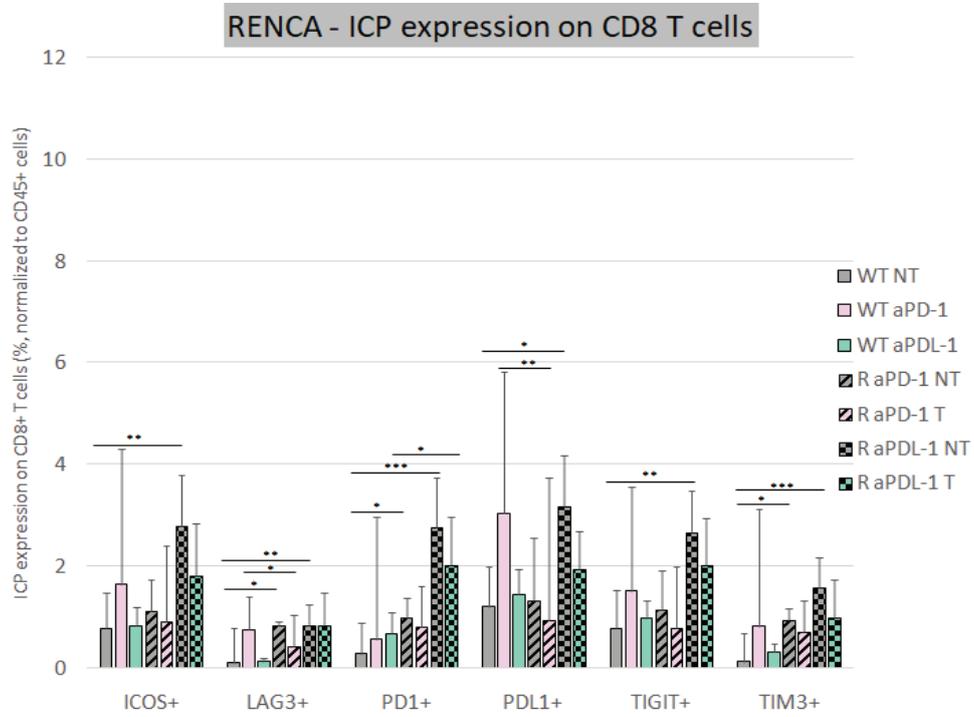
growth of RENCA tumors resistant to anti-PD-1 treated with anti-PD-1 (B), In vivo tumor growth of RENCA tumors resistant to anti-PDL-1 treated with anti-PDL-1 (C).

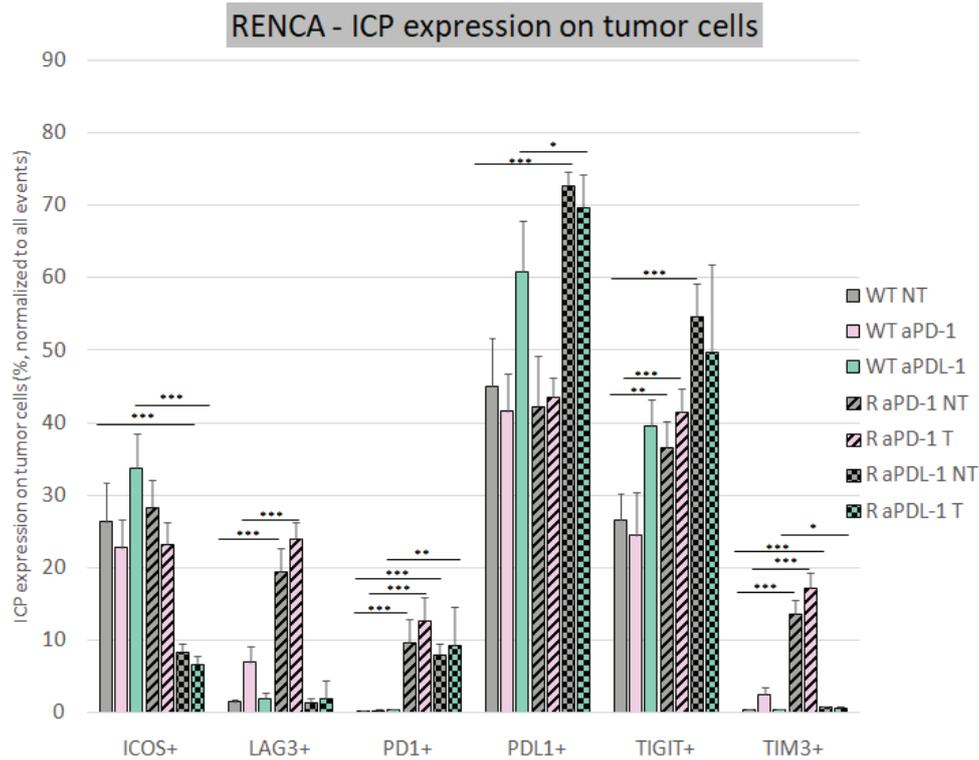


**Figure S3. RENCA panel 1 individual values.** CD45 + cells infiltrate (A), CD4 T cells infiltrate (B), CD8 T cells infiltrate (C), NK cells infiltrate (D), FoxP3/CD4 ratio (E), TNFa/CD8 ratio (F). Data are shown as Mean +SEM for A, B, C, D. n=5 to 6 mice/group, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*: p<0.001 using two-way ANOVA and Bonferroni post-test.

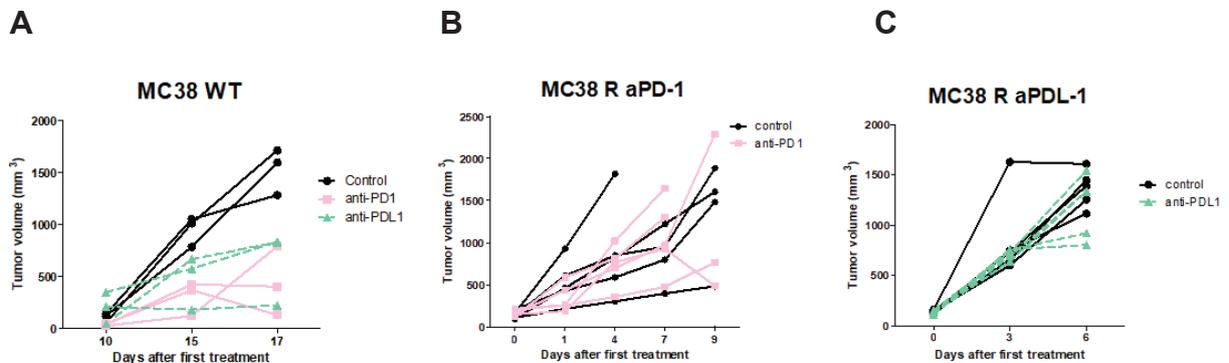


**Figure S4. RENCA panel 2 individual values.** G-MDSC infiltrate (A), M-MDSC infiltrate (B), M1 macrophages infiltrate (C), M2 macrophages infiltrate (D). Data are shown as Mean +SEM for A, B, C, D. n=5 to 6 mice/group, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*: p<0.001 using two-way ANOVA and Bonferroni post-test.

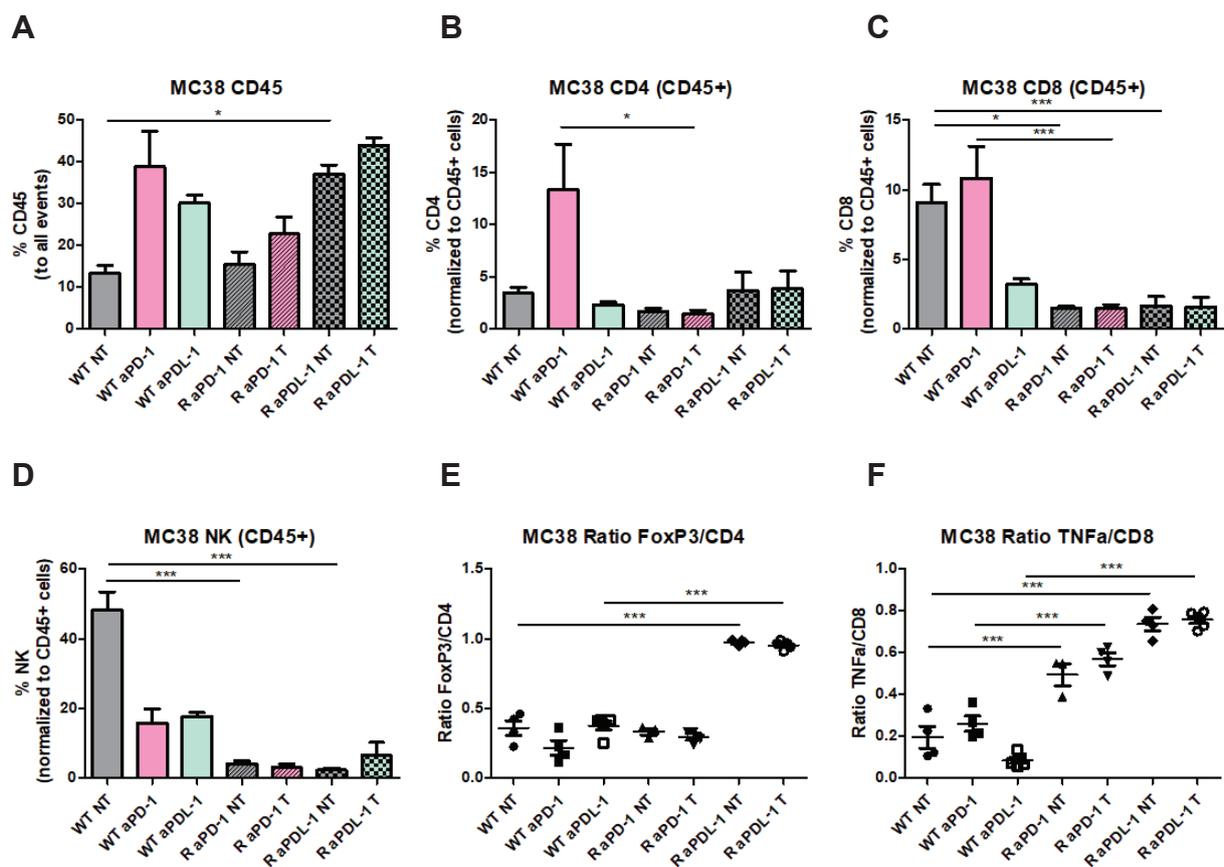
**A****B****C**



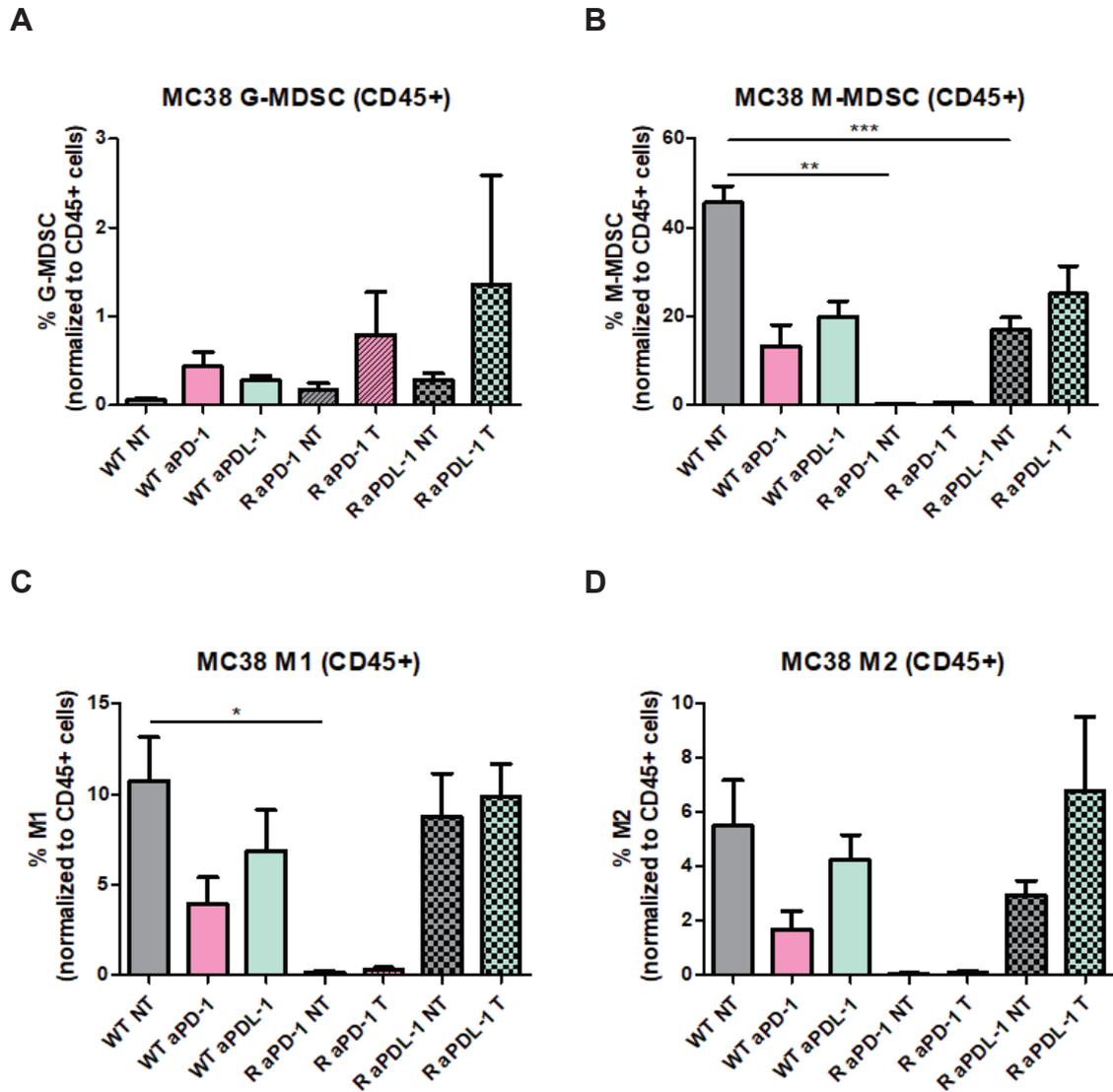
**Figure S5. RENCApanel 3 individual values.** Immune checkpoint ICOS, LAG-3, PD-1, PDL-1, TIGIT and TIM-3 expression on CD4 T cells (A), CD8 T cells (B) and tumor cells (C). Data are shown as Mean +SEM for A, B, C, D.n=5 to 6 mice/group, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*:p<0.001 using two-way ANOVA and Bonferroni post-test.



**Figure S6. MC38colorectal cancer in vivo individual values.** In vivo tumor growth of RENCAWT tumors treated with anti-PD-1 (RMP1-14, BioXCell, 250 µg/mouse) and anti-PDL-1 (10F9.G2, BioXCell, 250 µg/mouse) (A), In vivo tumor growth of RENCA tumors resistant to anti-PD-1 treated with anti-PD-1 (B), In vivo tumor growth of RENCA tumors resistant to anti-PDL-1 treated with anti-PDL-1 (C).

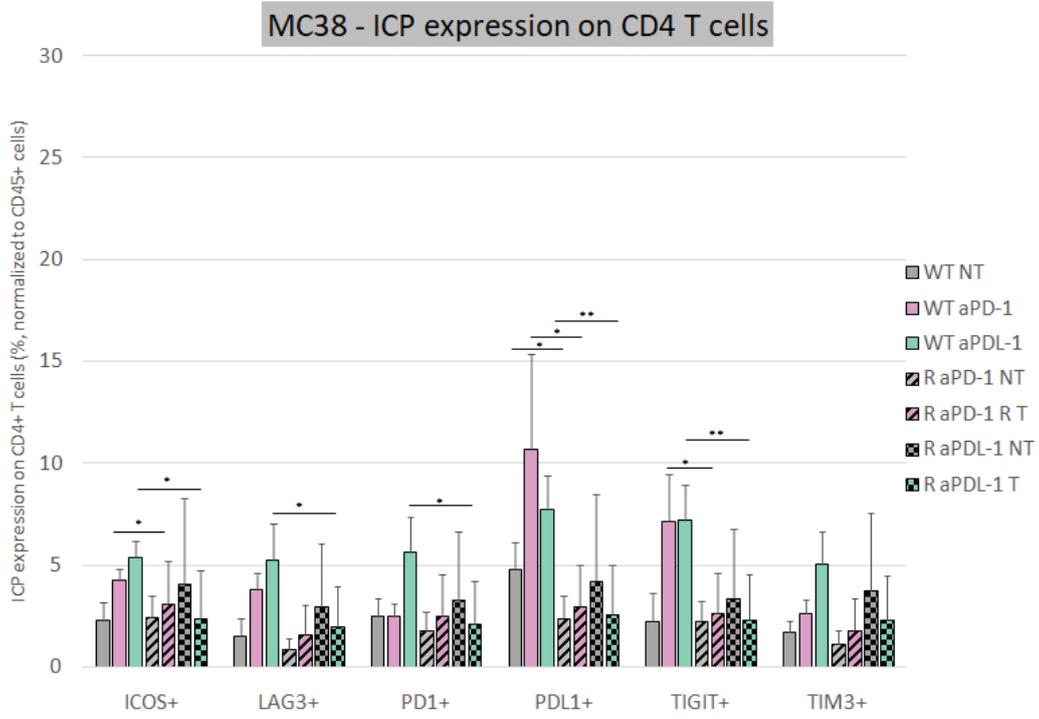


**Figure S7. MC38 panel 1 individual values.** CD45 + cells infiltrate (A), CD4 T cells infiltrate (B), CD8 T cells infiltrate (C), NK cells infiltrate (D), FoxP3/CD4 ratio (E), TNF $\alpha$ /CD8 ratio (F). Data are shown as Mean +SEM for A, B, C, D. n=5 to 6 mice/group, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*: p<0.001 using two-way ANOVA and Bonferroni post-test.

