



**HAL**  
open science

# La Fractalkine (FKN) comme traitement des métastases osseuses de CNPC au sein d'une stratégie multimodale : une étude préclinique sur un modèle murin

Charlotte Cohen

## ► To cite this version:

Charlotte Cohen. La Fractalkine (FKN) comme traitement des métastases osseuses de CNPC au sein d'une stratégie multimodale : une étude préclinique sur un modèle murin. Médecine humaine et pathologie. Université Côte d'Azur, 2020. Français. NNT : 2020COAZ6030 . tel-03157404

**HAL Id: tel-03157404**

**<https://theses.hal.science/tel-03157404>**

Submitted on 3 Mar 2021

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

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

# THÈSE DE DOCTORAT

**La Fractalkine (FKN) comme traitement des métastases osseuses de CNPC au sein d'une stratégie multimodale : Une étude préclinique sur un modèle murin.**

**Charlotte COHEN**

IBV, Institut de Biologie Valrose, Equipe BIPOA (BioIngénierie et Physiopathologie OstéoArticulaire) UMR 7277 CNRS - UMR 1091 INSERM

**Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en** Sciences de la Vie et de la Santé **d'Université Côte d'Azur**

**Dirigée par :** Heidy Schmid-Antomarchi  
**Soutenue le :** 27 Novembre 2020

**Devant le jury, composé de :**  
Jérôme Mouroux, PUPH, CHU de Nice  
Heidy Schmid-Antomarchi, DR, UCA  
Aurélié Dutour, DR, Centre Léon Bérard  
Laurent Brouchet, PUPH, CHU de Toulouse  
Annie Schmid-Alliana, DR, UCA  
Nicolas Venissac, PUPH, CHRU de Lille

# **La Fractalkine (FKN) comme traitement des métastases osseuses de CNPC au sein d'une stratégie multimodale : Une étude préclinique sur un modèle murin.**

## **Président de Jury**

Pr Jérôme Mouroux,  
Centre Hospitalier Universitaire de Nice

## **Directrice de thèse**

Dr Heidy Schmid-Antomarchi  
IBV, Nice

## **Rapporteurs**

Pr Laurent Brouchet  
Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse

Dr Aurélie Dutour  
Centre Léon Bérard-Lyon

## **Examineurs**

Dr Annie Schmid-Alliana  
IBV, Nice

Pr Nicolas Venissac  
Centre Hospitalier Universitaire de Lille

# Résumé

## La Fractalkine (FKN) comme traitement des métastases osseuses de CNPC au sein d'une stratégie multimodale : Une étude préclinique sur un modèle murin.

Le cancer du poumon touche plus de 50 000 personnes par an en France. Au moment du diagnostic, 60% des patients présentent une maladie métastatique. Ces métastases siègent au niveau osseux dans 20 à 40% des cas et sont associées à une survie réduite (5 à 10% à 5 ans) et à une altération de la qualité de vie. L'identification de nouvelles thérapeutiques potentielles est nécessaire à l'amélioration du pronostic vital et fonctionnel de ces patients. Une chimiokine, la fractalkine (FKN), constitue une piste thérapeutique intéressante. Ayant un rôle dans le recrutement leucocytaire, ainsi que sur le métabolisme osseux, délivrée localement, elle pourrait permettre de restaurer une immunité anti-tumorale et agir sur l'ostéolyse. Son impact sur le développement tumoral est complexe et dépend de l'expression de son récepteur par les cellules tumorales, sa forme, la localisation des lésions, et du type de cancer.

Nous avons tout d'abord voulu déterminer l'impact de la FKN sur le développement de métastases osseuses de CNPC (cancer pulmonaire non à petites cellules) dans un modèle syngénique murin, utilisant des cellules LL2 exprimant soit un niveau faible (LL2-FKN<sub>lo</sub>), soit un niveau élevé de FKN (LL2-FKN<sub>hi</sub>).

La FKN avait un effet anti-tumoral, permettant une réduction du poids des tumeurs de 73% dans le groupe LL2-FKN<sub>hi</sub> comparé au groupe LL2-FKN<sub>lo</sub> à J14. L'expression élevée de FKN était associée à une augmentation du recrutement des monocytes inflammatoires, des cellules

Natural Killer (NK), et plus particulièrement des lymphocytes B (LB), constituant un microenvironnement immunopermisif. Elle était également associée à des modifications significatives du niveau d'expression de gènes impliqués dans l'ostéofonte et la régulation de l'immunité.

L'effet anti-tumoral de la FKN tendant à s'atténuer au cours du temps, et la proportion de lymphocytes T régulateurs (LTreg) FOXP3+ infiltrant le microenvironnement des tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub> étant supérieure à celle des tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub>, nous avons suspecté leur implication dans cette perte d'effet.

Nous avons testé des associations de traitements, capables de stimuler l'immunité anti-tumorale via le blocage de checkpoints immunitaires (Ac monoclonaux anti-CTLA4, anti-PD1, anti-PDL1, anti-TIM3), ou capables de bloquer l'activité des LTreg (cyclophosphamide, Ac anti-GITR), en association à une expression élevée de la FKN dans le but de renforcer et/ou prolonger son effet anti-tumoral.

A ce jour, les schémas d'administration que nous avons choisis n'ont pas permis d'obtenir un tel résultat. D'autres protocoles doivent encore être testés.

Ces travaux nous ont permis de montrer un effet anti-tumoral de la FKN dans un modèle murin de métastases osseuses de CNPC, d'en préciser les mécanismes sous-jacents et d'identifier de nouvelles pistes d'associations de traitements, prenant en compte le rôle anti-tumoral des LB et pro-tumoral des LTreg dans ce modèle murin.

**Mots Clés :** CX3CL1, cancer pulmonaire, métastases osseuses, microenvironnement tumoral, inhibiteurs de checkpoints immunitaires

## **Fractalkine as a treatment of bone metastasis of NSCLC within a multimodal strategy: preclinical study in mice.**

### **Summary**

In France, about 50 000 new cases of lung cancer are diagnosed every year. Sixty percent of them are already metastatic. Bone localizations are described in 20 to 40% of cases and they are associated with poor survival (5 to 10 % at 5 years) and impaired quality of life. New therapeutic options are mandatory to improve survival and functional prognosis.

A chemokine, the fractalkine (FKN), represents a promising one. It is known for its capacity of leukocytes recruitment and its impact on the bone metabolism. It could be able to restore anti-tumor immunity and to act on osteolysis, when delivered locally. The impact on tumor development is highly complex and depends on the expression of its receptor by tumor cells, its molecular form, the location of the lesion, and the tumor type.

We first planned to determine the impact of the FKN on the tumor development within a syngeneic murine model of bone metastasis of lung cancer, using either LL2 lung cancer cell line expressing a low (LL2-FKN<sub>lo</sub>) or a high level of FKN (LL2-FKN<sub>hi</sub>).

FKN had an anti-tumoral effect, able to reduce the tumor-weight by 73% in the LL2-FKN<sub>hi</sub> groups, compared to LL2-FKN<sub>lo</sub> one, at day 14. High level of expression of FKN was associated with an increase in the recruitment of inflammatory monocytes, natural killer

cells, and more specifically B lymphocytes (LB). Together, they formed an immunopermissive tumoral microenvironment. We also noted significant modification of expression level of genes involved in osteoformation and regulation of immunity.

The FKN anti-tumor effect tended to decrease after day 14. At the same time, we quoted a high level of infiltration of LL2-FKN<sub>hi</sub> tumors by T regulatory lymphocytes (LTreg). We suspected their implication in this loss of effect.