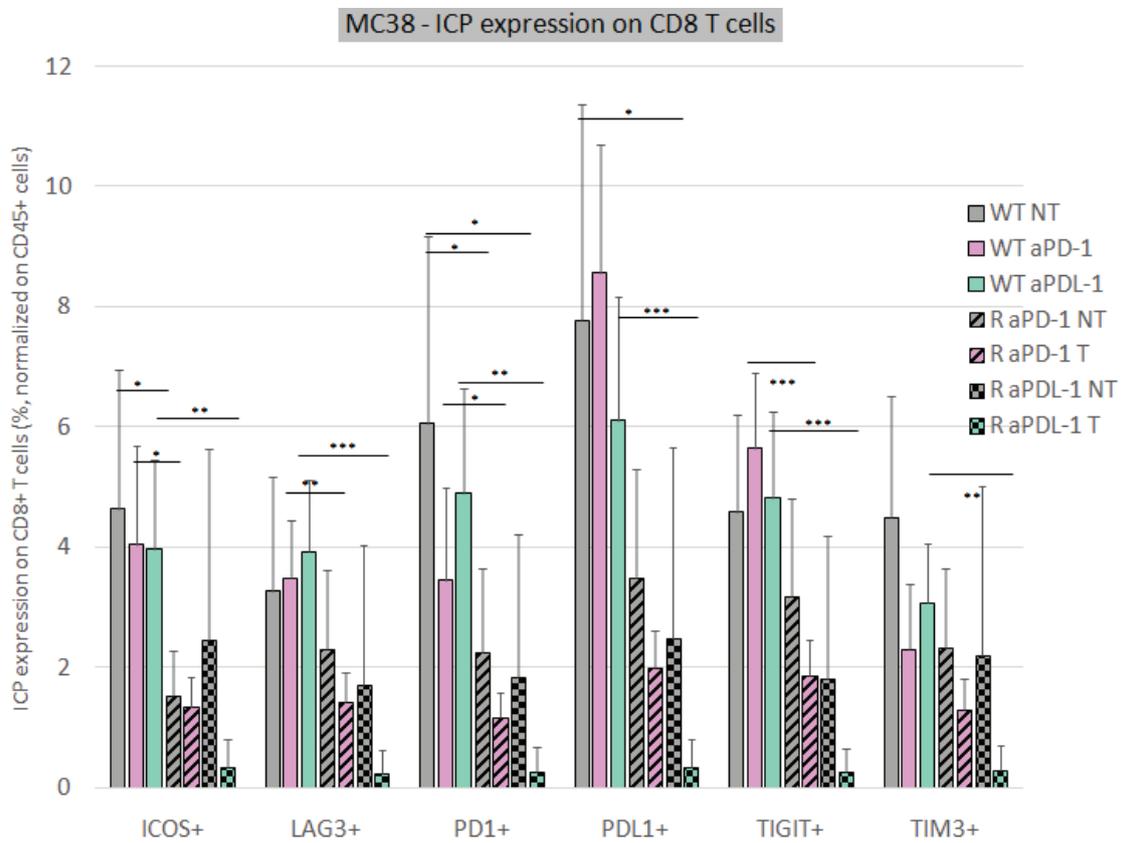


**Figure S8. MC38 panel 2 individual values.** G-MDSC infiltrate (A), M-MDSC infiltrate (B), M1 macrophages infiltrate (C), M2 macrophages infiltrate (D). Data are shown as Mean +SEM for A, B, C, D. n=5 to 6 mice/group, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*: p<0.001 using two-way ANOVA and Bonferroni post-test.

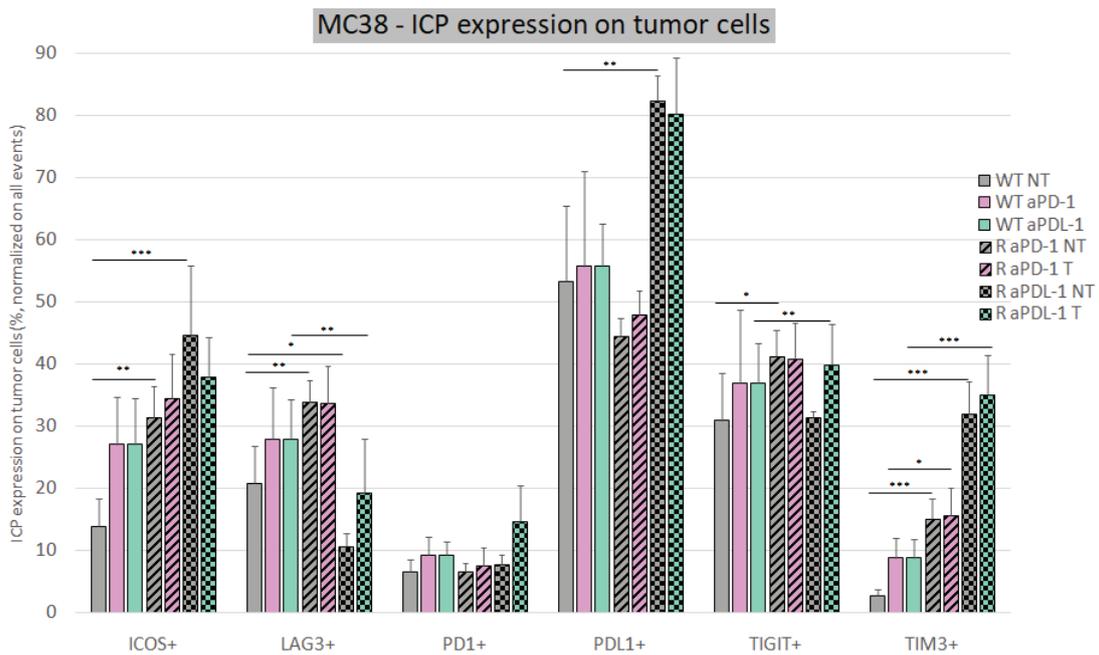
**A**



**B**

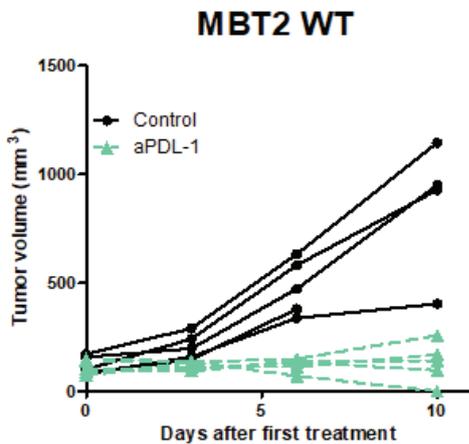


C

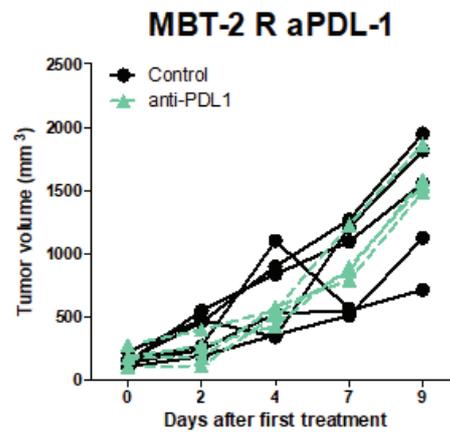


**Figure S9. MC38panel 3 individual values.** Immune checkpoint ICOS, LAG-3, PD-1, PDL-1, TIGIT and TIM-3 expression on CD4 T cells (A), CD8 T cells (B) and tumor cells (C). Data are shown as Mean +SEM for A, B, C, D.n=5 to 6 mice/group, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  and \*\*\*:  $p < 0.001$  using two-way ANOVA and Bonferroni post-test.

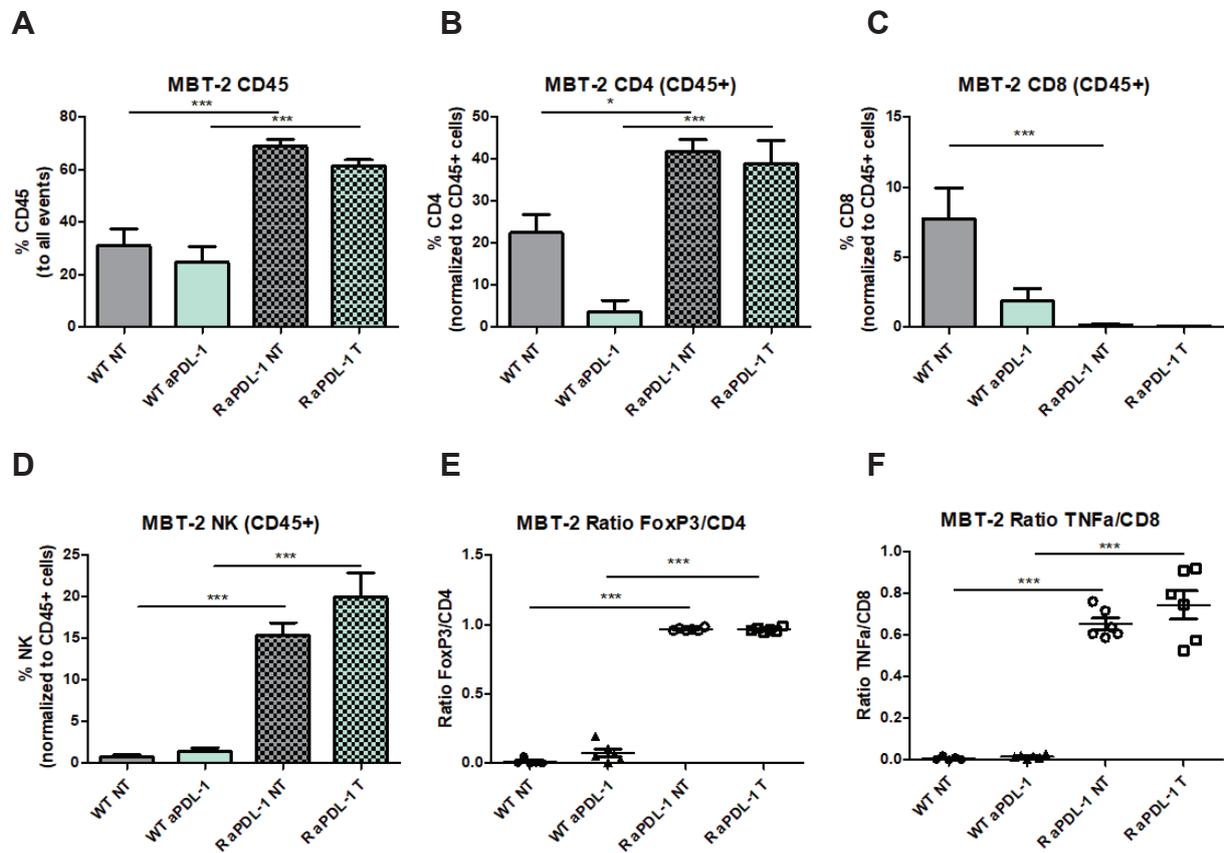
A



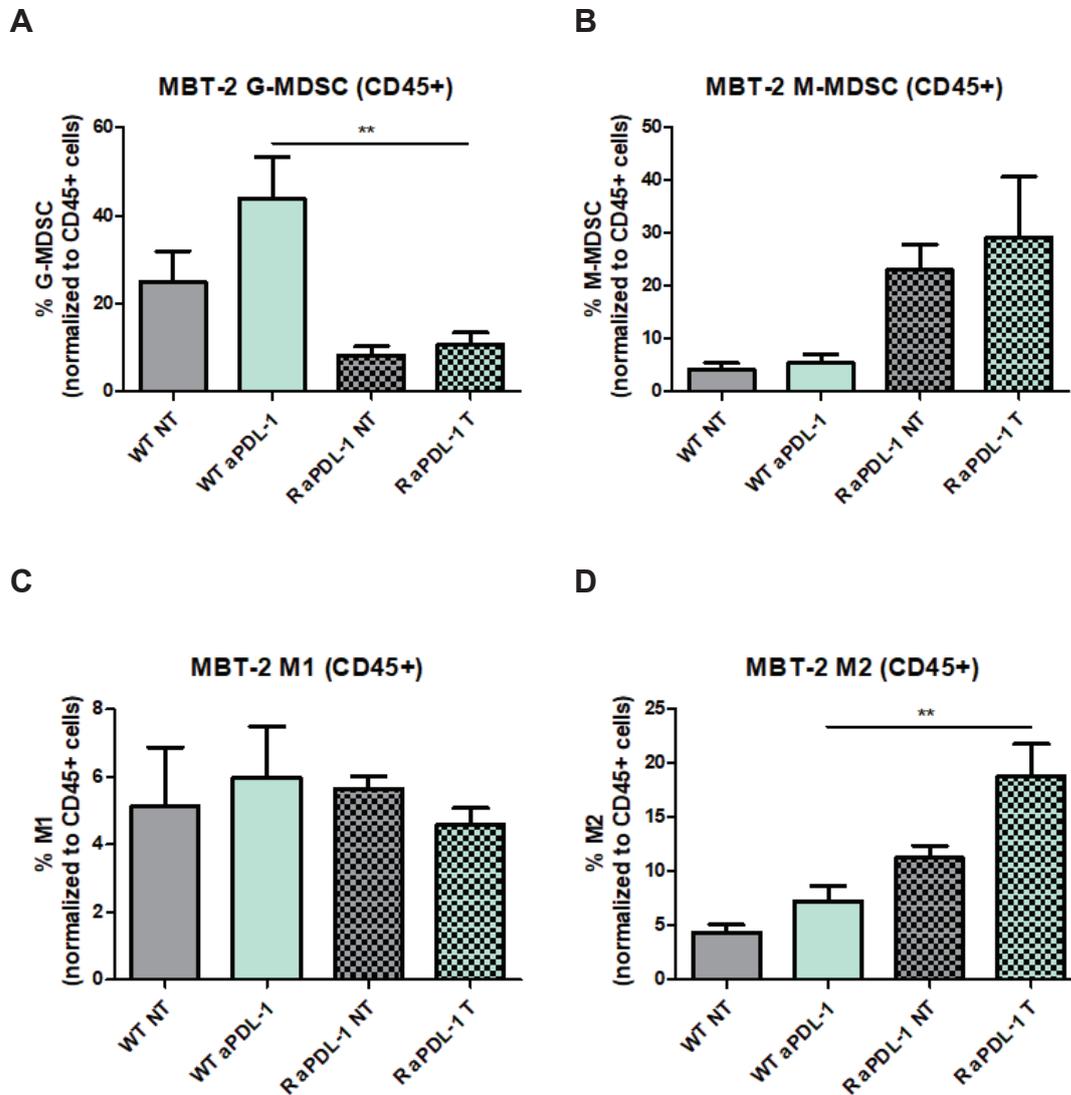
B



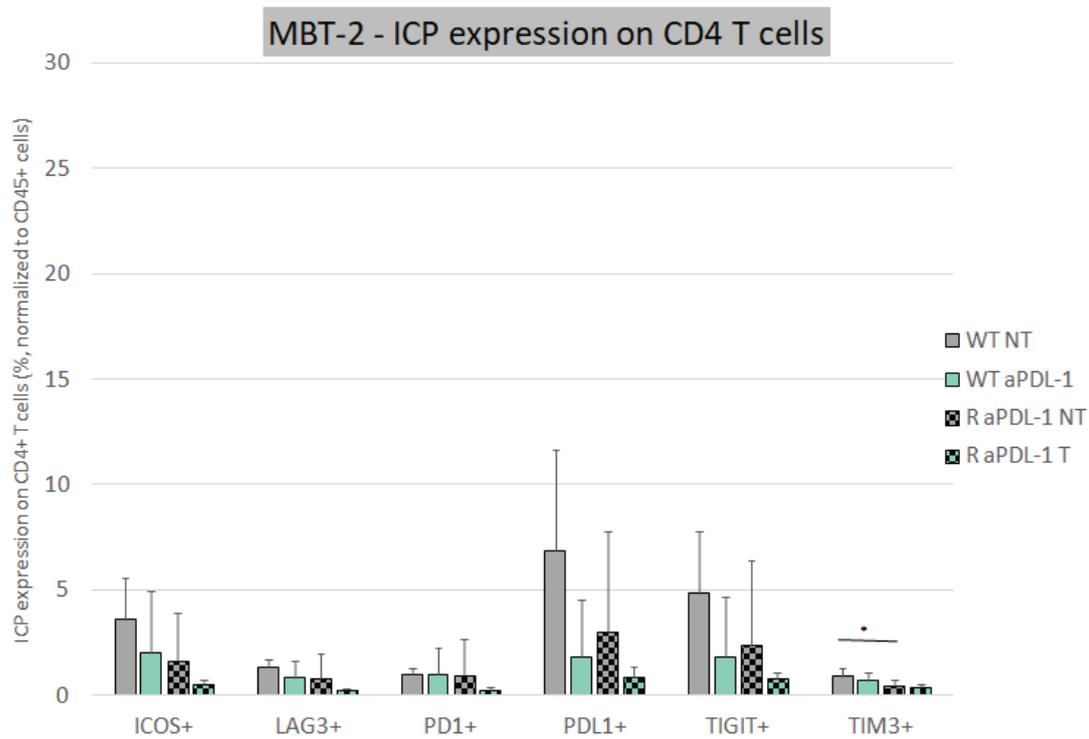
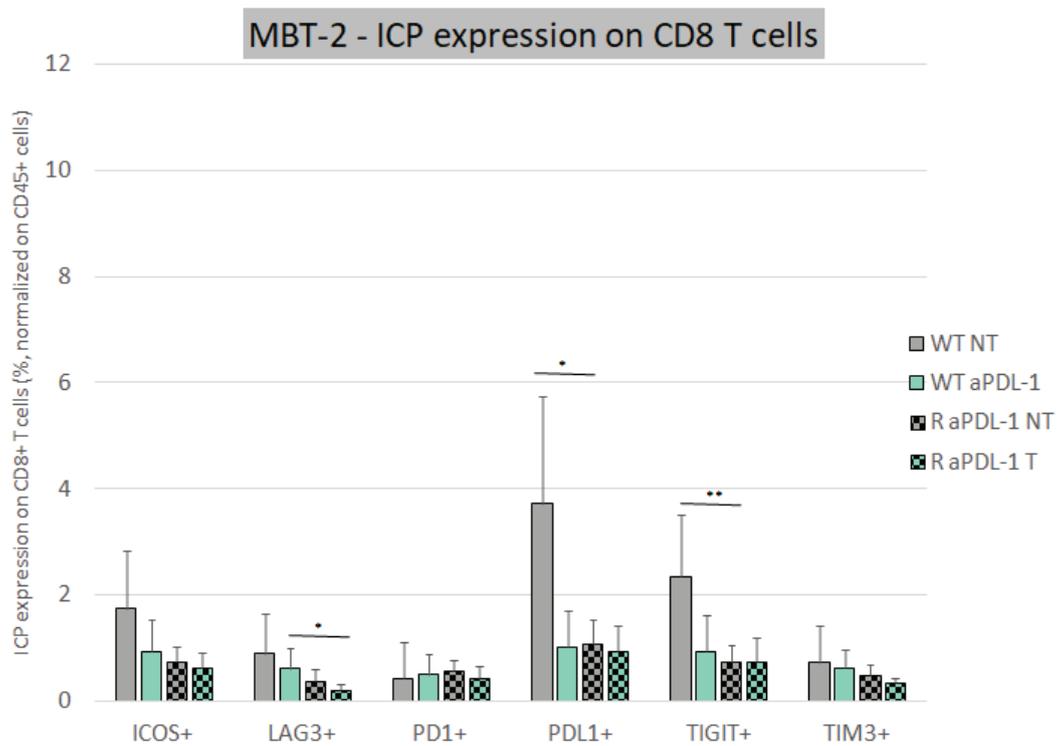
**Figure S10. MBT-2bladder cancer in vivo individual values.** In vivo tumor growth of MBT-2WT tumors treated with anti-PDL-1 (10F9.G2, BioXCell, 250  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) (A), In vivo tumor growth of MBT-2tumors resistant to anti-PDL-1 treated with anti-PDL-1 (B).

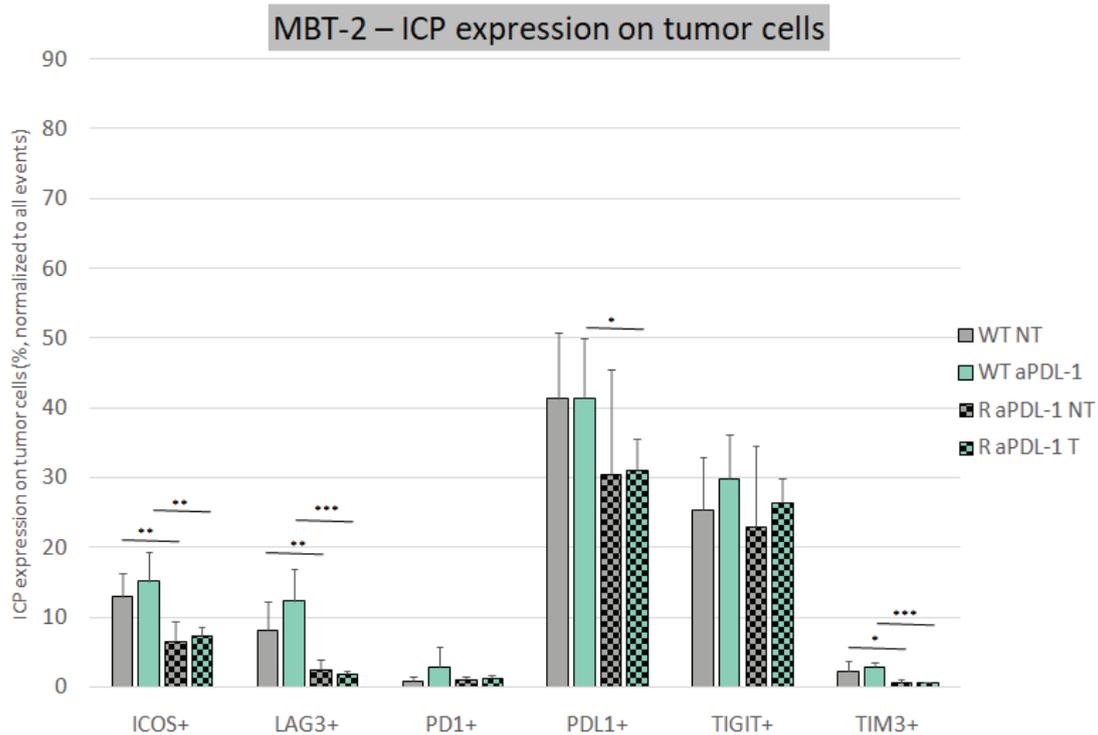


**Figure S11. MHT-2 panel 1 individual values.** CD45 + cells infiltrate (A), CD4 T cells infiltrate (B), CD8 T cells infiltrate (C), NK cells infiltrate (D), FoxP3/CD4 ratio (E), TNF $\alpha$ /CD8 ratio (F). Data are shown as Mean +SEM for A, B, C, D. n=5 to 6 mice/group, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*: p<0.001 using two-way ANOVA and Bonferroni post-test.

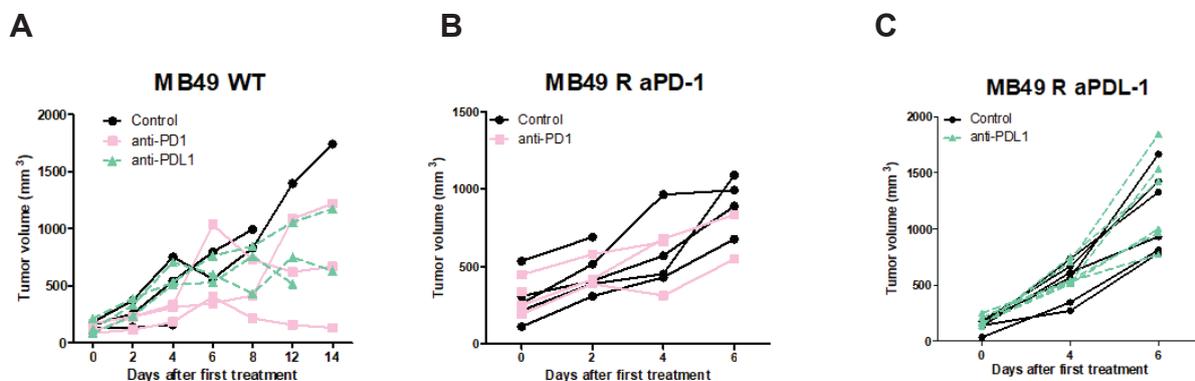


**Figure S12. MBT-2 panel 2 individual values.** G-MDSC infiltrate (A), M-MDSC infiltrate (B), M1 macrophages infiltrate (C), M2 macrophages infiltrate (D). Data are shown as Mean +SEM for A, B, C, D. n=5 to 6 mice/group, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  and \*\*\*:  $p < 0.001$  using two-way ANOVA and Bonferroni post-test.

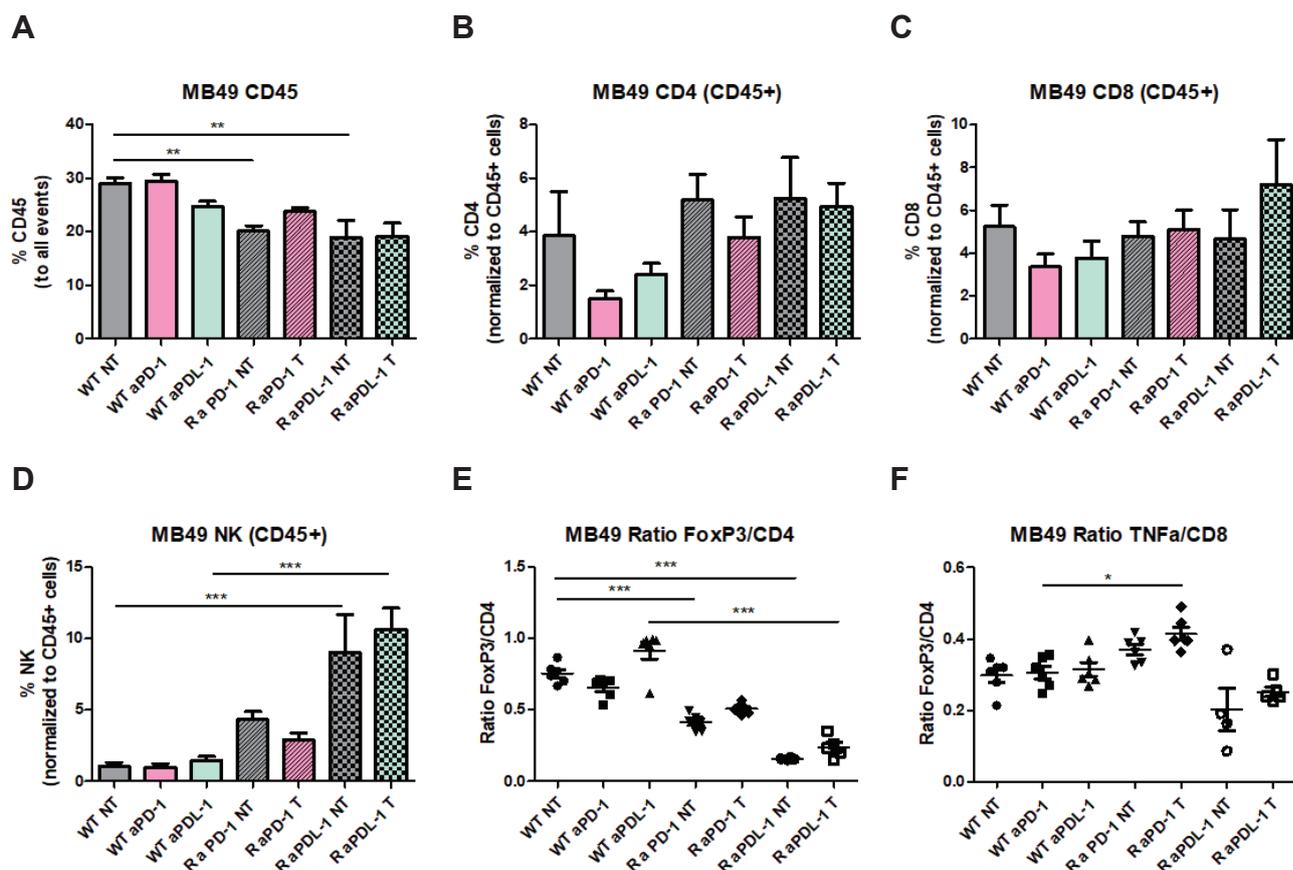
**A****B****C**



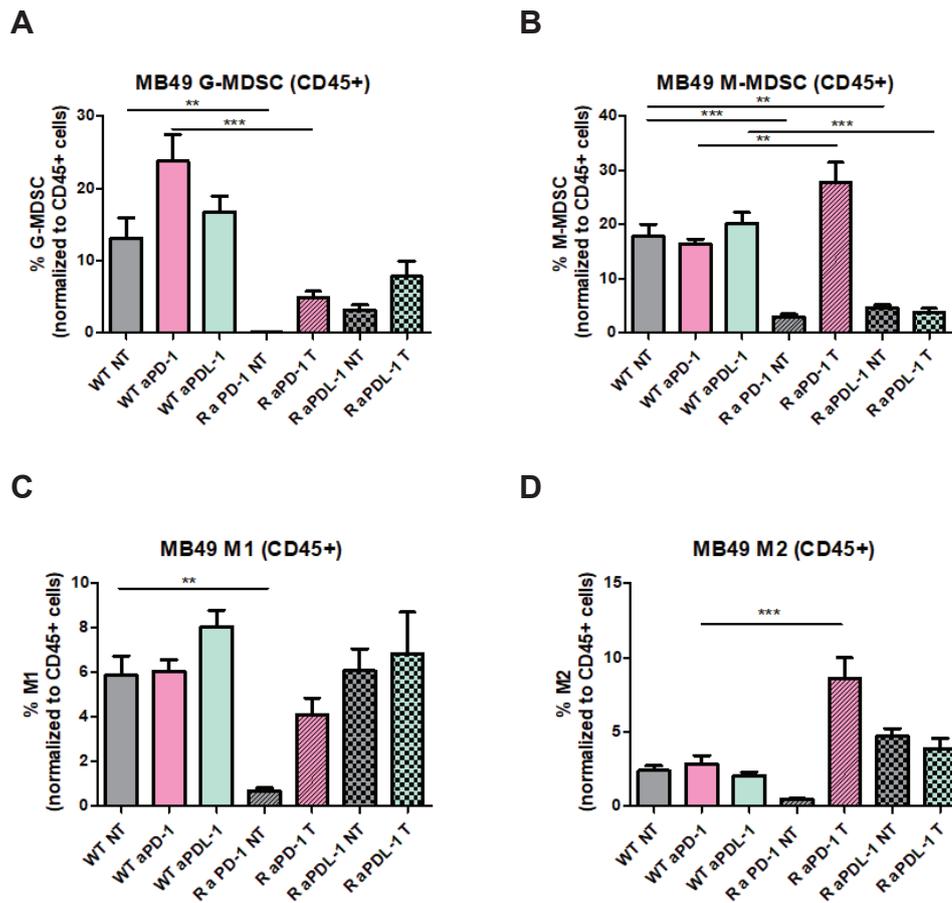
**Figure S13. MBT-2panel 3 individual values.** Immune checkpoint ICOS, LAG-3, PD-1, PDL-1, TIGIT and TIM-3 expression on CD4 T cells (A), CD8 T cells (B) and tumor cells (C). Data are shown as Mean +SEM for A, B, C, D. n=5 to 6 mice/group, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*: p<0.001 using two-way ANOVA and Bonferroni post-test.



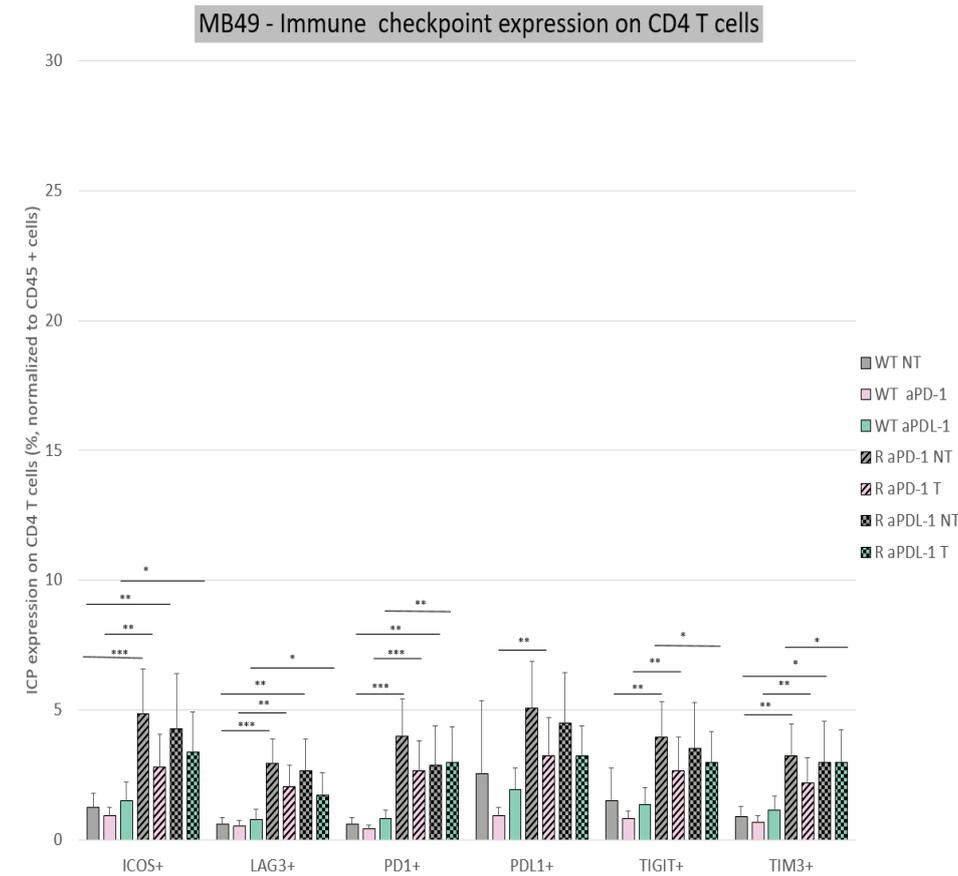
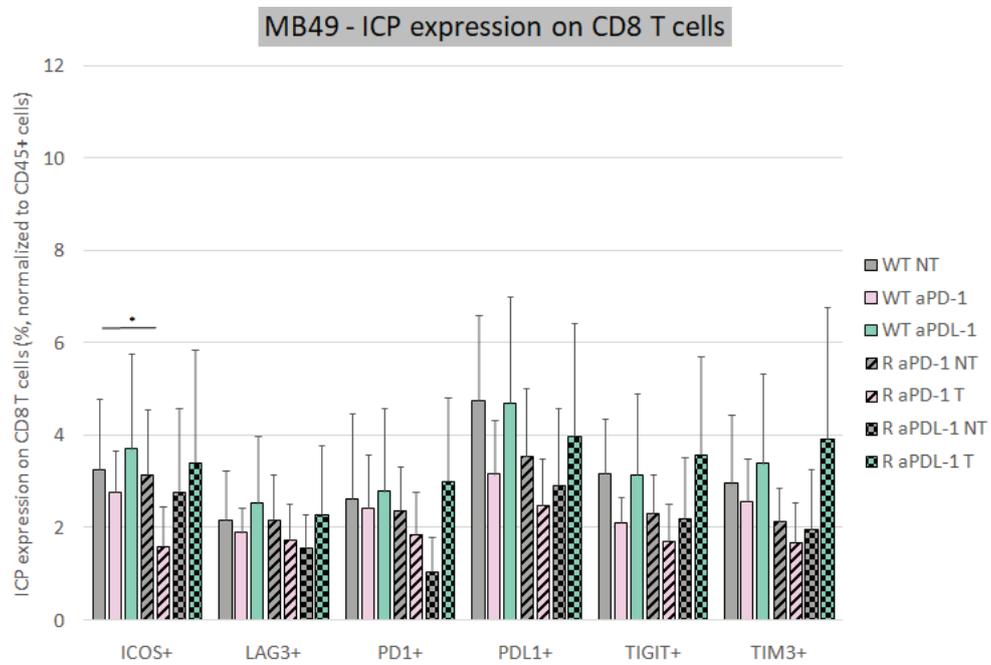
**Figure S14. MB49 bladder cancer in vivo individual values.** In vivo tumor growth of MB49WT tumors treated with anti-PD-1 (RMP1-14, BioXCell, 250 µg/mouse) and anti-PDL-1 (10F9.G2, BioXCell, 250 µg/mouse) (A), In vivo tumor growth of MB49tumors resistant to anti-PD-1 treated with anti-PD-1 (B), In vivo tumor growth of MB49tumors resistant to anti-PDL-1 treated with anti-PDL-1 (C).