We tried therapeutic associations, able to stimulate anti-tumor immunity through immune checkpoint blockade (monoclonal antibody against CTLA4, PD1, PDL1, or TIM3) or to block LTreg (cyclophosphamide, anti-GITR antibody) in association with high FKN expression. The goal was to prolong and/or to reinforce its anti-tumoral effect.

To date, the used administration protocols weren't able to induce such an effect. Other protocols need to be tested.

This work highlighted an anti-tumoral effect of FKN in this murine model of bone metastasis of lung cancer and identified the underlying mechanisms. It pointed out new therapeutics associations options based on the anti-tumoral implication of LB, and pro-tumoral action of LTreg.

**Keywords:** CX3CL1, lung cancer, experimental bone metastases, tumor microenvironment, checkpoint inhibitor

# Remerciements

Professeur **Jérôme Mouroux**, merci de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Vous avez accompagné ce travail depuis le début en me libérant le temps nécessaire et en apportant des moyens matériels conséquents. Vous m'avez permis de mener à bien ce projet de recherche tout en me transmettant vos valeurs et vos techniques en pratique clinique. Je vous serai toujours reconnaissante, et j'espère à mon tour, pouvoir transmettre ce que vous m'avez appris.

Professeur **Laurent Brouchet** et Docteur **Aurélié Dutour**, je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse et d'en être les rapporteurs.

Docteur **Heidy Schmid-Antomarchi** et Docteur **Annie Schmid-Alliana**, merci pour tout. Je ne pouvais pas faire des remerciements en vous séparant ! Merci pour tout ce que vous m'avez apporté au cours de ces 6 années de travail ! Et ce n'est pas fini ! On a encore des choses à vérifier et tester ! Vous avez toujours su équilibrer bienveillance et exigence. Vous avez été d'un soutien indéfectible ! Votre humanité est exceptionnelle. J'espère me montrer digne de vous!

Professeur **Nicolas Venissac**, vous êtes à l'origine de ce projet. Merci de m'avoir présenté Annie et Heidy et de m'avoir permis d'initier ces travaux. Je vous dois cette thèse ainsi qu'une large part de ma formation clinique.

Docteur **Babou Karimdjee**, c'est toi qui a ouvert la voie des chirurgiens dans l'aventure de la fractalkine. Ça a été un honneur de suivre tes traces.

**Marie-Ange Millet**, qu'aurai-je fait sans toi ! Merci pour ton aide et pour ta patience ! Tu as beaucoup contribué à ce travail et tu m'as apporté toutes les bases techniques pour faire de bonnes manips.

**David Momier**, merci de m'avoir livré les secrets du labo, d'avoir toujours répondu à mes sollicitations, et d'avoir animé mes journées pipettes par de bonnes discussions.

**Emilie Goguet-Surmenian**, on ne se connaît pas vraiment, mais ta thèse a été ma bible et mon objet contra-phobique depuis le master 2....

**Julie Antomarchi**, c'était vraiment sympa de partager ces sessions de manip souris en joyeuse compagnie ! Je te serai toujours redevable de mon changement d'échelon ;)

**Rasha Al-Sahlanee**, tu es bien loin de nous maintenant, mais on a partagé plein de bons moments, tu as aussi beaucoup contribué à ce projet et j'ai vraiment aimé travailler avec toi !

**Imene Krossa**, on a fait une équipe de cytométrie en flux de choc ! Merci pour ce que tu as apporté à ce projet.

**Alexandre Rudel**, et **Pierre-Alexis Gauci**, ça a été un honneur de vous transmettre les techniques de chirurgie fémorale du rongeur.... Vous voyez, j'ai fini par l'écrire cette thèse ;)

**Damien Ambrosetti**, merci d'avoir regardé les petites pattes de souris au microscope, ton aide a été précieuse !

**Julien Cherfils**, merci pour ta patience, ta gentillesse et ton aide pour ces fameuses manips de cytométrie en flux !

**Jean-Claude Scimeca** et **Patricia Lagadec**, merci pour toutes ces discussions qui ont rythmé mes manips au labo !

Docteur **Daniel Pop**, merci pour la relecture de l'anglais et le soutien « logistique » à ce projet.

**Audrey Savaglios**, merci pour ta relecture attentive. Quelle classe d'avoir une amie professeure de Français correctrice officielle de thèse!

Merci à tout le personnel de **l'animalerie de Pasteur**, qui nous a aidé à prendre soin de nos animaux.

Merci à **tous les chercheurs que j'ai pu croiser**, notamment à la plateforme de qPCR. Vous avez tous eu la patience et la gentillesse de m'aider face à l'adversité de la recherche, aux pannes et aux difficultés techniques...

Merci aux associations et institutions qui ont contribué au fonctionnement du laboratoire pendant ma thèse et au financement de ce projet : le GOTHa (Groupe d'oncologie thoracique azuréen), l'UF 840 et le service de chirurgie thoracique du CHU de Nice, la clinique St Jean, la fondation Flavien, l'INSERM et le CNRS.



# Table des matières

<b>RESUME</b>	<b>3</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>10</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>12</b>
<b>A Le cancer pulmonaire</b>	<b>12</b>
a. Épidémiologie du cancer pulmonaire	12
b. Prise en charge des CNPC métastatiques en 2020	13
c. Prise en charge spécifique des métastases osseuses de CNPC en 2020	14
<b>B Cancer et immunité</b>	<b>15</b>
a. Définition du cancer et de son microenvironnement	15
b. Concepts d'immunosurveillance et d'immunoediting	18
c. Populations de cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement tumoral	20
<b>C Tissus osseux et métastases</b>	<b>29</b>
a. Le tissu osseux sain	29
b. Les métastases osseuses	35
<b>D Comment restaurer l'immunité anti-tumorale ?</b>	<b>37</b>
a. Les Chimiokines	37
i. Définitions et Généralités	37
ii. CX3CL1 ou Fractalkine	40
1. Propriétés	40
2. Fractalkine et cancer	42
b. Les Checkpoints Immunitaires	45
i. Définitions et généralités	45
ii. Principaux CPI ciblés en pratique clinique	47
<b>OBJECTIFS</b>	<b>50</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>51</b>
<b>A. CX3CL1 permet de contrôler le développement de métastases de cancer pulmonaire</b>	<b>51</b>
a. Résumé de l'article	51
b. Article original	53
<b>B. Résultats complémentaires</b>	<b>88</b>
a. Introduction	88
b. Matériels et Méthodes	89
c. Résultats	89
i. Analyse cinétique des tumeurs LL2-FKN <sub>hi</sub>	89
1. Effet anti-tumoral de la FKN au cours du temps	89
2. Infiltration des tumeurs LL2-FKN <sub>hi</sub> par les LTreg au cours du temps	90

ii.	Effet des traitements par des inhibiteurs de LTreg	90
iii.	Analyse du niveau d'expression des CPI dans les tumeurs LL2	93
iv.	Effet des traitements anti-CPI sur les tumeurs LL2-FKN <sub>io</sub> et LL2-FKN <sub>hi</sub>	94
1.	Effet des traitements anti-CPI en monothérapie	94
2.	Effet d'un traitement associant 2 Ac anti-CPI	96
3.	Effet d'un traitement anti-PD1 appliqué suivant un nouveau protocole	96
d.	Discussion	98
<b>DISCUSSION GENERALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION</b>		<b>102</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>		<b>105</b>

# Table des illustrations

<b>Figure 1</b> : Hallmarks du cancer.....	15
<b>Figure 2</b> : Les cellules du microenvironnement tumoral.....	17
<b>Figure 3</b> : Les 3 E de l'immunoediting du cancer.....	19
<b>Figure 4</b> : Le microenvironnement hétérogène du cancer pulmonaire.....	21
<b>Figure 5</b> : Mécanisme d'activation des LT.....	23
<b>Figure 6</b> : Les différents sous-types de LTh.....	24
<b>Figure 7</b> : Les Immunoglobulines (Ig), ou Anticorps (Ac).....	26
<b>Figure 8</b> : Les mécanismes immunosuppresseifs dans le microenvironnement tumoral.....	28
<b>Figure 9</b> : Différenciation de la lignée ostéoblastique.....	30
<b>Figure 10</b> : Différenciation de la lignée ostéoclastique .....	30
<b>Figure 11</b> : L'ostéoclaste mature.....	32
<b>Figure 12</b> : Étapes du remodelage osseux physiologique.....	34
<b>Figure 13</b> : Structure des 4 sous-groupes de chimiokines.....	39
<b>Figure 14</b> : La FKN et son récepteur.....	41
<b>Figure 15</b> : Activation des LT et cibles thérapeutiques.....	46
<b>Figure 16</b> : Analyse du développement des tumeurs LL2-FKN <sub>hi</sub> au cours du temps.....	89
<b>Figure 17</b> : Effet d'un traitement par cyclophosphamide sur les tumeurs LL2-FKN <sub>lo</sub> et LL2-FKN <sub>hi</sub> .....	91
<b>Figure 18</b> : Effet d'un traitement par des anticorps monoclonaux anti-GITR sur les tumeurs LL2-FKN <sub>lo</sub> et LL2-FKN <sub>hi</sub> .....	92
<b>Figure 19</b> : Schéma de traitement par les anticorps anti-CPI.....	94
<b>Figure 20</b> : Effet des traitements par des anticorps monoclonaux anti-CPI sur les tumeurs LL2- FKN <sub>lo</sub> et LL2-FKN <sub>hi</sub> .....	95
<b>Figure 21</b> : Effet d'un traitement associant les anticorps monoclonaux anti-PD1 et anti-CTLA4 sur les tumeurs LL2-FKN <sub>lo</sub> et LL2-FKN <sub>hi</sub> .....	96
<b>Figure 22</b> : Effet d'un nouveau protocole de traitement par des anti-PD1 sur les tumeurs LL2-FKN <sub>lo</sub> et LL2-FKN <sub>hi</sub> .....	97
<b>Tableau 1</b> : Hormones et facteurs impliqués dans les différentes phases du remodelage osseux physiologique.....	33
<b>Tableau 2</b> : Facteurs de régulation associés au développement de métastases osseuses.....	36
<b>Tableau 3</b> : Chimokines impliquées en cancérologie humaine.....	38
<b>Tableau 4</b> : Analyse comparative du niveau d'expression des CPI dans les tumeurs LL2-FKN <sub>hi</sub> et LL2-FKN <sub>lo</sub> .....	93

# Abréviations

**Ac** : anticorps

**ADCC** : cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac

**ADK** : adénocarcinome

**ADPC** : phagocytose cellulaire dépendante des Ac

**Ag** : antigène

**BMP** : Bone Morphogenesis Protein

**CAF** : cancer associated fibroblast

**CD** : cellules dendritiques

**CDC** : cytotoxicité dépendante du complément

**CE** : carcinome épidermoïde

**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité

**CNPC** : cancer pulmonaire non à petites cellules

**CPA** : cellule présentatrice d'Ag

**CPC** : cancer pulmonaire à petites cellules

**CPI** : checkpoint immunitaire

**CTLA4** : cytotoxic t-lymphocyte-associated protein 4

**CX3CL1** : fractalkine

**CX3CR1** : récepteur de la fractalkine

**EO** : Evènements osseux

**Fab** : fraction variable des Ig

**Fc** : fraction constante des Ig

**FKN** : fractalkine

**FOXP3** : forkhead box P3

**GITR** : glucocorticoïde-induced TNF receptor family-related protein

**IFN- $\gamma$**  : interferon gamma

**Ig** : Immunoglobuline

**IGF** : insuline growth factor

**IL**: interleukine

**KIR** : killer-cell immunoglobuline like receptors

**LAG3** : lymphocyte activation gene 3

**LB** : lymphocyte B

**LPS** : lipopolysaccharide

**LT CD4+** : lymphocyte T CD4+

**LT CD8+** : lymphocyte T CD8+

**LTreg** : lymphocyte T régulateur

**LTh** : lymphocyte T helper

**M-CSF** : macrophage colony stimulating factor

**MDSCs** : myeloid derived suppressive cells

**MMP** : matrix metallo protéases

**NCR** : natural cytotoxicity receptors

**NK** : natural killer

**NO** : oxyde nitrique

**OPG** : ostéoprotégérine

**PAL** : phosphatase alcaline

**PD1** : programmed death-1

**PDGF** : platelet derived growth factor

**PDL1** : programmed death ligand-1

**PDL2** : programmed death ligand-2

**PTH** : parathormone

**RANK** : Receptor Activator of NFkB

**RANK-ligand** : Receptor Activator of NFkB ligand

**Rc** : récepteur

**REGF** : récepteur à l'épithelial growth factor

**TAMs** : tumor associated macrophages

**TCR** : récepteur des cellules T

**TGF- $\beta$**  : transforming growth factor- $\beta$

**TILs** : tumor infiltrating leucocytes

**TIM3** : T-cell immunoglobulin and mucin containing protein 3

**TKI** : tyrosine kinase inhibiteur

**TNF- $\alpha$**  : tumor necrosis factor

**TRAIL** : tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand

**VEGF** : vascular endothelial growth factor

# Introduction

## A Le cancer pulmonaire

### a. Épidémiologie du cancer pulmonaire

En France, en 2018 (données GLOBOCAN 2018), le cancer du poumon touchait 47 133 nouveaux patients. Pendant cette même année, il était responsable de 37 459 décès.

Dans le monde, en 2018 (données GLOBOCAN 2018), le nombre de cas incidents de cancer du poumon était de 2 093 876, avec une mortalité de 1 761 007, le plaçant au premier rang des causes de décès par cancer, devant les cancers du côlon, de l'estomac, du foie et du sein.

Même si la lutte contre le tabac, son principal carcinogène identifié (*Le Cancer en France* Edition 2014), a permis de diminuer son incidence aux États-Unis et en Europe, celle-ci reste en augmentation dans tous les autres pays du monde (De Groot et al. 2018).

L'analyse de la base de données américaine SEER (<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>) nous révèle les données suivantes :

- 6,3% des hommes et des femmes développeront un cancer du poumon à un moment de leur vie.
- L'âge médian au diagnostic est de 70 ans
- Le taux de survie à 5 ans, tous stades confondus, est de 19,4%
- 57% des patients présentent au moins une métastase au moment du diagnostic de cancer pulmonaire
- Le taux de survie à 5 ans des patients ayant une atteinte métastatique est de 5,2%.

On distingue 2 grands types de cancers pulmonaires :

- les cancers pulmonaires à petites cellules (CPC) qui représentent 15% des diagnostics.
- les cancers pulmonaires non à petites cellules (CNPC) qui représentent 85% de

l'ensemble des cancers pulmonaires (Jemal et al. 2011).

Parmi les CNPC, il existe 2 types histologiques principaux : les adénocarcinomes (ADK) et les carcinomes épidermoïdes (CE).

Quel que soit le sous-type histologique, l'histoire naturelle du cancer du poumon est l'évolution vers un stade métastatique, et le site osseux est l'un des plus fréquents.