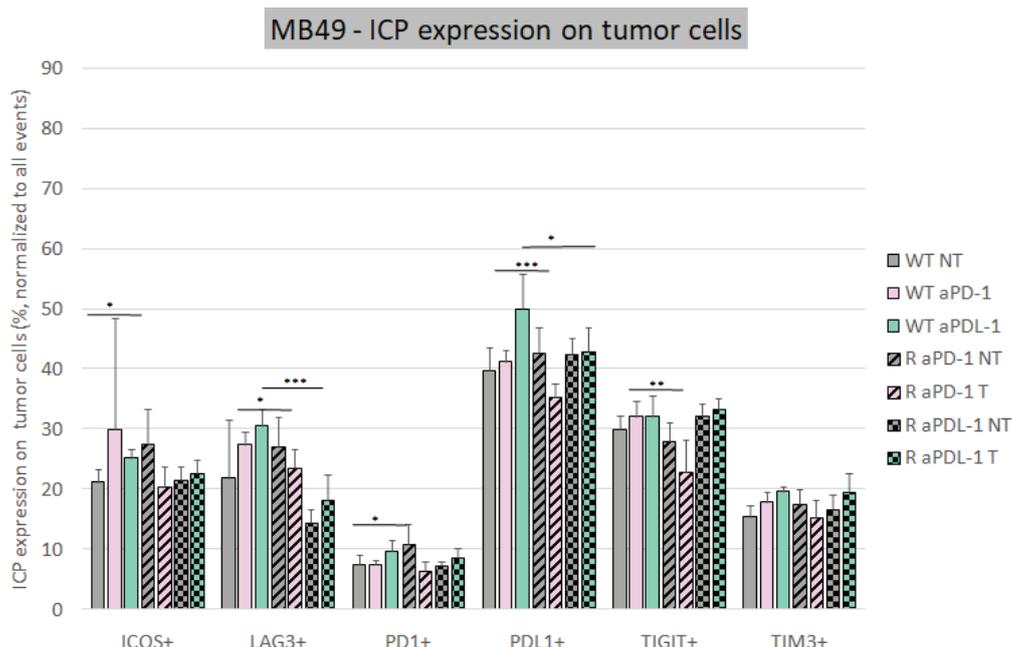


**Figure S15. MB49 panel 1 individual values.** CD45 + cells infiltrate (A), CD4 T cells infiltrate (B), CD8 T cells infiltrate (C), NK cells infiltrate (D), FoxP3/CD4 ratio (E), TNF $\alpha$ /CD8 ratio (F). Data are shown as Mean +SEM for A, B, C, D. n=5 to 6 mice/group, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*: p<0.001 using two-way ANOVA and Bonferroni post-test.



**Figure S16. MB49 panel 2 individual values.** G-MDSC infiltrate (A), M-MDSC infiltrate (B), M1 macrophages infiltrate (C), M2 macrophages infiltrate (D). Data are shown as Mean +SEM for A, B, C, D. n=5 to 6 mice/group, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  and \*\*\*:  $p < 0.001$  using two-way ANOVA and Bonferroni post-test.

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



**Figure S17. MB49 panel 3 individual values.** Immune checkpoint ICOS, LAG-3, PD-1, PDL-1, TIGIT and TIM-3 expression on CD4 T cells (A), CD8 T cells (B) and tumor cells (C). Data are shown as Mean +SEM for A, B, C, D.n=5 to 6 mice/group, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*:p<0.001 using two-way ANOVA and Bonferroni post-test.

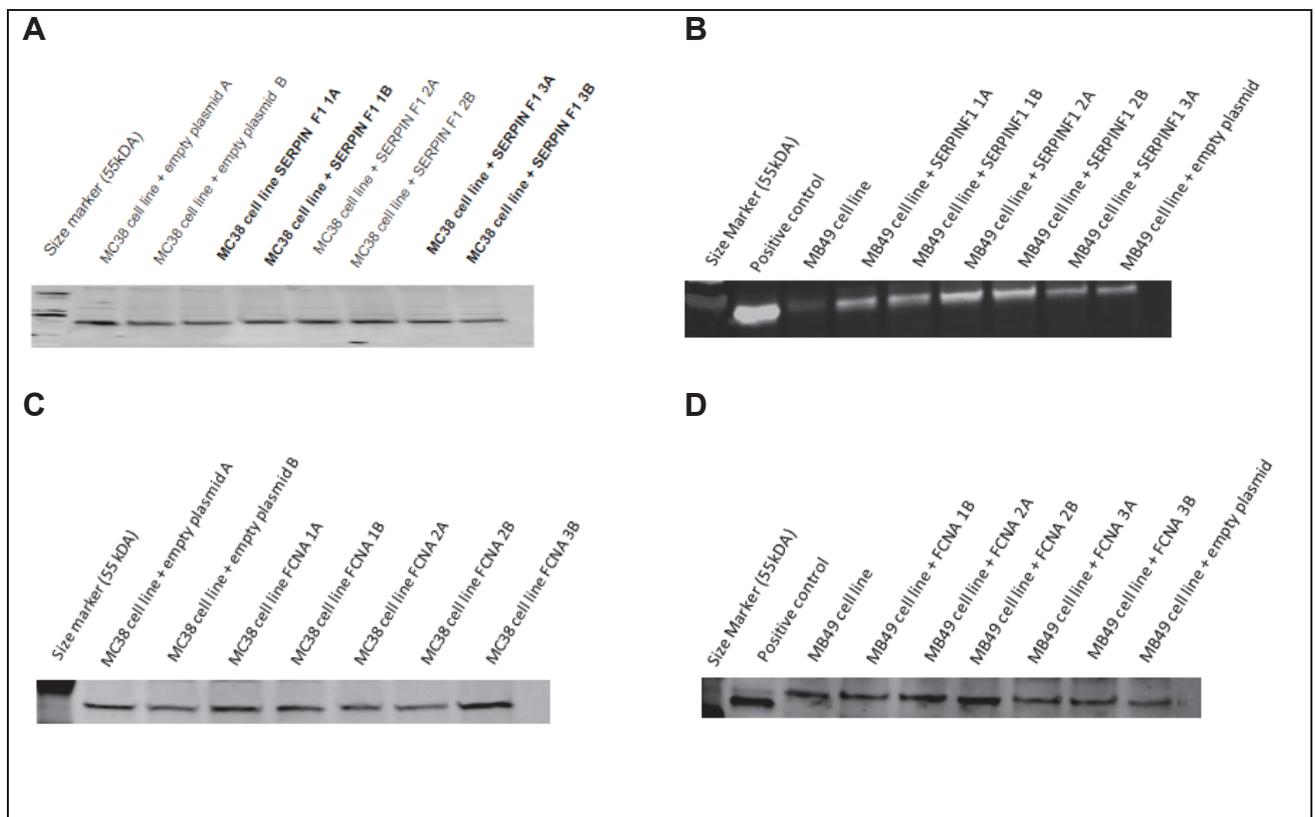
FCNA	For	GGGCTGGACCGTTTTTCAAC
	Rev	CGGAGCTCTTGGTTCCCATT
UGT1A7C	For	CAGACCTCTTCAGCCCAGTG
	Rev	TCCCTGGTGGCAGTTGATTC
PADI2	For	TGTTTCCCCGACGAGAGTTTC
	Rev	GATGGGGGTCAACGGGATG
ENDOU	For	ACGGCTGTCATGAAGGAACT
	Rev	TCGTCCACAACTCTTGTTCTG
SERPINF1	For	GGACTCTGATCTCAACTGCAAG
	Rev	AAGTTCTGGGTACGGTCAG

**Figure S18. Primer sequences of FCNA, UGT1A7C, PADI2, ENDOU and SERPINF1 genes, designed on Roche database**

Antibodies	Ref	Supplier	dilution	Incubation	Secondary antibody nature	Secondary antibody dilution	Secondary antibody incubation
SERPINF1	AF1149	R&D SYSTEMS	1/500e	Overnight, 4°C	Goat	1/5000e	1h, room temperature

PADI2	ab50257	ABCAM	1/500e	Overnight, 4°C	rabbit	1/5000e	1h, room temperature
FCN2	LS-C293939	LSBIO	1/500e	Overnight, 4°C	rabbit	1/5000e	1h, room temperature
UGT1A7	orb313418	BIORBYT	1/500e	Overnight, 4°C	rabbit	1/5000e	1h, room temperature
ENDOU	SAB106581	SIGMA ALDRICH	1/500e	Overnight, 4°C	rabbit	1/5000e	1h, room temperature

**Figure S19. Western blot recommendation for SERPINF1, PADI2, FCNA, UGT1A7 and ENDOU proteins**



**Figure S20 - CRISPR/Cas9 assay on SERPINF1 and FCNA genes in MC38 and MB49 cell lines.** FCNA and/or SERPINF1 knockout MB49 and MC38 cells were generated using CRISPR/Cas9 technology. Oligonucleotides were inserted into pLentiCRISPRv2-blast or pLentiCRISPRv2-puro plasmids (Addgene, Cambridge, MA, USA) using BsmBI (ThermoFisher-Fermentas). Virus were produced using HEK 293T cells and a 24-hours incubation and used for the infection of cells, and stable models were selected with puromycin and/or blasticidine. Three guides were designed for each gene (1,2,3) and experiment was realized in duplicate (A, B). After puromycine selection, cells were harvested and a western blot was performed for SERPINF1 KO in colorectal syngeneic cell line MC38 (A) and MBB49 (B), and for FCNA KO in MC38 (C) and MB49 (D).

Dans ce chapitre III, nous avons établi des modèles précliniques de résistance acquise à l'anti-PD-1 et à l'anti-PDL-1 pour le cancer du colôn MC38, du rein RENCA, et de la vessie MB49, et un modèle de résistance acquise à l'anti-PDL-1 uniquement pour le cancer de la vessie MBT-2. Ces modèles de résistance acquise ont été obtenus à partir de tumeurs ayant une réponse primaire partielle aux anticorps, puis réimplantées et traitées de façon sériée dans des souris naïves jusqu'à l'obtention d'un phénotype résistant (équivalent à n'avoir plus aucune réponse anti-tumorale in vivo des anticorps).

L'observation des cellules immunitaires infiltrant la tumeur nous a permis de décrire deux mécanismes importants qui semblent impliqués dans la résistance. D'une part, nous avons observé une diminution significative de l'infiltration des macrophages de type 1, à la fonction anti-tumorale dans les modèles de résistance acquise à l'anti-PD1. Par la suite, il serait particulièrement intéressant de pouvoir tester un agoniste des M1 dans ce type de modèle, pour observer une possible potentialisation de l'anti-PD1, même si les agents de polarisation des macrophages vers un profil M1 restent à l'heure actuelle au stade de recherche<sup>257</sup>. De la même façon, nous avons observé une augmentation des cellules T régulatrices entre tous les modèles de résistance acquise à l'anti-PDL-1. Dans une future expérimentation, il serait primordial de tenter une déplétion de ces Treg, à l'aide par exemple d'un anti-CD25, pour espérer retrouver une sensibilité à l'anti-PDL-1.

Au vu des résultats de surexpression de certains points de contrôles inhibiteurs des T, observée par cytométrie en flux, notamment dans le modèle de cancer du rein RENCA résistant à l'anti-PD1, nous avons réalisé un essai de combinaison de l'anti-PD1 avec l'anti-LAG3 et l'anti-TIM3. De nombreux essais cliniques se sont basés sur des combinaisons de l'anti-PD1 avec l'anti-CTLA4, alors nous avons également testé la potentielle synergie in vivo de ces deux anticorps. L'ensemble de ces anticorps monoclonaux combinés à l'anti-PD1 ont montré un fort effet in vivo. Curieusement, l'anti-LAG3 utilisé en monothérapie a également démontré un effet anti-tumoral important. Ces données préliminaires devraient être utiles dans la mise en place des décisions thérapeutiques dans la pratique clinique, dans les cas de résistances acquises à l'anti-PD1. Etant donné la sur-expression de nombreux points de contrôles immunitaires inhibiteurs sur les cellules T CD4 dans le cas du modèle de cancer de la vessie MB49, et sur les cellules tumorales dans le cas du modèle de

cancer de côlon MC38, il serait intéressant de réaliser de futurs essais de combinaisons dans ces modèles, et d'établir un comparatif avec les données obtenues pour le modèle de cancer du rein. Cela pourrait par la suite aider à déterminer si la résistance aux inhibiteurs de l'axe PD1/PDL-1 peut être contournée à l'aide de combinaisons de différents inhibiteurs d'autres points de contrôles immunitaires alternatifs, ou si la résistance observée est propre à chaque type tumoral et ne peut être empêchée de cette façon. Il serait important d'observer également les points de contrôles immunitaires activateurs des cellules T dans un prochain panel, tels que OX-40, CD137, VISTA, etc., et en fonction des résultats obtenus, observer les effets des agonistes in vivo. En effet, l'agoniste CD137 a déjà démontré son efficacité en combinaison au cetuximab dans des échantillons cliniques de tumeurs de la tête et du cou<sup>258,259</sup>.

Comme nous l'avons évoquée en discussion du chapitre II, l'évaluation du microenvironnement tumoral par cytométrie en flux a été réalisée à un temps donné précis de J4 après l'initiation des traitements. Il est probable que l'observation des mêmes populations, à différents temps, ait évolué considérablement. Nous pensons également qu'il serait intéressant, dans une future étude, d'observer davantage de marqueurs d'activation des lymphocytes T effecteurs, ou encore de réaliser une étude immunohistochimique pour observer la répartition de l'infiltrat immunitaire au sein de la tumeur. En effet, la cytométrie en flux nous a permis de quantifier l'infiltrat, mais on ne connaît pas la position des T effecteurs (à savoir, si ceux-ci se trouvent en périphérie de la tumeur ou à l'intérieur). Une élimination efficace de la tumeur passant par une indispensable infiltration en profondeur<sup>260</sup>, une étude immunohistochimique nous permettrait d'apporter de nouveaux éléments à analyser, et ait actuellement en cours en étude externalisée.

L'analyse du profil moléculaire des tumeurs résistantes en comparaison aux tumeurs sauvages nous a permis d'identifier 5 gènes liés à la résistance. Parmi ces 5 gènes peu étudiés, notre intérêt s'est porté sur 3 gènes en particulier, SERPINF1, FCNA et UGT1A7C. Premièrement, le gène SERPINF1 code pour la protéine PEDF, qui aurait des fonctions anti-angiogénique, anti-tumorale et anti-métastatique. Nous avons trouvé une sous-régulation de ce gène par PCR dans le modèle MC38 résistant à l'anti-PDL-1 et dans les modèles MB49 résistants à l'anti-PD1 et à l'anti-PDL-1. Similairement, le gène FCNA a été retrouvé sous-exprimé dans l'étude RNAseq dans

le modèle MC38 résistant à l'anti-PD1 et dans les modèles MB49 résistants à l'anti-PD1 et à l'anti-PDL-1. Or, ce gène serait un activateur des lymphocytes T CD8, et aurait des propriétés anti-tumorales. Nous avons donc pensé qu'il serait judicieux de réaliser un KO de ces gènes « protecteurs », aux fonctions antitumorales, dans des lignées cellulaires sauvages MC38 et MB49. Nous avons alors émis l'hypothèse que si la sous-régulation de ces gènes étaient responsable de la résistance, une fois le KO de ces gènes réalisés sur les lignées sauvages ; l'injection de ces cellules in vivo reproduirait un phénotype de résistance aux anti-PD1 / PDL-1. Nous avons pour cela désigné 3 différents oligonucléotides pour réaliser une CRISPR/Cas9 sur les lignées sauvages MC38 et MB49. Néanmoins, notre étude de CRISPR /Cas9 ne nous a pas permis à l'heure actuelle d'éliminer les gènes ciblés, et donc d'affirmer que les gènes SERPINF1 ou FCNA soient responsables de la résistance.

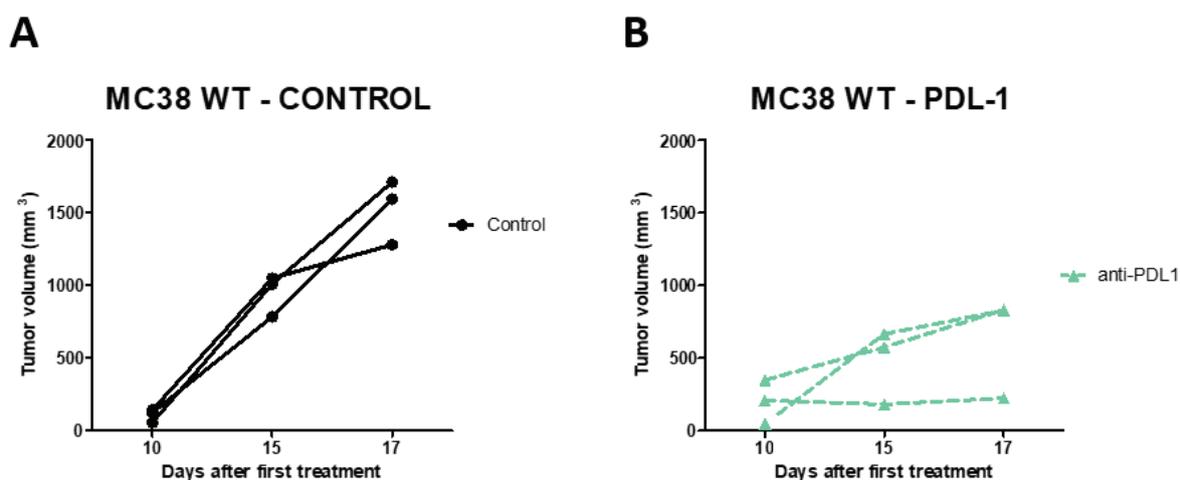
Enfin, l'un des gènes identifiés, UGT1A7C, semblait également prometteur. En effet, bien que très peu décrit dans la littérature, ce gène a été associé au cancer du pancréas, et au risque de carcinome gastro-intestinal. Or, notre étude RNAseq a permis d'identifier une sur-expression de ce gène dans le modèle MC38 résistant à l'anti-PD1, et cette sur-expression s'est vue confirmée par PCR, et également dans le modèle MC38 résistant à l'anti-PDL-1. Un essai de sur-expression de UGT1A7C dans la lignée MC38 sauvage est actuellement en cours, par pcDNA3. L'injection de cette lignée in vivo, pourrait affirmer la responsabilité de ce gène dans la résistance si un phénotype de résistance est observé.