En effet, 20 à 40% des patients ayant un cancer pulmonaire tous stades confondus développeront des lésions osseuses au cours de leur maladie (Kuchuk et al. 2012). Chez 40 à 80% de ces patients, la maladie est métastatique à l'os dès le diagnostic. Les localisations osseuses sont multiples dans plus de 80% des cas, et touchent les vertèbres dans 40 à 50% des cas, les côtes dans 20 à 27% des cas, et le bassin dans 17 à 22% des cas. Le fait d'avoir des métastases en site osseux réduit significativement la médiane de survie des patients atteints de cancer pulmonaire, comparé aux autres localisations métastatiques possibles.

#### b. Prise en charge des CNPC métastatiques en 2020

Actuellement, la prise en charge du CNPC, en France, repose sur un arsenal thérapeutique élargi associant la chirurgie, la radiothérapie (conventionnelle et ciblée), la chimiothérapie conventionnelle (doublet associant un sel de platine et une molécule de 3ème génération), les anti-VEGF, les thérapies ciblées (Tyrosines Kinase Inhibiteur en cas de mutation de REGF, de translocation de ALK, de ROS 1, de BRAF ou de HER2) et les immunothérapies (Ac anti PD1- anti PDL-1 et anti- CTLA4).

Pour les CNPC métastatiques de type adénocarcinome, le traitement proposé est une thérapie ciblée en cas de mutations d'oncogènes (addiction oncogénique), une immunothérapie anti-PDL1 (pembrolizumab) associée à un doublet de sel de platine et molécule de 3ème génération quand l'expression de PDL1 est <50%, ou une monothérapie anti-PDL1, si PDL1 est exprimé par plus de 50% des cellules tumorales.

Pour les CNPC métastatiques de types carcinomes épidermoïdes : le traitement repose sur un doublet de chimiothérapie en cas de PDL1<50% ou une monothérapie par anti-PDL1 en cas de PDL1>50%.

Les taux de survie pour les stades métastatiques atteignent :

- 45,5% à 5 ans en cas d'ADK avec addiction oncogénique accessible à une thérapie ciblée (Mok et al. 2020).
- 45,5% à 2 ans pour les ADK traités par chimiothérapie et anti-PDL1 (Gadeel et al. 2020).
- 17,1% à 3 ans pour les lésions exprimant PDL1 à plus de 50% et traitées par anti-PDL1 (Vokes et al. 2018).
- 8,2% à 3 ans pour les tumeurs relevant d'un traitement par chimiothérapie conventionnelle (Vokes et al. 2018).

Malgré les évolutions récentes du traitement du cancer du poumon à un stade métastatique, il existe une marge de progression importante dans le traitement de cette maladie qui reste encore trop souvent et trop rapidement mortelle.

### c. Prise en charge spécifique des métastases osseuses de CNPC en 2020

L'invasion du tissu osseux par les cellules malignes compromet rapidement l'équilibre entre la synthèse/minéralisation de la matrice osseuse (assurée par les ostéoblastes) et la résorption osseuse (assurée par les ostéoclastes), induisant une hyper-résorption osseuse et facilitant ainsi le développement des métastases.

D'un point de vue clinique, cela se traduit par des douleurs osseuses, des fractures pathologiques, des compressions médullaires ou de racines nerveuses, des hypercalcémies malignes et à l'extrême, une insuffisance médullaire (Santini et al. 2015). Ces différents événements sont regroupés sous le terme d'Événements Osseux (EO).

La prise en charge de ces métastases osseuses repose sur le traitement systémique détaillé au point précédent, auquel peut s'ajouter un traitement spécifique à cette localisation :

- un traitement systémique par inhibiteurs de la résorption osseuse, en cas de localisations osseuses multiples, dans le but de prévenir les EO.
- la radiothérapie palliative, dans un but de décompression ou d'antalgie.
- la chirurgie de décompression en cas de risque neurologique élevé.
- la chirurgie de stabilisation en cas de fracture pathologique.
- le recours aux techniques ablatives et de cimentoplasties en radiologie interventionnelle.

Les traitements inhibiteurs de la résorption osseuse actuellement disponibles en pratique sont les suivants :

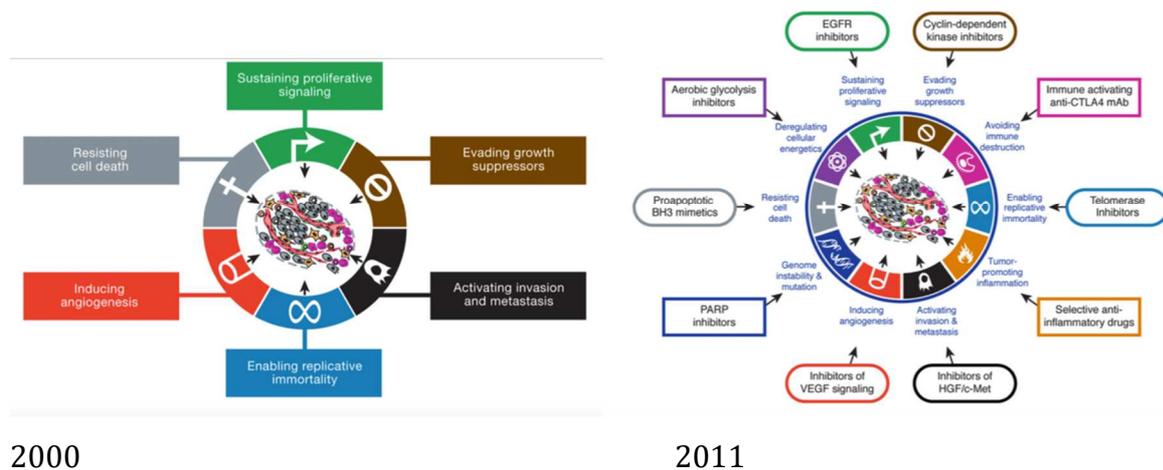
- les biphosphonates (acide zolédronique) (Lopez-Olivo et al. 2012),
- les anticorps monoclonaux anti-RANK-ligand (déno-sumab) (Henry et al. 2011).

Malgré les progrès de la radiologie interventionnelle, de la chirurgie, de la radiothérapie et des nouvelles chimiothérapies, les métastases osseuses conservent à la fois un très mauvais pronostic (médiane de survie entre 7 et 15 mois) et un impact majeur sur la qualité de vie des patients, incitant de fait la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques, notamment celles basées sur l'immunité anti-tumorale.

## B Cancer et immunité

### a. Définition du cancer et de son microenvironnement

Depuis les travaux de synthèse de Hanahan et Weinberg en 2000 et 2011 qui ont décrit les « hallmarks » du cancer (Hanahan et Weinberg 2000 ; Hanahan et Weinberg 2011), le cancer n'est plus uniquement considéré comme une maladie de la cellule tumorale.



**Figure 1 : Hallmarks du cancer.** Ces 2 schémas présentent les caractéristiques distinctives des cellules de cancers reconnues en 2000 (panneau gauche), et révisées en 2011 (panneau droit). Les cibles thérapeutiques que représentent ces caractéristiques sont soulignées dans la version de 2011 ainsi que les thérapeutiques en cours de développement.

Adapté de Hanahan, D. and Weinberg R.A. *The hallmarks of cancer.* Cell 2000 : 100, 57–70 ; et Hanahan D and Weinberg R. *Hallmarks of cancer. The next generation.* Cell 2011 ; 144 : 646-674.

Il s'agit bien d'une **pathologie d'origine génétique**, qui résulte d'activations d'oncogènes, d'inactivations de gènes suppresseurs de tumeurs, du fait de la survenue de mutations lors des divisions cellulaires successives, et d'altérations épigénétiques.

Dès lors, la cellule tumorale acquiert 6 propriétés (**Fig. 1/ 2000**):

- l'activation constitutionnelle des voies de signalisation de la prolifération cellulaire,
- la résistance à l'apoptose et aux mécanismes de mort cellulaire,
- l'échappement aux mécanismes de régulation de la prolifération cellulaire,
- l'immortalité (réplication illimitée, pas de sénescence),
- les capacités d'invasion et métastases,
- et l'induction d'une néo-angiogenèse.

L'accumulation de mutations somatiques est d'ailleurs un paramètre étudié, permettant de définir une tumeur en fonction de son instabilité génétique (genetic instability) et donc de la quantité de mutations retrouvées au sein des cellules tumorales (tumor mutational burden = nombre de mutations somatiques par mégabase d'ADN).

Mais ces altérations génétiques ne sont pas suffisantes au développement d'un cancer. La cellule tumorale doit également être capable **d'échapper à la destruction par les cellules immunitaires** tout en induisant un profil inflammatoire favorable à son développement. Plus le nombre de mutations est élevé dans les cellules tumorales, plus la tumeur est considérée comme potentiellement immunogène, par l'expression de néo-Antigènes (Ag) résultants de l'expression de ces mutations accumulées. Mais les cellules tumorales ont également développé des mécanismes d'échappement à la vigilance du système immunitaire. Les mécanismes les plus fréquemment décrits dans la littérature sont les suivants (Beatty et Gladney 2015 ; Mellman et al. 2011) :

- La sélection des clones tumoraux les moins immunogènes par la perte de l'expression ou la mutation des Ag tumoraux, ou par la perturbation des mécanismes de présentation Ag (diminution de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) I, blocage de la maturation des cellules dendritiques (CD), blocage du CMH, diminution de l'expression des facteurs de co-activation...)
- La résistance à la lyse cellulaire induite par les lymphocytes T (LT) cytotoxiques.
- Le développement d'un environnement immunosuppresseur par le recrutement de lymphocytes immunosuppresseurs (LTreg, MDSCs, macrophages M2...) , la production de cytokines pro-tumorales, et immunosuppressives (VEGF, IL10, adénosine, prostaglandine E2, TGF $\beta$ ...).
- L'induction d'un épuisement ou d'une anergie des LT cytotoxiques, par l'expression de checkpoint immunitaires (CPI) inhibiteurs.

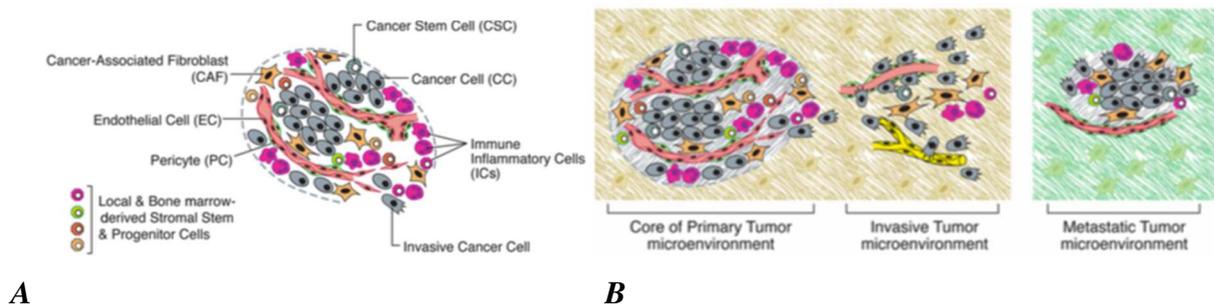
Enfin la cellule tumorale doit également être **capable de modifier son métabolisme** afin de pouvoir permettre une prolifération et une croissance cellulaire permanente (*Fig. 1/2011*).

C'est donc le comportement de la cellule tumorale au sein de son microenvironnement, qui permet ou non le développement d'une tumeur et d'une métastase.

Le corollaire de ces découvertes est que la prise en charge du cancer n'est plus seulement centrée sur la destruction directe de la cellule cancéreuse (chimiothérapie, chirurgie, radiothérapie), mais sur le traitement de la cellule tumorale au sein de son microenvironnement (**Fig. 2 A**), en ciblant tous les acteurs possibles :

- Les cellules tumorales, avec différentes populations clonales, et donc une hétérogénéité certaine.
- Les cellules endothéliales des néo-vaisseaux associés aux tumeurs, les péricytes, les fibroblastes associés aux tumeurs (CAF)...
- Les cellules immunitaires
- Le métabolisme cellulaire
- Les éléments permettant les interactions entre ces différents constituants, dont les chimiokines et les CPI.

La composition de ce microenvironnement tumoral, ainsi que le comportement des éléments qui le composent sont dynamiques, et évoluent au cours du temps et du développement des lésions (**Fig. 2 B**).



**Figure 2 : Les cellules du microenvironnement tumoral.**

**A** : les tumeurs solides sont constituées de différentes cellules : celles du parenchyme et celles du stroma, qui participent ensemble à la croissance et à la progression de la tumeur.

**B** : les différents microenvironnements tumoraux. L'abondance, l'organisation histologique, les caractéristiques phénotypiques des types de cellules stromales, ainsi que de la matrice extracellulaire, évoluent pendant la progression tumorale, permettant la croissance de la tumeur primaire, l'invasion des tissus adjacents puis la croissance métastatique. Les cellules saines de l'organe atteint, affectent aussi les caractéristiques des différents microenvironnements néoplasiques, qui sont évolutifs.

Adapté de Hanahan D and Weinberg R. Hallmarks of cancer. The next generation. Cell 2011 ; 144 : 646-674.

Ce dynamisme tumoral associé à la complexité et la diversité des mécanismes impliqués dans le développement tumoral, plaident pour l'utilisation de traitements combinés, ciblant différentes caractéristiques du cancer.

Les traitements développés afin de restaurer l'immunité anti-tumorale doivent être adaptés à une analyse personnalisée des mécanismes d'échappement d'une tumeur donnée dans un environnement donné (place des éléments théragnostiques individuels). La connaissance du principe d'immunosurveillance, et de la composition et des propriétés des cellules immunitaires en contexte tumoral est un prérequis essentiel au développement de ces stratégies thérapeutiques.

#### b. Concepts d'immunosurveillance et d'immunoediting

Les interrelations entre l'immunité et le développement tumoral ont intéressé les chercheurs très précocement. Le concept d'immunosurveillance a été envisagé dès 1909, quand Paul Ehrlich a formulé l'hypothèse que les systèmes de défense de l'hôte pouvaient prévenir le développement de tumeurs (Ehrlich 1909).