A l'heure actuelle, il reste difficile de savoir si les phénomènes observés, tant au niveau des cellules immunitaires que du profil moléculaire, sont responsables ou sont une cause de la résistance acquise à l'anti-PD1 et/ou l'anti-PDL-1. Des études permettant d'analyser plus en profondeur l'aspect mécanistique de ces découvertes devraient être réalisées au laboratoire dans un prochain projet.

## Discussion

### **Chimiothérapies et inhibiteurs de points de contrôles immunitaires**

Environ 60% des patients atteints de cancer et traités aux anti-PD1 ou anti-PDL-1 présenteront une réponse innée à ces anticorps monoclonaux. De nombreux efforts sont actuellement focalisés sur la potentialisation de ces thérapies par d'autres agents, tels que les thérapies ciblées, la radiothérapie, ou encore les chimiothérapies<sup>261</sup>. En particulier, la chimiothérapie pourrait pallier au manque de néo-antigènes pouvant être reconnus par le système immunitaire<sup>262</sup>. La chimiothérapie peut également diminuer les populations immunosuppressives telles que les Treg, comme le cyclophosphamide ou la gemcitabine, due à sa non-spécificité, mais peut aussi pour les mêmes raisons avoir un impact négatif sur les lymphocytes T anti-tumoraux<sup>262</sup>. Dans notre projet, nous avons combiné plusieurs cocktails chimiothérapeutiques aux anti-PD1 et anti-PDL-1, dans 4 modèles syngéniques variés, représentatifs de cancers du côlon, de la vessie et du sein. Les régimes chimiothérapeutiques, ainsi que les concentrations utilisées, ont été choisis pour être pertinents en cliniques. De plus, la variabilité des cancers étudiés en plus de la variabilité génétique des modèles murins, sont également représentatifs de la variabilité observée chez l'homme. L'hétérogénéité de réponse observée dans un même groupe de traitement est également représentative de la variabilité individuelle observée chez l'homme, et est souvent observée dans les études précliniques faisant intervenir le blocage de PCI (Figure 13).



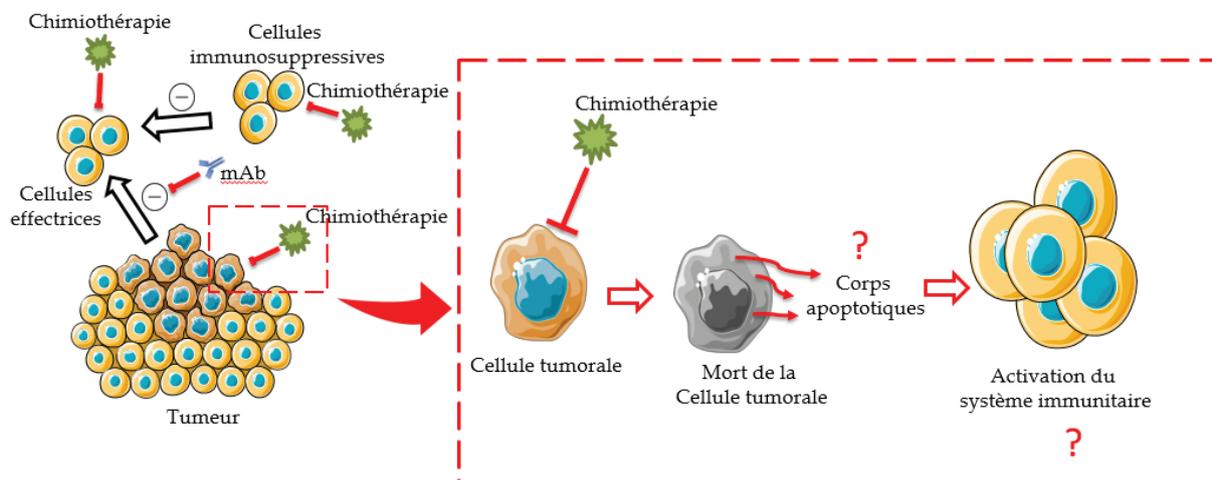
**Figure 13 - Exemple d'hétérogénéité intra-groupe lors d'un traitement aux inhibiteurs de PCI**

*Exemple d'hétérogénéité de réponse lors du traitement anti-PDL-1 (B) sur 3 souris dans un modèle de cancer de côlon MC38, en comparaison à l'évolution reproductible du volume tumoral pour des tumeurs non-traitées (A).*

Nous avons démontré que l'hypothèse d'une potentialisation des anticorps était retrouvée pour deux des cancers étudiés, le côlon et la vessie. Notamment, le modèle de cancer du côlon que nous avons utilisé (MC38), est représentatif de la classe de cancer du côlon la moins immunogène, où l'immunothérapie est peu utilisée<sup>263,264</sup>. L'efficacité anti-tumorale importante de la chimiothérapie combinée à l'anti-PD1 favoriserait notre hypothèse de libération d'antigènes tumoraux, même si nos investigations actuelles ne permettent pas de le conclure. La combinaison de chimiothérapies et du nivolumab est par ailleurs actuellement en cours d'essai clinique dans le cancer colorectal, ce qui prouve que notre étude est cohérente avec la réalité de prise en charge des patients<sup>263,265</sup>.

Nous avons également démontré un manque d'efficacité de ce type de combinaisons chimiothérapie / anti-PD1, anti-PDL-1 dans le cancer du sein, ce qui n'est pas tout à fait représentatif de la réalité clinique. En effet, dans un essai où l'atezolizumab a été combiné au paclitaxel chez des patients atteints de cancer du sein métastatique, la réponse globale était de 71%<sup>266</sup>. Cependant, la thérapie utilisée dans cet essai est le paclitaxel, un agent agissant sur les microtubules, tandis que nous avons utilisé un mélange de cyclophosphamide, un agent alkylant et la doxorubicine, un agent intercalant. Dans le pire des cas étudié, nous avons observé une inhibition de l'anti-PDL-1 par le cocktail de chimiothérapies MVAC, dans un modèle de cancer de la vessie. Dans ce dernier cas, l'observation de l'infiltrat leucocytaire a démontré une

forte diminution des lymphocytes CD4 et CD8, ainsi qu'une augmentation drastique des G-MDSC et des macrophages M2 immunosuppresseifs avec la combinaison. Ainsi, dans ce cas précis, le microenvironnement « pro-tumoral » pourrait être relié au phénotype observé in vivo. En revanche, cette affirmation n'est pas retrouvée dans le modèle 4T1 : nous avons mis en évidence le manque d'efficacité in vivo de la combinaison chimiothérapie/ anti-PD1 alors que le microenvironnement est profondément modifié, et favorablement dans ce cas-ci, avec une augmentation des cellules anti-tumorales et un écrasement des cellules M-MDSC. Comme nous l'avons discuté dans les sections précédentes, le manque de corrélation entre l'immunophénotype et le phénotype in vivo pourrait s'expliquer par la réalisation d'un seul point de cinétique d'observation. De plus, la répartition de l'infiltrat pourrait dans ce cas-ci se révéler utile, à savoir si les cellules effectrices augmentées se trouvent en profondeur de la tumeur ou en marge de celle-ci. Pour en connaître davantage sur les effets mécanistiques de la combinaison de chimiothérapies avec les inhibiteurs de points de contrôles immunitaires, d'autres mécanismes majeurs doivent être analysés, comme la libération de corps apoptotiques, ou l'immunogénicité qui restent encore inconnus à ce jour dans nos modèles (Figure 14).



**Figure 14 – Représentation schématique de l'effet des chimiothérapies en combinaisons aux inhibiteurs de points de contrôles immunitaires et limites de l'étude**

En raison de notre volonté de mimer la réalité de la pratique clinique, par le choix des modèles et des chimiothérapies, et au vu des nombreux essais cliniques actuellement en cours utilisant ce type de combinaison thérapeutique, nous sommes convaincus que ces données seront utiles aux choix du design thérapeutique chez le

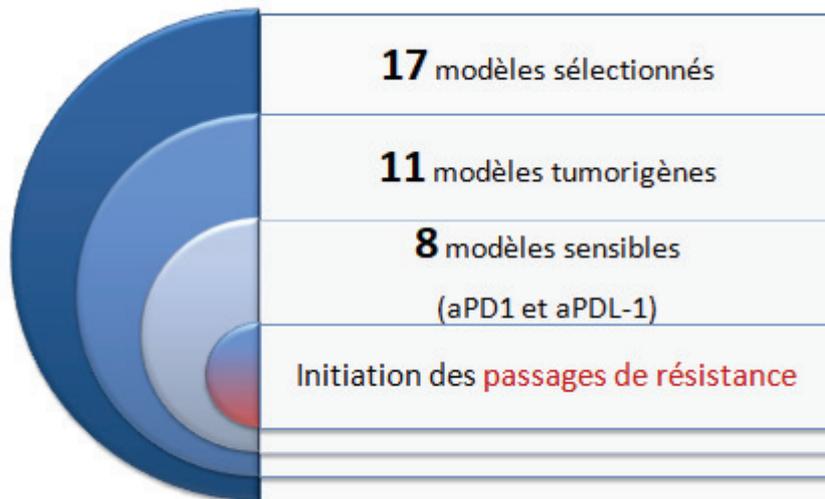
patient. Néanmoins, l'élargissement des modèles d'études, des schémas thérapeutiques (doses, fréquences, etc), ainsi que la vérification des observations sur des échantillons de patients devraient s'avérer utiles dans la continuité de ce projet.

### **Développement de modèles in vivo de résistance acquise aux inhibiteurs des points de contrôles immunitaires**

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que la combinaison d'agents chimiothérapeutiques avec les inhibiteurs de points de contrôles immunitaires pouvait augmenter leur efficacité, dans des modèles tumoraux peu sensibles de base. Ce design thérapeutique pourrait permettre de lutter contre les phénomènes de résistance innée que l'on retrouve chez la plupart des patients.

Cependant, il existe aussi une proportion non négligeable de patients initialement répondeurs aux inhibiteurs de points de contrôles immunitaires, qui vont par la suite développer une résistance, et qui représente environ 25% des patients traités. Ce phénomène est appelé « résistance acquise », et est encore peu décrit : il existe en effet peu de modèles expérimentaux permettant de l'étudier.

Dans ce contexte, notre objectif était de développer des modèles précliniques de résistance acquise aux anti-PD1 et aux anti-PDL-1, afin d'en comprendre les mécanismes. Nous avons testé de nombreux modèles pour la tumorigénèse, et la sensibilité aux anti-PD1 et anti-PDL-1 avant de réaliser les passages de résistance (Figure 15). Pour cela, nous sommes partis de fragments de tumeurs sensibles, que nous avons ensuite réimplantés dans des souris naïves, et traitées avec le même schéma que les tumeurs sensibles, jusqu'à obtention d'un phénotype résistant. Le mécanisme d'action des anti-PD1 et anti-PDL-1 requiert les cellules du système immunitaire, et il n'était donc pas possible de développer des lignées cellulaires résistantes xéno greffées ensuite chez la souris, comme c'est souvent le cas dans un projet d'étude de résistance à des traitements<sup>267,268</sup>. Nous avons ainsi soumis une pression de sélection constante pour maintenir ces modèles de résistance acquise in vivo. Notre protocole nous a permis de produire des modèles robustes, et reproductibles. Il s'agit d'une méthode simple à réaliser, nécessitant une simple chirurgie sous-cutanée, et favorisant une bonne prise tumorale, comme un fragment réimplanté contient un nombre très élevé de cellules tumorales.



**Figure 15 - Représentation schématique du nombre de modèles sélectionnés jusqu'à l'initiation de la résistance**

Cependant, quelques limitations sont à retenir. Premièrement, en choisissant ce protocole expérimental, nous sommes partis de l'hypothèse selon laquelle la résistance se mettait en place par des modifications de la tumeur, et que c'est cette tumeur qui peut influencer et moduler le microenvironnement immunitaire, et non l'inverse. De plus, lorsque nous faisons nos passages sériés pour maintenir la pression de sélection de clones résistants, nous choisissons la tumeur la plus agressive in vivo pour les séries de réimplantations. Or, les mécanismes de résistance innée et adaptative sont non exclusifs, et pourrait donc se retrouver dans le même microenvironnement. De plus, étant donné la variabilité intra-tumorale, on ne peut pas exclure le fait que nous ayant sélectionné un fragment tumoral présentant une résistance innée et non adaptative aux anticorps de sélection. Dans de futurs projets, il serait intéressant de comparer nos données avec des tumeurs issues de résistance innée.

En dépit de ces critiques, ces modèles restent très innovants. En effet, il n'existe à l'heure actuelle pas de modèles d'études comparables pour la résistance acquise aux anti-PD1/ PDL-1. Or, ces modèles sont d'un intérêt crucial pour comprendre les mécanismes de résistance acquise, et pour développer de nouvelles thérapies.

### **Cellules immunitaires et résistance**

L'étude des cellules immunitaires dans nos modèles résistants, bien que réalisée à un seul temps déterminé, nous a permis de décrire une diminution des macrophages

de type 1 (M1) commune aux modèles résistants à l'anti-PD1, et une augmentation des cellules T régulatrices immunosuppressives dans les modèles résistants à l'anti-PDL-1. Ces observations sont particulièrement intéressantes, notamment lorsque l'on met en parallèle le switch des M2 en M1 observé suite au traitement anti-PD1 dans un modèle préclinique d'ostéosarcome<sup>269</sup>. Une augmentation des M1 a été observée dans un modèle ex vivo 3D de cancer du poumon, également après un traitement au nivolumab et au pembrolizumab<sup>270</sup>. L'anti-PD1 a été décrit comme inhibant les Treg FoxP3+ dans le modèle de cancer du colon CT26<sup>271</sup>, et le blocage de l'anti-PD1 avec un anti-CD25 permettant la déplétion des Treg permet l'éradication de tumeurs établies de sarcome murin. L'inhibition de PDL-1 permet aussi de bloquer la prolifération des Treg in vitro, via l'interférence avec la phosphorylation de STAT-5<sup>272</sup>. Ainsi, l'altération des M1, et l'amplification des Treg pourraient rationnellement être liés à la résistance spécifique acquise à l'anti-PD1 et l'anti-PDL-1 respectivement. Il reste à élucider si ces mécanismes sont une cause directe de la résistance, ou s'ils sont une conséquence d'autres voies dérégulées. Pour en savoir davantage sur ce point, il serait intéressant d'utiliser des agonistes de M1, en utilisant par exemple un stimulateur du TLR3 dans nos modèles anti-PD1 résistants, et un inhibiteur de CD25 dans nos modèles anti-PDL-1 résistants.

### **Expression alternative de points de contrôles immunitaires (PCI) inhibiteurs et résistance**

Nous avons étudié l'expression de PCI alternatifs dans nos modèles résistants. Koyama et al. ont déjà décrit que la résistance acquise à l'anti-PD1 était accompagnée d'une sur-expression de TIM-3. Nous avons de notre côté observé les inhibiteurs de points de contrôles alternatifs LAG-3, TIM-3, et TIGIT, sur les cellules de l'infiltrat CD4, CD8, et sur les cellules tumorales. Nous avons démontré une augmentation significative de LAG-3 et TIM-3 sur les cellules tumorales dans le modèle de rein résistant à l'anti-PD1, suggérant le potentiel d'une inhibition combinée à l'anti-PD1 in vivo. Nous avons ainsi démontré que les combinaisons de l'anti-LAG-3 et de l'anti-TIM-3 avec l'anti-PD1, dans un modèle qui n'a plus aucune réponse pour l'anti-PD1, restaure l'efficacité in vivo. Au vu de ces résultats précliniques prometteurs, des essais cliniques permettant de déterminer l'efficacité des combinaisons anti-PD1/ anti-LAG-3, et anti-PD1/ anti-TIM-3 chez les patients atteints de carcinome rénal et réfractaire à l'anti-PD1 après une première réponse, pourrait

être envisagés assez rapidement. En effet, le nivolumab étant déjà utilisé en clinique pour les cancers du rein, et les anti-LAG-3 et anti-TIM-3 sont déjà autorisés en essais cliniques dans certains cancers solides, ces combinaisons pourraient bientôt être autorisées pour effectuer des essais cliniques chez les patients présentant une résistance acquise à l'anti-PD1.

L'observation des PCI a permis de souligner la diversité d'expression des PCI inhibiteurs dans les tumeurs résistantes de rein, de côlon et de vessie, et la variété de réponse aux anticorps bloquant ces PCI inhibiteurs. Ces données suggèrent un éventail large de choix de combinaisons de blocage de PCI inhibiteurs possible pour restaurer une réponse anti-tumorale chez les patients atteints de cancers ayant acquis une résistance aux anti-PD1 et anti-PDL-1.

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre III, nous avons jusqu'à présent uniquement évalué l'impact de combinaisons de blocage de PCI inhibiteurs, cependant la modulation des PCI activateurs pourrait être également une très bonne stratégie pour restaurer la réponse immunitaire. En effet, les PCI activateurs tels que OX-40, ou 4-1BB (CD137), sont exprimés sur les cellules T activées, les NK, les Treg, et d'autres cellules immunitaires. La stimulation de ces activateurs induirait une augmentation de l'activité cytotoxique des lymphocytes T, une diminution de la fonction suppressive des Treg, et augmentation des cytokines produites par les NK<sup>273</sup>. A titre d'exemple, dans un modèle de cancer ovarien de souris ID8, un agoniste de 4-1BB, en combinaison à l'anti-TIM-3 a induit une rémission chez près de 60% des souris<sup>274</sup>. La combinaison anti-TIM-3/ anti-PD14 fait par ailleurs l'objet d'un essai clinique actuel dans le mélanome métastatique (clinical trial nb NCT02652455). Dans une future expérimentation, l'analyse de l'expression des PCI activateurs ajoutée à l'expression des PCI inhibiteurs serait donc particulièrement intéressante.