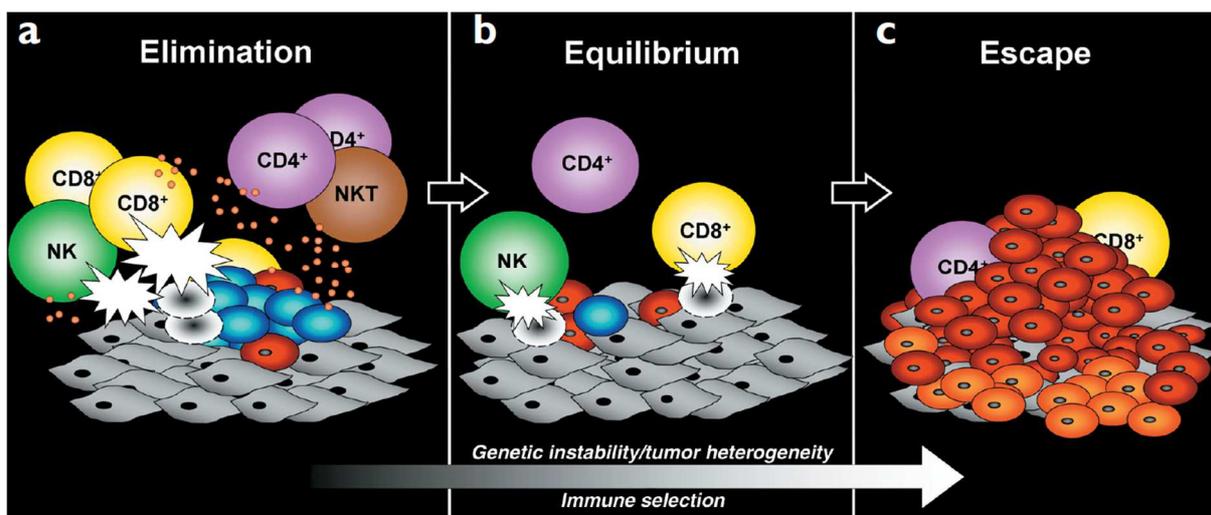
Le concept ne s'est vraiment développé que dans les années 1950, avec les travaux de Lewis Thomas (Thomas 1959) puis de Mac Farlan Burnett (Burnett 1970) qui définissent l'immunosurveillance comme l'ensemble des mécanismes impliquant l'identification et la destruction des cellules tumorales par le système immunitaire (Kuby 2013). Ce sont notamment, les altérations génétiques et épigénétiques qui caractérisent les cellules tumorales, qui sont responsables de l'expression de multiples Ag spécifiques de la cellule tumorale, signature du non soi, et donc capables d'induire une réponse immunitaire (Boon et al.1996). Ce premier concept permettait de fournir une explication au développement plus fréquent des cancers chez les patients immunodéficients, mais ne permettait pas de comprendre comment un cancer pouvait se développer chez les sujets immunocompétents.

Un peu plus tard, dans les années 2000, Dunn et Schreiber (Dunn et al. 2002) ont développé le concept dynamique d'immunoediting. Ce concept, découpé en 3 phases (**Fig.3**) permettait la prise de conscience de la pression de sélection exercée par le système immunitaire sur les différents clones de cellules tumorales, conduisant à favoriser la multiplication des clones les moins immunogènes et donc le développement d'un cancer chez des patients immunocompétents par ailleurs. C'était l'évolution du concept simple d'immunosurveillance vers celui d'immunoediting défini comme l'ensemble des processus pro-tumoraux, et anti-tumoraux médiés par le système immunitaire (Kuby 2013).

Pendant la première phase, ou **phase d'élimination**, qui recoupe le concept d'immunosurveillance, le système immunitaire identifie les cellules tumorales comme des éléments étrangers et les détruit efficacement via les cellules Natural Killers (NK), et les LT CD4+ et les LT CD8+.

Au cours de la seconde phase, ou **phase d'équilibre**, les cellules tumorales se développent et se multiplient. Le système immunitaire est encore efficace et capable de contrer le développement d'une tumeur. C'est pendant cette phase que la pression de sélection du système immunitaire est maximale : les clones tumoraux les plus immunogènes sont détruits, et seuls les clones tumoraux les plus « discrets immunologiquement » peuvent survivre puis se développer. Cette sélection des cellules tumorales les moins immunogènes favorise le passage à la phase 3.

La troisième phase, ou **phase d'échappement**, correspond au moment où le système immunitaire n'est plus capable de détecter et/ou détruire les cellules tumorales ainsi sélectionnées, et la tumeur devient cliniquement détectable.



**Figure 3 : Les 3 E de l'immunoediting du cancer.**

3 phases sont décrites pour ce processus :

a/ La phase d'Élimination, qui correspond à l'immunosurveillance.

b/ La phase d'Équilibre qui constitue le processus par lequel le système immunitaire sélectionne de manière itérative les générations de cellules tumorales ayant des capacités accrues de résistance au système immunitaire.

c/ La phase d'Échappement pendant laquelle la tumeur sculptée immunologiquement croît de manière incontrôlée chez l'hôte immunocompétent.

En bleu : les cellules tumorales de première génération. En rouge : les variants de cellules tumorales. En gris : les cellules stromales non transformées. En orange : une nouvelle génération de variants de cellules tumorales. Les petits disques orange représentent les cytokines, et les éclairs blancs l'activité cytotoxique des lymphocytes contre les cellules tumorales.

Adapté de Dunn G, Bruce A, Ikeda H et al. Cancer immunoediting : from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol. 2002 ;3 :991-8.

La connaissance de la composition en cellules immunitaires du microenvironnement tumoral, ainsi que de leur comportement respectif est indispensable à la compréhension de l'évolution d'une phase à l'autre, dans l'objectif final de restaurer une immunité anti-tumorale dans un but thérapeutique. L'objectif des immunothérapies anti-tumorales est l'inversion du concept d'immunoediting : revenir d'une situation d'échappement à une situation d'élimination.

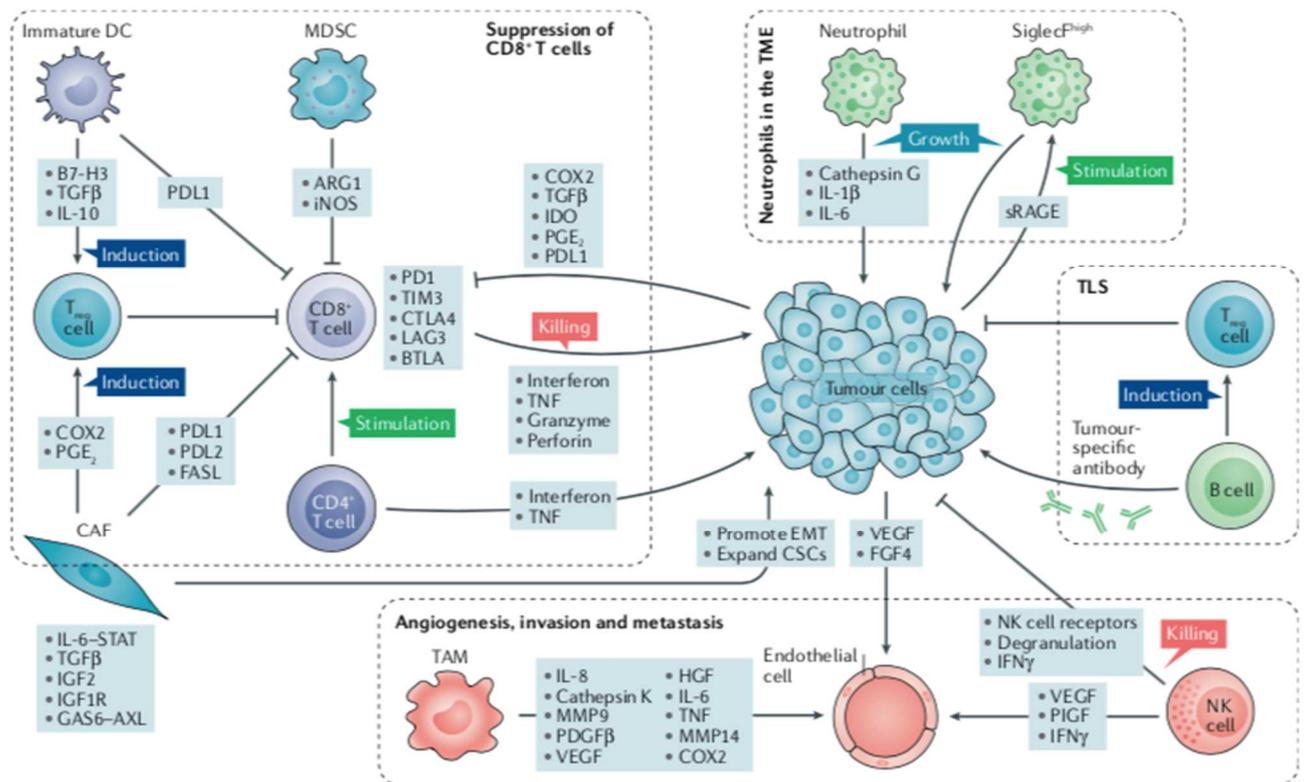
c. Populations de cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement tumoral

Comme nous venons de le voir, les cellules immunitaires ont un rôle majeur dans le développement des tumeurs et des métastases. Des travaux récents ont prouvé que la composition du microenvironnement immunitaire est corrélée à la survie des patients, notamment dans le contexte du CNPC (Tamminga et al. 2020). En plus de l'impact pronostique de l'analyse de la composition du microenvironnement immunitaire tumoral, l'émergence des immunothérapies en pratique clinique a conduit à une analyse extensive du rôle et du comportement de chaque population cellulaire immunitaire dans le développement tumoral, notamment dans un but théranostique (Hendry et al. 2017).

Nous allons évoquer les rôles connus de ces cellules dans le contexte du cancer pulmonaire (Altorki et al. 2019), sachant qu'un même type cellulaire peut avoir un profil d'action différent au cours des étapes du développement des tumeurs et des métastases.

Le rôle des cellules immunitaires est conditionné par les autres éléments du microenvironnement tumoral, et réciproquement.

Les interactions sont multiples : entre les cellules immunitaires elles-mêmes, entre les cellules immunitaires et les autres cellules du microenvironnement (cellules tumorales, cellules stromales, fibroblastes...). Ces interactions peuvent se faire directement par des mécanismes de ligands/récepteurs membranaires présents à la surface de ces différentes cellules, mais aussi via les cytokines et les facteurs de croissance qu'elles sécrètent et reçoivent (**Fig. 4**).



**Figure 4 : Le microenvironnement hétérogène du cancer pulmonaire.**

Le microenvironnement du cancer pulmonaire (TME) contient une variété de cellules stromales reprogrammées par la tumeur. Un élément principal de l'immunosuppression dans le TME est l'inactivation des lymphocytes cytotoxiques CD8+ par différents biais. Les cellules dendritiques (CDs) immatures produisent du TGFβ, qui promeut l'expansion des populations cellulaires immunosuppressives telles que les LTreg FOXP3+, qui à leur tour inhibent les LT CD8+. Les CDs expriment PDL1 (ligand 1 du récepteur de mort cellulaire PD1), un CPI qui inhibe directement l'activation des LT CD8+. Les MDSCs (myeloid derived suppressor cells) expriment l'arginase 1 (ARG1) et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), qui contribuent à l'inhibition des LT. Les fibroblastes associés aux tumeurs (CAF) peuvent également inhiber l'action des LT CD8+ en stimulant les LTreg ou en exprimant PDL1, PDL2 et FASL. De plus les cellules tumorales peuvent directement produire des molécules inhibitrices telles que la cyclooxygénase 2 (COX-2), la prostaglandine E2 (PGE2), l'indolamine 2,3-dioxygénase (IDO), et PDL1 qui peuvent bloquer l'activité des LT CD8+. Les neutrophiles sécrètent de multiples cytokines qui influent sur la progression tumorale (interleukine 1-B (IL-1b), IL6). La tumeur sécrète des récepteurs solubles pour les produits de glycation avancée (sRAGE), qui induisent via une activation systémique des ostéoblastes de la moelle osseuse, un recrutement des neutrophiles SiglecF<sup>hi</sup> dans la tumeur lesquels vont favoriser la croissance tumorale par stimulation de la néo-angiogenèse, la différenciation des cellules myéloïdes, la suppression des LT et la prolifération des cellules tumorales. Les cellules endothéliales répondent au VEGF produit par les cellules tumorales, les NK, les TAMs (Tumor associated macrophages), pour induire une néo-angiogenèse. Les TAMs produisent l'IL6, COX-2, et les metalloprotéases MMP-9 et MMP-14 qui favorisent l'invasion et les métastases. Les NK induisent une immunosuppression par la down-régulation des NK-Rc, la diminution de leur potentiel de dégranulation, et la moindre production d'IFN-g. Les LB, dans les structures lymphoïdes tertiaires, peuvent soit produire des Ac tumeur-spécifiques, ou induire les LTreg.

Adaptée de Altorki N, Markowitz G, Gao D et al. The lung microenvironment : an important regulator of tumor growth and metastasis. Nat Rev Cancer 2019 ; 9-28.

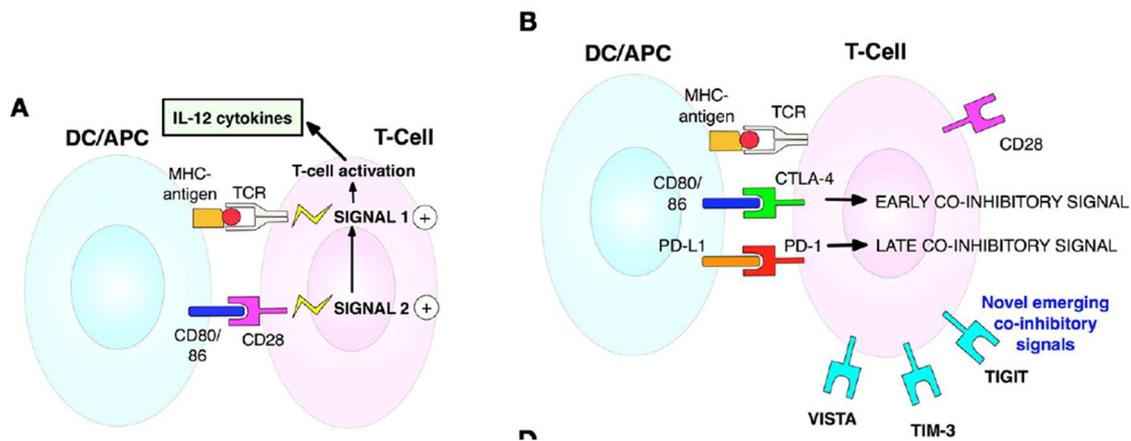
Pour décrire ces populations cellulaires, nous allons commencer par définir les structures lymphoïdes tertiaires (SLT), leur présence au sein des tumeurs pulmonaires étant associée à un meilleur pronostic (Remark et al. 2015). Les SLT sont des agrégats lymphocytaires constitués d'une zone riche en LT et d'une zone contenant les lymphocytes B (LB) formant un centre germinatif analogue à ceux présents au sein des organes lymphoïdes secondaires. Ce sont des lieux de génération de réponses immunitaires anti-tumorales où des CD<sub>s</sub> matures présentent des Ag aux LT et où des cellules folliculaires présentent des Ag aux LB, aboutissant respectivement à la maturation des LT effecteurs et mémoires, et à la différenciation des LB en plasmocytes producteurs d'Ac et en LB mémoires (Dieu-Nosjean et al. 2016). C'est un élément majeur du microenvironnement tumoral immunopermisif.