La modulation de plusieurs PCI serait une stratégie prometteuse pour restaurer une réponse immunitaire efficace dans les modèles de résistance acquise. Néanmoins, malgré le fait que la combinaison d'anticorps inhibant les PCI inhibiteurs, et/ou ou d'agonistes des PCI activateurs pourrait augmenter le nombre de répondeurs après une résistance acquise à l'anti-PD1, il est possible qu'il existe toujours des patients qui ne répondront pas. Ceci dépendrait notamment de la préexistence d'une réponse anti-tumorale des lymphocytes T, nécessaire à l'efficacité de ces thérapies. En effet,

les tumeurs dans un état d'abondance en cellules T dites « hot », vont avoir une forte réponse aux immunothérapies, tandis que des tumeurs ayant un désert immunitaire, dites « cold », vont avoir peu de réponse immunitaire anti-tumorale<sup>275</sup>. Par exemple, nous avons vu qu'après la résistance acquise à l'anti-PDL-1, la tumeur de vessie MBT-2 que nous avons étudié ne présentait que peu d'infiltrat leucocytaire total, et une diminution significative des lymphocytes T CD4, et présente donc un profil tumoral défavorable pour les combinaisons d'anticorps anti-PCI.

Une approche envisageable pour convertir les tumeurs « cold » en tumeurs « hot » pourrait par exemple être un traitement par chimiothérapie avant d'administrer les anticorps ciblant les PCI, avec par exemple les cocktails de chimiothérapies que nous avons mis en place dans notre chapitre II. La chimiothérapie pourrait ainsi initier une destruction de la tumeur, ou des dommages suffisants pour permettre la conversion d'une tumeur « cold » vers une tumeur « hot », par la libération de néo-antigènes. Cette stratégie permettrait d'augmenter les lymphocytes T spécifiques à des antigènes tumoraux, et serait ensuite suivis du blocage des PCI inhibiteurs, et/ou d'agonistes de PCI activateurs, pour prévenir l'épuisement rapide de ces nouveaux effecteurs infiltrants la tumeur.

En conclusion, ces résultats prouvent la diversité des possibilités de combinaisons pertinentes pour rétablir une réponse tumorale efficace avec une résistance acquise à l'anti-PD1 ou l'anti-PDL-1. Il faut toutefois prêter une attention toute particulière dans le choix de ces thérapies, et en particulier dans le choix des PCI à moduler. La recherche de biomarqueurs prédictifs est donc fondamentale pour adapter le traitement de façon optimisée pour chaque patient.

Dans notre étude, nous avons notamment étudié l'expression des PCI sur les cellules immunitaires et sur les cellules tumorales comme possibilité de biomarqueurs prédictifs de la réponse aux inhibiteurs de PCI. Cette pratique a déjà été utilisée dans une étude sur de multiples tumeurs solides traités à l'atezolizumab, où une sur-expression de PDL-1 était présente sur les cellules immunitaires et sur les cellules tumorales. Cette étude a montré de façon intéressante que la réponse à l'atezolizumab était liée à une forte expression de PDL-1 sur l'infiltrat immunitaire, mais pas sur les cellules tumorales<sup>276</sup>. Cependant, dans notre cas, notre analyse de l'expression des PCI était limitée aux cellules CD4 et CD8. Il serait tout aussi fondamental d'observer l'expression des PCI sur les cellules NK, les cellules

immunosuppressives, les Treg et les DC par exemple, pour avoir une vision plus détaillée.

## **Gènes et résistance**

L'équipe de Zaretsky et al. ont démontré des mutations des gènes JAK1 et JAK2, impliqué dans le signal interféron, dans des tumeurs de mélanome issus de patients ayant développé une résistance acquise à l'anti-PD1.

Nous avons également réalisé une analyse génomique pour identifier des gènes modulés dans nos modèles résistants. Nous n'avons pas retrouvé de modulation significative des gènes JAK1 et JAK2, mais nous avons pu identifier 5 gènes communs entre nos modèles résistants à l'anti-PD1 et à l'anti-PDL-1 (cf. chapitre III). Parmi ces 5 gènes, on retrouve le gène SERPINF1, FCNA, PADI2, UGT1A7C et ENDOU.

Le gène SERPINF1 nous a paru d'un intérêt tout particulier, car sa protéine PEDF (« Pigment Epithelium-Derived Factor ») est relativement bien décrite dans la littérature comme ayant un rôle anti-tumoral dans la biologie du cancer<sup>277-279</sup>. En effet, la protéine PEDF inhiberait la phosphorylation induite par VEGF, et induirait la protéolyse intracellulaire du récepteur VEGFR, inhibant ainsi l'angiogénèse médiée par VEGF. PEDF pourrait également activer la voie de signalisation MAPK via la protéine p38 et inhiber la migration des cellules endothéliales. De plus, PEDF favoriserait la production de la protéine pro-apoptotique p53. PEDF peut activer la voie NFkB, induisant l'expression du gène pro-apoptotique CD95L, dont la protéine va être transloquée à la membrane plasmique. La liaison de CD95 avec CD95L va permettre ensuite l'activation de la cascade caspase 8. Enfin, PEDF bloquerait l'expression de la protéine FLIP (« FLICE-like inhibitory protein »); menant à l'apoptose des cellules endothéliales, et par conséquent en une réponse anti-angiogénique. Ainsi, la diminution de ce gène dans certains des modèles résistants nous a paru très encourageant. Notamment, nous avons révélé par analyse PCR une diminution significative de ce gène dans le modèle de cancer du côlon MC38 résistant à l'anti-PDL-1. Or, dans des modèles précliniques de tumeurs de côlon CT26, le transfert du gène codant pour la protéine PEDF a permis l'inhibition de la croissance tumorale, des propriétés angiogéniques, l'apoptose des cellules tumorales et l'inhibition de métastases<sup>280,281</sup>.

De façon similaire, le gène FCNA a été identifié comme ayant une action anti-tumorale. Dans des modèles précliniques de côlon et de carcinome pulmonaire, l'administration de FCNA exogène inhibe la croissance tumorale, via l'activation des cellules T CD8 et des DC<sup>282</sup>. Une autre étude a démontré une diminution de la ficolin-2 (FCN-2), l'équivalent de FCNA chez la souris, dans le sérum de patientes atteintes de cancer ovarien, en comparaison aux patientes ayant des ovaires normaux<sup>283</sup>. Ici aussi, l'étude RNAseq a démontré une diminution de FCNA dans les modèles de résistance acquise du côlon et de la vessie.

Nous avons alors voulu en savoir plus sur l'aspect fonctionnel et mécanistique de ces diminutions de gènes aux propriétés anti-tumorales dans nos modèles résistants. En effet, à ce stade, nous étions incapables de dire si ces gènes étaient impliqués directement dans la résistance, ou si leur modulation était la conséquence d'un autre phénomène responsable de la résistance (effet « indirect »). Nous ne pouvions alors pas restaurer les gènes, ou les sur-réguler, pour voir si l'effet anti-tumoral était retrouvé suite au traitement anti-PD1, car cela aurait nécessité une remise en culture de nos tumeurs résistantes, pouvant provoquer une perte de leur phénotype résistant. Aussi, nous avons décidé de partir des lignées sauvages de côlon et de vessie, dont l'expression de FCNA et SERPINF1 a été validée, pour réaliser un KO via un CRISPR/Cas9 de ces gènes. Nous espérons ainsi, après avoir obtenu l'inhibition complète de FCNA et SERPINF1, retrouver un phénotype in vivo de résistance, une fois les lignées injectées chez la souris. Nous n'avons à ce jour pas réussi à obtenir ces lignées KO, et ne pouvons donc pas conclure sur la mécanistique sous-jacente à la diminution des gènes FCNA et PADI2.

A contrario, PADI2 a été décrit comme ayant une activité pro-tumorale dans le cancer du sein. Une étude a en effet démontré que l'expression de PADI2 augmentait significativement pendant la transition des cellules d'épithélium mammaire normales vers le carcinome malin du sein, grâce à la lignée MCF10AT (un modèle de progression du cancer du sein)<sup>284</sup>. De plus, l'expression de PADI2 contribuerait à la migration anormale des cellules de cancer du sein, et affecterait la tumorigénèse des cellules de cancer du sein MCF-7 in vivo, en régulant l'expression d'autres gènes responsables du déséquilibre du métabolisme lipidique, et de l'invasion des cellules tumorales<sup>285</sup>. Le gène UGT1A7C a été identifié comme étant associé à un risque élevé de cancer pancréatique<sup>286</sup>, mais reste très peu caractérisé

à l'heure actuelle. Nos résultats de PCR ont démontré une augmentation significative de l'expression de PADI2 dans deux modèles résistants à l'anti-PDL-1 (MC38 et MB49), suggérant un mécanisme commun dans la résistance anti-PDL-1. En revanche, UGT1A7C est augmenté dans le modèle MC38, à la fois dans le modèle résistant à l'anti-PD1 et à l'anti-PDL-1, suggérant une modification propre à ce type tumoral. Afin d'identifier la voie de signalisation impliqué dans l'augmentation de ces gènes au profil pro-tumoral, nous avons initié une sur-expression de ces gènes par pcDNA3 dans les lignées sauvages, toujours en cours à l'heure actuelle.

L'analyse de certains marqueurs, en immunohistochimie, de tumeurs issues de patients ayant présenté une résistance acquise devrait être de plus en plus systématique dans les années à venir. Cela permettrait de corréler nos résultats précliniques prometteurs, à la caractérisation de ces échantillons cliniques, et permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour les patients présentant une résistance au traitements anti-PD1 et/ou anti-PDL-1.

## Conclusion

Les anticorps anti-PD1 et anti-PDL-1 ont démontré une forte efficacité dans de nombreux types tumoraux, en réactivant le système immunitaire. Cependant, une grande majorité de patient ne profite pas du bénéfice apporté par ces thérapies, dû à une résistance innée ou acquise à ces thérapies. Les travaux présentés dans cette thèse ont permis en premier lieu de démontrer le potentiel de synergie de combinaison de chimiothérapies de référence avec les anticorps anti-PD1 et anti-PDL-1 dans le cancer du côlon et de la vessie. Cependant, ce type de stratégie thérapeutique est à choisir avec précaution, car l'effet immunosuppresseur ou favorisant les cellules immunosuppressives de certaines chimiothérapies peuvent au contraire inhiber l'effet des anticorps, comme nous l'avons démontré dans un autre modèle de vessie. Ces données précliniques sont totalement représentatives de la réalité clinique, ou de nombreux essais de combinaison de chimiothérapies avec des immunothérapies sont actuellement en cours, et devrait aider à la décision thérapeutique pour restaurer une réponse immunitaire efficace et durable. Nous avons en parallèle développé des modèles de résistance acquise aux anti-PD1 et aux anti-PDL-1, que nous avons caractérisé au niveau cellulaire et moléculaire. L'analyse de l'infiltrat immunitaire nous a permis de découvrir une diminution significative des macrophages de type 1, décrits comme ayant un rôle anti-tumoral, dans les modèles résistants à l'anti-PD1. Nous avons également identifié une augmentation significative des cellules T régulatrices commune aux modèles résistants à l'anti-PDL-1. Les perspectives de ce projet incluent d'utiliser un agoniste des M1 dans les modèles résistants à l'anti-PD1, et un antagoniste des Treg dans les modèles résistants à l'anti-PDL-1, pour rétablir une sensibilité dans ces modèles. L'analyse génétique nous a ensuite permis d'identifier 5 gènes potentiels pouvant être impliqués dans la résistance acquise, dont certains ont un rôle pro-tumoral, et sont augmentés dans les modèles résistants, et d'autres ayant des propriétés anti-tumorales, diminués dans les modèles résistants. Il reste à identifier si ces gènes sont impliqués directement dans la résistance, ou sont une conséquence de la résistance acquise aux anticorps monoclonaux ciblant PD1 et PDL-1. La modulation de ces gènes reste également à valider à l'échelle du patient, et pourront peut être avoir une valeur pronostique, et au mieux prédictive de la réponse aux anti-PD1

et/ou anti-PDL-1, et de plus être ciblé par différentes stratégies thérapeutiques pour induire la destruction de tumeurs ayant acquis une résistance acquise à l'anti-PD1/PDL-1.

## Références

1. Incidence et mortalité nationale. Available at: <http://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/epidemiologie/Incidence-mortalite-nationale>. (Accessed: 11th June 2018)
2. Santé publique France - Le cancer en France métropolitaine : projections d'incidence et de mortalité par cancer en 2017. Available at: <https://www.santepubliquefrance.fr/Actualites/Le-cancer-en-France-metropolitaine-projections-d-incidence-et-de-mortalite-par-cancer-en-2017>. (Accessed: 11th June 2018)
3. Les dernières avancées - Les progrès de la recherche | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Comprendre-la-recherche/Les-progres-de-la-recherche/Les-dernieres-avancees#toc-vers-une-m-decine-de-pr-cision->. (Accessed: 11th June 2018)
4. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* **21**, 137–148 (2004).
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
6. Ghiringhelli, F. surveillance immune antitumorale et échappement.
7. Zitvogel, L., Galluzzi, L., Smyth, M. J. & Kroemer, G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. *Immunity* **39**, 74–88 (2013).
8. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
9. Delvenne, P. *et al.* [Virus-induced cancers: interplay between genetics and environment]. *Rev. Med. Liege* **67**, 381–389 (2012).

10. Galon, J. *et al.* Validation of the Immunoscore (IM) as a prognostic marker in stage I/II/III colon cancer: Results of a worldwide consortium-based analysis of 1,336 patients. *J. Clin. Oncol.* **34**, 3500–3500 (2016).
11. Olson, B. M. & McNeel, D. G. Antigen loss and tumor-mediated immunosuppression facilitate tumor recurrence. *Expert Rev. Vaccines* **11**, 1315–1317 (2012).
12. Fruci, D. *et al.* Major histocompatibility complex class I and tumour immunoevasion: how to fool T cells and natural killer cells at one time. *Curr. Oncol.* **19**, 39–41 (2012).
13. Zitvogel, L., Tesniere, A. & Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 715–727 (2006).
14. Ghiringhelli, F. *et al.* Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- $\beta$ -secreting cells inducing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell proliferation. *J. Exp. Med.* **202**, 919–929 (2005).
15. Wang, M. *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J. Cancer* **8**, 761–773 (2017).
16. Zhang, J. *et al.* VEGF blockade inhibits lymphocyte recruitment and ameliorates immune-mediated vascular remodeling. *Circ. Res.* **107**, 408–417 (2010).
17. Butt, A. Q. & Mills, K. H. G. Immunosuppressive networks and checkpoints controlling antitumor immunity and their blockade in the development of cancer immunotherapeutics and vaccines. *Oncogene* **33**, 4623–4631 (2014).
18. de Visser, K. E., Eichten, A. & Coussens, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 24–37 (2006).

19. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991–1045 (1994).
20. Stockwin, L. H., McGonagle, D., Martin, I. G. & Blair, G. E. Dendritic cells: Immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunol. Cell Biol.* **78**, 91–102 (2000).
21. Anguille, S., Smits, E. L., Lion, E., van Tendeloo, V. F. & Berneman, Z. N. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol.* **15**, e257–e267 (2014).
22. Michielsen, A. J., Ryan, E. J. & O’Sullivan, J. N. Dendritic cell inhibition correlates with survival of colorectal cancer patients on bevacizumab treatment. *Oncoimmunology* **1**, 1445–1447 (2012).
23. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510 (2008).
24. Trinchieri, G. Biology of Natural Killer Cells. in *Advances in Immunology* (ed. Dixon, F. J.) **47**, 187–376 (Academic Press, 1989).
25. Perussia, null. The Cytokine Profile of Resting and Activated NK Cells. *Methods San Diego Calif* **9**, 370–378 (1996).
26. Lauwerys, B. R., Garot, N., Renaud, J.-C. & Houssiau, F. A. Cytokine Production and Killer Activity of NK/T-NK Cells Derived with IL-2, IL-15, or the Combination of IL-12 and IL-18. *J. Immunol.* **165**, 1847–1853 (2000).
27. Adib-Conquy, M., Scott-Algara, D., Cavaillon, J.-M. & Souza-Fonseca-Guimaraes, F. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals. *Immunol. Cell Biol.* **92**, 256–262 (2014).
28. Leung, W. Infusions of allogeneic natural killer cells as cancer therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 3390–3400 (2014).

29. Grégoire, C. *et al.* The trafficking of natural killer cells. *Immunol. Rev.* **220**, 169–182 (2007).
30. Silva, A., Andrews, D. M., Brooks, A. G., Smyth, M. J. & Hayakawa, Y. Application of CD27 as a marker for distinguishing human NK cell subsets. *Int. Immunol.* **20**, 625–630 (2008).
31. Carlyle, J. R. *et al.* Molecular and genetic basis for strain-dependent NK1.1 alloreactivity of mouse NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 7511–7524 (2006).
32. Alvarez-Breckenridge, C. A. *et al.* NK cells impede glioblastoma virotherapy through NKp30 and NKp46 natural cytotoxicity receptors. *Nat. Med.* **18**, 1827–1834 (2012).
33. Elhelu, M. A. The Role of Macrophages in Immunology. *J. Natl. Med. Assoc.* **75**, 314–317 (1983).
34. Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 723–737 (2011).
35. Steidl, C. *et al.* Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **362**, 875–885 (2010).
36. Duluc, D. *et al.* Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *Int. J. Cancer* **125**, 367–373 (2009).
37. Windbichler, G. H. *et al.* Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial. *Br. J. Cancer* **82**, 1138–1144 (2000).
38. Nagai, Y., Tsuchiya, H., Ji, M. Q., Zhang, H. & Greene, M. I. Synergistic effect of IFN- $\gamma$  on breast cancer targeted therapy. *J. Immunol.* **198**, 141.14-141.14 (2017).

39. Gleave, M. E. *et al.* Interferon Gamma-1b Compared with Placebo in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1265–1271 (1998).
40. Wiesenfeld, M. *et al.* Controlled clinical trial of interferon-gamma as postoperative surgical adjuvant therapy for colon cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **13**, 2324–2329 (1995).
41. Khazen, W. *et al.* Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS Lett.* **579**, 5631–5634 (2005).
42. Dong, P. *et al.* CD86<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>, Diametrically Polarized Tumor-Associated Macrophages, Predict Hepatocellular Carcinoma Patient Prognosis. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 320 (2016).
43. Galdiero, M. R. *et al.* Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* **218**, 1402–1410 (2013).
44. Jaillon, S. *et al.* Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin. Immunopathol.* **35**, 377–394 (2013).
45. Treffers, L. W., Hiemstra, I. H., Kuijpers, T. W., van den Berg, T. K. & Matlung, H. L. Neutrophils in cancer. *Immunol. Rev.* **273**, 312–328 (2016).
46. Mócsai, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* **210**, 1283–1299 (2013).
47. Fulkerson, P. C. & Rothenberg, M. E. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 117–129 (2013).
48. Goldman, A. S. & Prabhakar, B. S. Immunology Overview. in *Medical Microbiology* (ed. Baron, S.) (University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996).
49. Alberts, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell.* (Garland Science, 2002).

50. Transitional B cells: step by step towards immune competence: Trends in Immunology. Available at:  
[https://www.cell.com/trends/immunology/abstract/S1471-4906\(03\)00119-4](https://www.cell.com/trends/immunology/abstract/S1471-4906(03)00119-4).  
(Accessed: 11th June 2018)
51. LeBien, T. W. & Tedder, T. F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* **112**, 1570–1580 (2008).
52. Descatoire, M. Human marginal zone B cell : a NOTCH2 dependent lineage. (Université René Descartes - Paris V, 2013).
53. Petro, J. B. *et al.* Transitional type 1 and 2 B lymphocyte subsets are differentially responsive to antigen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **277**, 48009–48019 (2002).
54. A brief history of T cell help to B cells | Nature Reviews Immunology. Available at: <https://www.nature.com/articles/nri3803>. (Accessed: 11th June 2018)
55. McHeyzer-Williams, M., Okitsu, S., Wang, N. & McHeyzer-Williams, L. Molecular programming of B cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 24–34 (2012).
56. Kurosaki, T., Kometani, K. & Ise, W. Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 149–159 (2015).
57. Del Nagro, C. J. *et al.* CD19 function in central and peripheral B-cell development. *Immunol. Res.* **31**, 119–131 (2005).
58. Spiering, M. J. Primer on the Immune System. *Alcohol Res. Curr. Rev.* **37**, 171–175 (2015).
59. Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D. & Xia, B. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, (2012).
60. Sokol, C. L. *et al.* Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat. Immunol.* **10**, 713–720 (2009).

61. Besancon, M. Immunothérapie non-spécifique du cancer de la vessie : développement de nouvelles approches basées sur la combinaison d'agents thérapeutiques. (2017).
62. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–564 (2012).
63. Chen, W. *et al.* Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **198**, 1875–1886 (2003).
64. Ventre, E. Modulation des fonctions des lymphocytes T CD8 par l'Interleukine-4 et les cytokines de la famille  $\gamma c$ . (Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2011).
65. Zehn, D., Lee, S. Y. & Bevan, M. J. Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* **458**, 211–214 (2009).
66. Curtsinger, J. M., Valenzuela, J. O., Agarwal, P., Lins, D. & Mescher, M. F. Cutting Edge: Type I IFNs Provide a Third Signal to CD8 T Cells to Stimulate Clonal Expansion and Differentiation. *J. Immunol.* **174**, 4465–4469 (2005).
67. Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. & Trapani, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 388–400 (2015).
68. Strasser, A., Jost, P. J. & Nagata, S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* **30**, 180–192 (2009).
69. Umansky, V., Blattner, C., Gebhardt, C. & Utikal, J. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression. *Vaccines* **4**, (2016).

70. Zea, A. H. *et al.* Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* **65**, 3044–3048 (2005).
71. Kusmartsev, S. *et al.* Reversal of Myeloid Cell–Mediated Immunosuppression in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **14**, 8270–8278 (2008).
72. Bronte, V. *et al.* Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat. Commun.* **7**, 12150 (2016).
73. Fridman, W. H. *et al.* Immune infiltration in human cancer: prognostic significance and disease control. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **344**, 1–24 (2011).
74. Li, J., Wang, J., Chen, R., Bai, Y. & Lu, X. The prognostic value of tumor-infiltrating T lymphocytes in ovarian cancer. *Oncotarget* **8**, 15621–15631 (2017).
75. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 298–306 (2012).
76. Tosolini, M. *et al.* Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* **71**, 1263–1271 (2011).
77. Yoon, N. K. *et al.* Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. *Hum. Pathol.* **41**, 1794–1801 (2010).
78. Lv, L. *et al.* The accumulation and prognosis value of tumor infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One* **6**, e18219 (2011).
79. Balkwill, F. R., Capasso, M. & Hagemann, T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* **125**, 5591–5596 (2012).

80. Kotsakis, A. *et al.* Prognostic value of circulating regulatory T cell subsets in untreated non-small cell lung cancer patients. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
81. Curiel, T. J. *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* **10**, 942–949 (2004).
82. Koreishi, A. F. *et al.* The role of cytotoxic and regulatory T cells in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM* **18**, 206–211 (2010).
83. Tzankov, A. *et al.* Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* **93**, 193–200 (2008).
84. Coronella, J. A. *et al.* Evidence for an Antigen-driven Humoral Immune Response in Medullary Ductal Breast Cancer. *Cancer Res.* **61**, 7889–7899 (2001).
85. Wouters, M. C. & Nelson, B. H. Prognostic significance of tumor-infiltrating B cells and plasma cells in human cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* (2018). doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-1481
86. Schioppa, T. *et al.* B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- $\alpha$  during squamous carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201100994 (2011). doi:10.1073/pnas.1100994108
87. Horikawa, M., Minard-Colin, V., Matsushita, T. & Tedder, T. F. Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 4268–4280 (2011).
88. Xu, B. *et al.* Prognostic value of tumor infiltrating NK cells and macrophages in stage II+III esophageal cancer patients. *Oncotarget* **7**, 74904–74916 (2016).

89. Tachibana, T. *et al.* Increased Intratumor V $\alpha$ 24-Positive Natural Killer T Cells: A Prognostic Factor for Primary Colorectal Carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **11**, 7322–7327 (2005).
90. Qiu, H. *et al.* The prognostic significance of peripheral T-lymphocyte subsets and natural killer cells in patients with colorectal cancer. *Hepatogastroenterology.* **56**, 1310–1315 (2009).
91. Qian, B.-Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39–51 (2010).
92. Condeelis, J. & Pollard, J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* **124**, 263–266 (2006).
93. Bingle, L., Brown, N. J. & Lewis, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* **196**, 254–265 (2002).
94. Yang, L. *et al.* CD163+ tumor-associated macrophage is a prognostic biomarker and is associated with therapeutic effect on malignant pleural effusion of lung cancer patients. *Oncotarget* **6**, 10592–10603 (2015).
95. Dave, S. S. *et al.* Prediction of Survival in Follicular Lymphoma Based on Molecular Features of Tumor-Infiltrating Immune Cells. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa041869> (2009). doi:10.1056/NEJMoa041869
96. Ojalvo, L. S., Whittaker, C. A., Condeelis, J. S. & Pollard, J. W. Gene Expression Analysis of Macrophages That Facilitate Tumor Invasion Supports a Role for Wnt-Signaling in Mediating Their Activity in Primary Mammary Tumors. *J. Immunol.* **184**, 702–712 (2010).

97. Zabuawala, T. *et al.* An Ets2-Driven Transcriptional Program in Tumor-Associated Macrophages Promotes Tumor Metastasis. *Cancer Res.* 0008-5472.CAN-09-1474 (2010). doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1474
98. Murdoch, C., Giannoudis, A. & Lewis, C. E. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* **104**, 2224–2234 (2004).
99. White, J. R. *et al.* Genetic amplification of the transcriptional response to hypoxia as a novel means of identifying regulators of angiogenesis. *Genomics* **83**, 1–8 (2004).
100. Kusmartsev, S., Nagaraj, S. & Gabrilovich, D. I. Tumor-Associated CD8+ T Cell Tolerance Induced by Bone Marrow-Derived Immature Myeloid Cells. *J. Immunol.* **175**, 4583–4592 (2005).
101. Bronte, V., Serafini, P., Mazzoni, A., Segal, D. M. & Zanovello, P. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol.* **24**, 301–305 (2003).
102. Huang, B. *et al.* Gr-1+CD115+ Immature Myeloid Suppressor Cells Mediate the Development of Tumor-Induced T Regulatory Cells and T-Cell Anergy in Tumor-Bearing Host. *Cancer Res.* **66**, 1123–1131 (2006).
103. Sinha, P., Clements, V. K., Bunt, S. K., Albelda, S. M. & Ostrand-Rosenberg, S. Cross-Talk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Macrophages Subverts Tumor Immunity toward a Type 2 Response. *J. Immunol.* **179**, 977–983 (2007).
104. Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S. & Bronte, V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 253–268 (2012).

105. Janco, J. M. T., Lamichhane, P., Karyampudi, L. & Knutson, K. L. TUMOR-INFILTRATING DENDRITIC CELLS IN CANCER PATHOGENESIS1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**, 2985–2991 (2015).
106. Treilleux, I. *et al.* Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10**, 7466–7474 (2004).
107. Sandel, M. H. *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 2576–2582 (2005).
108. Cai, X.-Y. *et al.* Dendritic cell infiltration and prognosis of human hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **132**, 293–301 (2006).
109. Ma, Y., Shurin, G. V., Peiyuan, Z. & Shurin, M. R. Dendritic Cells in the Cancer Microenvironment. *J. Cancer* **4**, 36–44 (2013).
110. Angell, H. & Galon, J. From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 261–267 (2013).
111. Gao, P. *et al.* Is the prediction of prognosis not improved by the seventh edition of the TNM classification for colorectal cancer? Analysis of the surveilla006Ece, epidemiology, and end results (SEER) database. *BMC Cancer* **13**, 123 (2013).
112. Pagès, F. *et al.* International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet Lond. Engl.* **391**, 2128–2139 (2018).
113. Galon, J. *et al.* Towards the introduction of the ‘Immunoscore’ in the classification of malignant tumours. *J. Pathol.* **232**, 199–209 (2014).

114. Anitei, M.-G. *et al.* Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 1891–1899 (2014).
115. Yang, Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J. Clin. Invest.* **125**, 3335–3337 (2015).
116. Helmy, K. Y., Patel, S. A., Nahas, G. R. & Rameshwar, P. Cancer immunotherapy: accomplishments to date and future promise. *Ther. Deliv.* **4**, 1307–1320 (2013).
117. Cheever, M. A., Thompson, J. A., Peace, D. J. & Greenberg, P. D. Potential Uses of Interleukin 2 in Cancer Therapy. *Immunobiology* **172**, 365–382 (1986).
118. Négrier, S. *et al.* Randomized study of intravenous versus subcutaneous interleukin-2, and IFNalpha in patients with good prognosis metastatic renal cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 5907–5912 (2008).
119. Tourani, J.-M. *et al.* Subcutaneous interleukin-2 and interferon alfa administration in patients with metastatic renal cell carcinoma: final results of SCAPP III, a large, multicenter, phase II, nonrandomized study with sequential analysis design--the Subcutaneous Administration Propeukin Program Cooperative Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 3987–3994 (2003).
120. Dhupkar, P. & Gordon, N. Interleukin-2: Old and New Approaches to Enhance Immune-Therapeutic Efficacy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **995**, 33–51 (2017).
121. Parker, B. S., Rautela, J. & Hertzog, P. J. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 131–144 (2016).

122. Pasquali, S. & Mocellin, S. The anticancer face of interferon alpha (IFN-alpha): from biology to clinical results, with a focus on melanoma. *Curr. Med. Chem.* **17**, 3327–3336 (2010).
123. Veronese, F. M. & Mero, A. The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* **22**, 315–329 (2008).
124. Eggermont, A. M. M. *et al.* Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *Lancet Lond. Engl.* **372**, 117–126 (2008).
125. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. Available at: <http://jcmtjournal.com/article/view/2275>.  
(Accessed: 19th June 2018)
126. Sears, H. F. *et al.* Phase-I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumours. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 762–765 (1982).
127. Scott, A. M., Wolchok, J. D. & Old, L. J. Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 278–287 (2012).
128. Hubert, P. & Amigorena, S. Antibody-dependent cell cytotoxicity in monoclonal antibody-mediated tumor immunotherapy. *Oncoimmunology* **1**, 103–105 (2012).
129. Zafir-Lavie, I., Michaeli, Y. & Reiter, Y. Novel antibodies as anticancer agents. *Oncogene* **26**, 3714–3733 (2007).
130. Bakema, J. E. & van Egmond, M. Fc receptor-dependent mechanisms of monoclonal antibody therapy of cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **382**, 373–392 (2014).
131. Pescovitz, M. D. Rituximab, an Anti-CD20 Monoclonal Antibody: History and Mechanism of Action. *Am. J. Transplant.* **6**, 859–866

132. Sauveur, J. Development and characterization of models of resistance to T-DM1. (Université de Lyon, 2016).
133. Klute, K. *et al.* Microtubule inhibitor-based antibody–drug conjugates for cancer therapy. *OncoTargets Ther.* **7**, 2227–2236 (2014).
134. Varga, C., Maglio, M., Ghobrial, I. M. & Richardson, P. G. Current use of monoclonal antibodies in the treatment of multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **181**, 447–459 (2018).
135. Teicher, B. A. & Chari, R. V. J. Antibody Conjugate Therapeutics: Challenges and Potential. *Clin. Cancer Res.* **17**, 6389–6397 (2011).
136. Kellner, C. *et al.* A Novel CD19-directed Recombinant Bispecific Antibody Derivative With Enhanced Immune Effector Functions for Human Leukemic Cells. *J. Immunother.* **31**, 871 (2008).
137. Kipriyanov, S. M. *et al.* Synergistic antitumor effect of bispecific CD19 x CD3 and CD19 x CD16 diabodies in a preclinical model of non-Hodgkin's lymphoma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**, 137–144 (2002).
138. Dreier, T. *et al.* T Cell Costimulus-Independent and Very Efficacious Inhibition of Tumor Growth in Mice Bearing Subcutaneous or Leukemic Human B Cell Lymphoma Xenografts by a CD19-/CD3- Bispecific Single-Chain Antibody Construct. *J. Immunol.* **170**, 4397–4402 (2003).
139. Kantarjian, H. *et al.* Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **376**, 836–847 (2017).
140. Byrne, H., Conroy, P. J., Whisstock, J. C. & O'Kennedy, R. J. A tale of two specificities: bispecific antibodies for therapeutic and diagnostic applications. *Trends Biotechnol.* **31**, 621–632 (2013).

141. Davis, Z. B., Felices, M., Verneris, M. R. & Miller, J. S. Natural Killer Cell Adoptive Transfer Therapy: Exploiting the First Line of Defense Against Cancer. *Cancer J. Sudbury Mass* **21**, 486–491 (2015).
142. Welniak, L. A., Blazar, B. R. & Murphy, W. J. Immunobiology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 139–170 (2007).
143. Perica, K., Varela, J. C., Oelke, M. & Schneck, J. Adoptive T Cell Immunotherapy for Cancer. *Rambam Maimonides Med. J.* **6**, (2015).
144. Wrzesinski, C. *et al.* Increased intensity lymphodepletion enhances tumor treatment efficacy of adoptively transferred tumor-specific T cells. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* **33**, 1–7 (2010).
145. Kershaw, M. H., Westwood, J. A. & Darcy, P. K. Gene-engineered T cells for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 525–541 (2013).
146. Cartellieri, M. *et al.* Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 956304 (2010).
147. Grupp, S. A. *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1509–1518 (2013).
148. Khera, N., Zeliadt, S. B. & Lee, S. J. Economics of hematopoietic cell transplantation. *Blood* **120**, 1545–1551 (2012).
149. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264 (2012).
150. Granier, C. *et al.* [Tim-3: a novel biomarker and therapeutic target in oncology]. *Med. Sci. MS* **34**, 231–237 (2018).

151. Wang, F. *et al.* TIGIT expression levels on human NK cells correlate with functional heterogeneity among healthy individuals. *Eur. J. Immunol.* **45**, 2886–2897 (2015).
152. Mishra, A. K. *et al.* Squamous cell carcinomas escape immune surveillance via inducing chronic activation and exhaustion of CD8+ T Cells co-expressing PD-1 and LAG-3 inhibitory receptors. *Oncotarget* **7**, 81341–81356 (2016).
153. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* **182**, 459–465 (1995).
154. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* **11**, 3887–3895 (1992).
155. Alsaab, H. O. *et al.* PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front. Pharmacol.* **8**, (2017).
156. Zou, W., Wolchok, J. D. & Chen, L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 Pathway Blockade for Cancer Therapy: Mechanisms, Response Biomarkers and Combinations. *Sci. Transl. Med.* **8**, 328rv4 (2016).
157. Pauken, K. E. & Wherry, E. J. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol.* **36**, 265–276 (2015).
158. Couzin-Frankel, J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* **342**, 1432–1433 (2013).
159. Philips, G. K. & Atkins, M. Therapeutic uses of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies. *Int. Immunol.* **27**, 39–46 (2015).

160. Topalian, S. L. *et al.* Survival, Durable Tumor Remission, and Long-Term Safety in Patients With Advanced Melanoma Receiving Nivolumab. *J. Clin. Oncol.* **32**, 1020–1030 (2014).
161. Shah, N. J., Kelly, W. J., Liu, S. V., Choquette, K. & Spira, A. Product review on the Anti-PD-L1 antibody atezolizumab. *Hum. Vaccines Immunother.* **14**, 269–276 (2018).
162. Zhang, F. *et al.* Structural basis of the therapeutic anti-PD-L1 antibody atezolizumab. *Oncotarget* **8**, 90215–90224 (2017).
163. Herbst, R. S. *et al.* A study of MPDL3280A, an engineered PD-L1 antibody in patients with locally advanced or metastatic tumors. *J. Clin. Oncol.* **31**, 3000–3000 (2013).
164. Ansell, S. M. *et al.* PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1411087> (2015).  
doi:10.1056/NEJMoa1411087
165. Smith, K. M. & Desai, J. Nivolumab for the treatment of colorectal cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **18**, 611–618 (2018).
166. Pembrolizumab for patients with PD-L1-positive advanced gastric cancer (KEYNOTE-012): a multicentre, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* **17**, 717–726 (2016).
167. Moskowitz, C. H. *et al.* Pembrolizumab in Relapsed/Refractory Classical Hodgkin Lymphoma: Primary End Point Analysis of the Phase 2 Keynote-087 Study. *Blood* **128**, 1107–1107 (2016).
168. Bellmunt, J. *et al.* Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1015–1026 (2017).

169. Antonia, S. J. *et al.* Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1919–1929 (2017).
170. Villadolid, J. & Amin, A. Immune checkpoint inhibitors in clinical practice: update on management of immune-related toxicities. *Transl. Lung Cancer Res.* **4**, 560–575 (2015).
171. Naidoo, J. *et al.* Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Ann. Oncol.* **26**, 2375–2391 (2015).
172. Topalian, S. L. *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2443–2454 (2012).
173. Brahmer, J. R. *et al.* Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2455–2465 (2012).
174. Belum, V. R. *et al.* Characterisation and management of dermatologic adverse events to agents targeting the PD-1 receptor. *Eur. J. Cancer* **60**, 12–25 (2016).
175. Ryder, M., Callahan, M., Postow, M. A., Wolchok, J. & Fagin, J. A. Endocrine-related adverse events following ipilimumab in patients with advanced melanoma: a comprehensive retrospective review from a single institution. *Endocr. Relat. Cancer* **21**, 371–381 (2014).
176. Adam, J. *et al.* Évaluation de l'expression de PD-L1 en immunohistochimie : un biomarqueur émergent dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules. *Ann. Pathol.* **36**, 94–102 (2016).
177. Bellesoeur, A. Biomarqueurs des immunothérapies anti-PD-1/PD-L1 : facteurs cliniques, histologiques et immunohistochimiques associés au statut PD-L1. 73 (2016).
178. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer | NEJM. Available at:

<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1606774>. (Accessed: 29th June 2018)

179. Maleki Vareki, S., Garrigós, C. & Duran, I. Biomarkers of response to PD-1/PD-L1 inhibition. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **116**, 116–124 (2017).
180. Callea, M. *et al.* Differential Expression of PD-L1 between Primary and Metastatic Sites in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunol. Res.* **3**, 1158–1164 (2015).
181. Leite, K. R. M. *et al.* PD-L1 expression in renal cell carcinoma clear cell type is related to unfavorable prognosis. *Diagn. Pathol.* **10**, 189 (2015).
182. Motzer, R. J. *et al.* Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 1430–1437 (2015).
183. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma | NEJM. Available at: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1510665>. (Accessed: 12th July 2018)
184. Choueiri, T. K. *et al.* Immunomodulatory Activity of Nivolumab in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **22**, 5461–5471 (2016).
185. Holmgaard, R. B., Zamarin, D., Munn, D. H., Wolchok, J. D. & Allison, J. P. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *J. Exp. Med.* jem.20130066 (2013).  
doi:10.1084/jem.20130066
186. Housseau, F. & Llosa, N. J. Immune checkpoint blockade in microsatellite instable colorectal cancers: Back to the clinic. *Oncoimmunology* **4**, (2015).

187. Krähenbühl, L. *et al.* A Longitudinal Analysis of IDO and PDL1 Expression during Immune- or Targeted Therapy in Advanced Melanoma. *Neoplasia N. Y. N* **20**, 218–225 (2018).
188. Holmgaard, R. B. *et al.* Tumor-Expressed IDO Recruits and Activates MDSCs in a Treg-Dependent Manner. *Cell Rep.* **13**, 412–424 (2015).
189. Rizvi, N. A. *et al.* Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* **348**, 124–128 (2015).
190. Gibney, G. T., Weiner, L. M. & Atkins, M. B. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* **17**, e542–e551 (2016).
191. Johnson, D. B. *et al.* Hybrid capture-based next-generation sequencing (HC NGS) in melanoma to identify markers of response to anti-PD-1/PD-L1. *J. Clin. Oncol.* **34**, 105–105 (2016).
192. Rosenberg, J. E. *et al.* Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet* **387**, 1909–1920 (2016).
193. Hugo, W. *et al.* Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* **165**, 35–44 (2016).
194. McGranahan, N. *et al.* Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* **351**, 1463–1469 (2016).
195. Alexander, M., Mellor, J. D., McArthur, G. & Kee, D. Ipilimumab in pretreated patients with unresectable or metastatic cutaneous, uveal and mucosal melanoma. *Med. J. Aust.* **201**, 49–53 (2014).

196. Simeone, E. *et al.* Immunological and biological changes during ipilimumab treatment and their potential correlation with clinical response and survival in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **63**, 675–683 (2014).
197. Postow, M. A. *et al.* Pharmacodynamic effect of ipilimumab on absolute lymphocyte count (ALC) and association with overall survival in patients with advanced melanoma. *J. Clin. Oncol.* **31**, 9052–9052 (2013).
198. Schaer, D. A. *et al.* Detection of Intra-Tumor Self Antigen Recognition during Melanoma Tumor Progression in Mice Using Advanced Multimode Confocal/Two Photon Microscope. *PLOS ONE* **6**, e21214 (2011).
199. Tumeh, P. C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**, 568–571 (2014).
200. Daud, A. I. *et al.* Tumor immune profiling predicts response to anti-PD-1 therapy in human melanoma. *J. Clin. Invest.* **126**, 3447–3452 (2016).
201. Sivan, A. *et al.* Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* **350**, 1084–1089 (2015).
202. Vétizou, M. *et al.* Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* **350**, 1079–1084 (2015).
203. Vétizou, M. & Trinchieri, G. Anti-PD1 in the wonder-gut-land. *Cell Res.* **28**, 263–264 (2018).
204. Routy, B. *et al.* Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* **359**, 91–97 (2018).
205. Jenkins, R. W., Barbie, D. A. & Flaherty, K. T. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br. J. Cancer* **118**, 9–16 (2018).

206. Pitt, J. M. *et al.* Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity* **44**, 1255–1269 (2016).
207. Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* **348**, 69–74 (2015).
208. Le, D. T. *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2509–2520 (2015).
209. Le, D. T. *et al.* Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* **357**, 409–413 (2017).
210. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden | NEJM. *New England Journal of Medicine* Available at: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa1801946>. (Accessed: 14th August 2018)
211. Zaretsky, J. M. *et al.* Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **375**, 819–829 (2016).
212. Anagnostou, V. *et al.* Evolution of Neoantigen Landscape during Immune Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov.* **7**, 264–276 (2017).
213. Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O. & Zitvogel, L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 51–72 (2013).
214. Zitvogel, L., Kepp, O. & Kroemer, G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* **140**, 798–804 (2010).
215. Schlemmer, F. *Mécanismes de la chimiothérapie immunogène*. (Paris 11, 2013).
216. Peng, W. *et al.* Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-Mediated Immunotherapy. *Cancer Discov.* **6**, 202–216 (2016).

217. Spranger, S., Bao, R. & Gajewski, T. F. Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* **523**, 231–235 (2015).
218. Koyama, S. *et al.* Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat. Commun.* **7**, ncomms10501 (2016).
219. Kim, K. *et al.* Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 11774–11779 (2014).
220. O'Donnell, J. S., Long, G. V., Scolyer, R. A., Teng, M. W. L. & Smyth, M. J. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition. *Cancer Treat. Rev.* **52**, 71–81 (2017).
221. Shin, D. *et al.* Innate resistance of PD-1 blockade through loss of function mutations in JAK resulting in inability to express PD-L1 upon interferon exposure. *J. Immunother. Cancer* **3**, P311 (2015).
222. Marabelle, A., Aspeslagh, S., Postel-Vinay, S. & Soria, J.-C. JAK Mutations as Escape Mechanisms to Anti-PD-1 Therapy. *Cancer Discov.* **7**, 128–130 (2017).
223. Manguso, R. T. *et al.* In vivo CRISPR screening identifies Ptpn2 as a cancer immunotherapy target. *Nature* **547**, 413–418 (2017).
224. Benci, J. L. *et al.* Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. *Cell* **167**, 1540-1554.e12 (2016).
225. Zaidi, M. R. & Merlino, G. The Two Faces of Interferon- $\gamma$  in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **17**, 6118–6124 (2011).

226. Chen, P.-L. *et al.* Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discov.* **6**, 827–837 (2016).
227. Sakuishi, K. *et al.* Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* **207**, 2187–2194 (2010).
228. Shayan, G. *et al.* Adaptive resistance to anti-PD1 therapy by Tim-3 upregulation is mediated by the PI3K-Akt pathway in head and neck cancer. *Oncoimmunology* **6**, e1261779 (2017).
229. Huang, R.-Y., Francois, A., McGray, A. R., Miliotto, A. & Odunsi, K. Compensatory upregulation of PD-1, LAG-3, and CTLA-4 limits the efficacy of single-agent checkpoint blockade in metastatic ovarian cancer. *Oncoimmunology* **6**, e1249561 (2017).
230. Gao, J. *et al.* VISTA is an inhibitory immune checkpoint that is increased after ipilimumab therapy in patients with prostate cancer. *Nat. Med.* **23**, 551–555 (2017).
231. Intrinsic Resistance of Solid Tumors to Immune Checkpoint Blockade Therapy | Cancer Research. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/77/4/817.article-info>. (Accessed: 29th June 2018)
232. Highfill, S. L. *et al.* Disruption of CXCR2-mediated MDSC tumor trafficking enhances anti-PD1 efficacy. *Sci. Transl. Med.* **6**, 237ra67 (2014).
233. Ribas, A. *et al.* PD-1 Blockade Expands Intratumoral Memory T Cells. *Cancer Immunol. Res.* **4**, 194–203 (2016).
234. Sen, D. R. *et al.* The epigenetic landscape of T cell exhaustion. *Science* **354**, 1165–1169 (2016).

235. Patel, S. A. & Minn, A. J. Combination Cancer Therapy with Immune Checkpoint Blockade: Mechanisms and Strategies. *Immunity* **48**, 417–433 (2018).
236. Kersten, K., Salvagno, C. & de Visser, K. E. Exploiting the Immunomodulatory Properties of Chemotherapeutic Drugs to Improve the Success of Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **6**, 516 (2015).
237. Bruchard, M. & Ghiringhelli, F. [Impact of chemotherapies on immunosuppression and discovery of new therapeutic targets]. *Bull. Cancer (Paris)* **101**, 605–607 (2014).
238. Ribas, A. *et al.* Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell* **170**, 1109-1119.e10 (2017).
239. Fu, J. *et al.* STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1 blockade. *Sci. Transl. Med.* **7**, 283ra52 (2015).
240. Shekarian, T. *et al.* Pattern recognition receptors: immune targets to enhance cancer immunotherapy. *Ann. Oncol.* **28**, 1756–1766 (2017).
241. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity | JEM. Available at:  
<http://jem.rupress.org/content/207/10/2187.short>. (Accessed: 29th June 2018)
242. Liu, J. *et al.* Immune-checkpoint proteins VISTA and PD-1 nonredundantly regulate murine T-cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 6682–6687 (2015).
243. Arce Vargas, F. *et al.* Fc-Optimized Anti-CD25 Depletes Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells and Synergizes with PD-1 Blockade to Eradicate Established Tumors. *Immunity* **46**, 577–586 (2017).
244. Sanmamed, M. F. *et al.* Agonists of Co-stimulation in Cancer Immunotherapy Directed Against CD137, OX40, GITR, CD27, CD28, and ICOS. *Semin. Oncol.* **42**, 640–655 (2015).

245. Linch, S. N., McNamara, M. J. & Redmond, W. L. OX40 Agonists and Combination Immunotherapy: Putting the Pedal to the Metal. *Front. Oncol.* **5**, (2015).
246. Guo, Z. *et al.* PD-1 blockade and OX40 triggering synergistically protects against tumor growth in a murine model of ovarian cancer. *PloS One* **9**, e89350 (2014).
247. Xu, D. *et al.* NK and CD8+ T cell-mediated eradication of poorly immunogenic B16-F10 melanoma by the combined action of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation. *Int. J. Cancer* **109**, 499–506 (2004).
248. Fan, X., Quezada, S. A., Sepulveda, M. A., Sharma, P. & Allison, J. P. Engagement of the ICOS pathway markedly enhances efficacy of CTLA-4 blockade in cancer immunotherapy. *J. Exp. Med.* **211**, 715–725 (2014).
249. Harvey, C. *et al.* Efficacy of anti-ICOS agonist monoclonal antibodies in preclinical tumor models provides a rationale for clinical development as cancer immunotherapeutics. *J. Immunother. Cancer* **3**, O9 (2015).
250. Dose Escalation and Expansion Study of GSK3359609 in Subjects With Selected Advanced Solid Tumors (INDUCE-1) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02723955>. (Accessed: 16th August 2018)
251. Sears, O. *et al.* Abstract CT035: ICONIC: Phase 1/2 trial of ICOS agonist JTX-2011 alone and in combination with nivolumab (nivo). *Cancer Res.* **77**, CT035–CT035 (2017).
252. Ménétrier-Caux, C. *et al.* Targeting regulatory T cells. *Target. Oncol.* **7**, 15–28 (2012).

253. Faget, J. *et al.* ICOS is associated with poor prognosis in breast cancer as it promotes the amplification of immunosuppressive CD4(+) T cells by plasmacytoid dendritic cells. *Oncoimmunology* **2**, e23185 (2013).
254. Mo, L. *et al.* Depletion of regulatory T cells by anti-ICOS antibody enhances anti-tumor immunity of tumor cell vaccine in prostate cancer. *Vaccine* **35**, 5932–5938 (2017).
255. Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A. & Ribas, A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* **168**, 707–723 (2017).
256. Mestas, J. & Hughes, C. C. W. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J. Immunol.* **172**, 2731–2738 (2004).
257. Freitas, M. S. *et al.* Paracoccin Induces M1 Polarization of Macrophages via Interaction with TLR4. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).
258. Srivastava, R. M. *et al.* CD137 Stimulation Enhances Cetuximab-Induced Natural Killer: Dendritic Cell Priming of Antitumor T-Cell Immunity in Patients with Head and Neck Cancer. *Clin. Cancer Res.* **23**, 707–716 (2017).
259. Segal, N. H. *et al.* Results from an Integrated Safety Analysis of Urelumab, an Agonist Anti-CD137 Monoclonal Antibody. *Clin. Cancer Res.* **23**, 1929–1936 (2017).
260. Siska, P. J. *et al.* Deep exploration of the immune infiltrate and outcome prediction in testicular cancer by quantitative multiplexed immunohistochemistry and gene expression profiling. *Oncoimmunology* **6**, e1305535 (2017).
261. Lazzari, C. *et al.* Combination of immunotherapy with chemotherapy and radiotherapy in lung cancer: is this the beginning of the end for cancer? *Ther. Adv. Med. Oncol.* **10**, 1758835918762094 (2018).

262. Pfirschke, C. *et al.* Immunogenic Chemotherapy Sensitizes Tumors to Checkpoint Blockade Therapy. *Immunity* **44**, 343–354 (2016).
263. Becht, E. *et al.* Immune and Stromal Classification of Colorectal Cancer Is Associated with Molecular Subtypes and Relevant for Precision Immunotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **22**, 4057–4066 (2016).
264. Mosely, S. I. S. *et al.* Rational Selection of Syngeneic Preclinical Tumor Models for Immunotherapeutic Drug Discovery. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 29–41 (2017).
265. Overman, M. J. *et al.* Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **18**, 1182–1191 (2017).
266. Adams, S. *et al.* Abstract P2-11-06: Safety and clinical activity of atezolizumab (anti-PDL1) in combination with nab-paclitaxel in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* **76**, P2-11-06-P2-11-06 (2016).
267. Benavente, S. *et al.* Establishment and Characterization of a Model of Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Targeting Agents in Human Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* **15**, 1585–1592 (2009).
268. Garcia-Garcia, C. *et al.* Dual mTORC1/2 and HER2 blockade results in antitumor activity in preclinical models of breast cancer resistant to anti-HER2 therapy. *Clin. Cancer Res.* clincanres.2750.2011 (2012). doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2750
269. Dhupkar, P., Gordon, N., Stewart, J. & Kleinerman, E. S. Anti-PD-1 therapy redirects macrophages from an M2 to an M1 phenotype inducing regression of OS lung metastases. *Cancer Med.* **7**, 2654–2664 (2018).

270. Mediavilla-Varela, M., Page, M. M., Kreaehling, J., Antonia, S. J. & Altiock, S. Anti-PD1 treatment to induce M1 polarization of tumor infiltrating macrophages in a 3D ex vivo system of lung cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **35**, e23090–e23090 (2017).
271. Dyck, L. *et al.* Anti-PD-1 inhibits Foxp3<sup>+</sup> Treg cell conversion and unleashes intratumoural effector T cells thereby enhancing the efficacy of a cancer vaccine in a mouse model. *Cancer Immunol. Immunother. Cll* **65**, 1491–1498 (2016).
272. Franceschini, D. *et al.* PD-L1 negatively regulates CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J. Clin. Invest.* **119**, 551–564 (2009).
273. Ott, P. A., Hodi, F. S., Kaufman, H. L., Wigginton, J. M. & Wolchok, J. D. Combination immunotherapy: a road map. *J. Immunother. Cancer* **5**, 16 (2017).
274. Guo, Z. *et al.* Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *J. Transl. Med.* **11**, 215 (2013).
275. Haanen, J. B. A. G. Converting Cold into Hot Tumors by Combining Immunotherapies. *Cell* **170**, 1055–1056 (2017).
276. Herbst, R. S. *et al.* Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* **515**, 563–567 (2014).
277. Berra, S. P. & Notario, V. The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 258–271 (2013).
278. He, X., Cheng, R., Benyajati, S. & Ma, J. PEDF and its roles in physiological and pathological conditions: implication in diabetic and hypoxia-induced angiogenic diseases. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **128**, 805–823 (2015).

279. Goding, S. R. *et al.* Restoring Immune Function of Tumor-Specific CD4+ T Cells during Recurrence of Melanoma. *J. Immunol.* **190**, 4899–4909 (2013).
280. Wu, Q. J. *et al.* AAV-mediated human PEDF inhibits tumor growth and metastasis in murine colorectal peritoneal carcinomatosis model. *BMC Cancer* **12**, 129 (2012).
281. Cui, F.-Y. *et al.* The pigment epithelial-derived factor gene loaded in PLGA nanoparticles for therapy of colon carcinoma. *Oncol. Rep.* **24**, 661–668 (2010).
282. Ding, Q. *et al.* Ficolin-2 triggers antitumor effect by activating macrophages and CD8+ T cells. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **183**, 145–157 (2017).
283. Szala, A. *et al.* Ficolin-2 and ficolin-3 in women with malignant and benign ovarian tumours. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**, 1411–1419 (2013).
284. McElwee, J. L. *et al.* Identification of PADI2 as a potential breast cancer biomarker and therapeutic target. *BMC Cancer* **12**, 500 (2012).
285. Wang, H. *et al.* PADI2 gene confers susceptibility to breast cancer and plays tumorigenic role via ACSL4, BINC3 and CA9 signaling. *Cancer Cell Int.* **16**, 61 (2016).
286. Yilmaz, L. *et al.* Increased UGT1A3 and UGT1A7 expression is associated with pancreatic cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **16**, 1651–1655 (2015).