Les Cellules dendritiques (CD) (Upham et Xi 2017), en conditions physiologiques, sont responsables de la présentation des Ag tumoraux aux LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, au sein des ganglions lymphatiques ou des structures lymphoïdes tertiaires (Goc et al. 2014). A l'état immature, les CD jouent le rôle de sentinelles dans les tissus périphériques, où elles captent les Ag. Elles deviennent alors matures et migrent vers les ganglions ou les structures lymphoïdes tertiaires où elles vont présenter cet Ag aux LT et activer leur réponse. Elles ont la capacité d'orienter cette réponse vers différents profils immunitaires via les cytokines qu'elles sécrètent (ex : profils Th1 ou Th2 pour les CD4<sup>+</sup> helper). Elles ont également un rôle dans la sélection des LB. En contexte tumoral, elles peuvent avoir un effet immunosuppresseur par l'expression de molécules co-inhibitrices de la réponse T appelées checkpoints immunitaires (CPI) inhibiteurs, ou la production de TGFβ capable d'induire la différenciation des LT CD4 en LTreg FOXP3<sup>+</sup>.

Les TIL (tumor infiltrating lymphocytes) sont représentés à la fois par les LT et les LB infiltrant les tumeurs (Bremmes et al. 2016). Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> sont les éléments principaux de la réponse immunitaire anti-tumorale. Localisés dans les organes lymphoïdes secondaires ou tertiaires, ils reconnaissent les Ag tumoraux présentés par les cellules présentatrices d'Ag via le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). Alors activés, ils peuvent se différencier en T mémoire (CD4 ou CD8) ou en T effecteur (CD4 helper ou CD8 cytotoxique) (**Fig. 5**).

Ils sont la cible privilégiée de la recherche sur l'immunothérapie anti-cancer du fait de :

- leur activation sélective par la reconnaissance d'un Ag tumoral
- leur capacité de cytotoxicité directe des cellules tumorales ainsi identifiées (LT effecteurs, cytotoxiques CD8<sup>+</sup>)
- leur capacité à orchestrer l'ensemble de la réaction inflammatoire, tant innée qu'adaptative (LT helper CD4<sup>+</sup>).



**Figure 5 : Mécanisme d'activation des LT :**

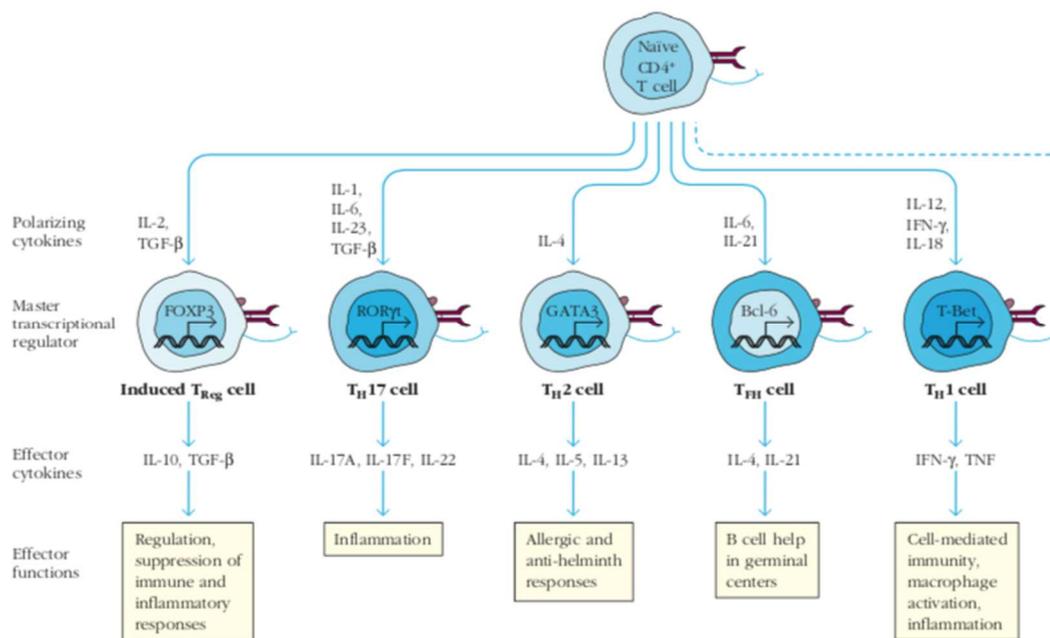
**A.** La sélection clonale des LT spécifiques d'un antigène se fait dans les organes lymphoïdes secondaires ou tertiaires, via la présentation d'Ag par les cellules présentatrices d'Ag (CPA). Leur activation nécessite également l'expression d'un co-signal activateur par la CPA : CD80/86 qui active le Rc CD28 à la surface du LT.

**B.** L'activation du LT est également régulée par l'expression des CPI inhibiteurs et activateurs (CTLA-4, CD80/86, PD1, PDL1, TIM3, TIGIT, VISTA...). Ainsi activés, et après avoir proliféré au sein des organes lymphoïdes, les LT vont migrer sur le site de l'inflammation où ils vont exercer une action cytotoxique directe sur les cellules tumorales (LT cytotoxiques CD8+), et également réguler l'ensemble de la réaction inflammatoire (LT helper).

Adapté de Marshall H, Djamgoz M. *Immuno-Oncology : Emerging Targets and Combination therapies*. *Front Oncol* 2018 ;8 :315.

Il existe une grande diversité de sous-types de LT helper (LTh). Orientés vers un profil ou un autre en fonction de l'environnement cytokinique au moment de l'activation des LT CD4+ (cytokines dites polarisantes), ils sont définis par leur profil cytokinique (cytokines dites effectrices) (**Fig. 6**):

- Les LTh1 sécrètent l' IL-2, l'IFN $\gamma$ , le TNF  $\beta$ , activant les LT cytotoxiques, et les macrophages et favorisant la réponse anti-tumorale.
- Les LTh2 sécrètent l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-9, l'IL-10 et l'IL-13, régulent l'activation et la différenciation des LB, et induisent une réponse inflammatoire plutôt favorable au développement tumoral.
- Les LTreg (CD4+, CD25+, FOXP3+) sont les LTh les plus impliqués dans l'immunosuppression tumorale. Leur rôle, en conditions physiologiques, est de maintenir un équilibre dans la réponse immunitaire et d'éviter l'auto-immunité. En contexte tumoral, ils sont capables d'induire la suppression des LT CD8+, des NK, des LB et des CPA, tout en majorant l'infiltration par les TAMs et les MDSCs.
- Les LTh17, eux sont encore en cours d'étude, mais semblent impliqués dans la médiation de l'immunité cellulaire.



**Figure 6 : Les différents sous-types de LTh.**

Les cytokines polarisantes, les facteurs de transcription, les cytokines effectrices et les fonctions principales en physiologie et en pathologie sont ici décrites pour chacun des sous-types principaux de LTh.

Adapté de Kuby Immunology seventh edition. North American Edition. New York 2013.

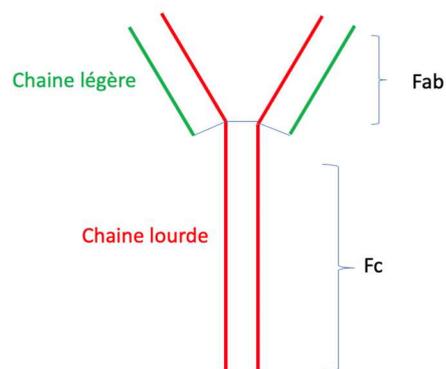
En contexte tumoral, les fonctions des TILs sont donc modulées par les éléments du microenvironnement tumoral. Les LT CD8<sup>+</sup> sont le plus souvent bloqués conduisant à leur anergie ou épuisement, et les LTh orientés vers un profil pro-tumoral ou immunosuppresseur, particulièrement LTreg. Cette reprogrammation des LT par le microenvironnement tumoral est une des cibles principales des traitements d'immunothérapie en cours de développement, dans l'objectif de restaurer une immunité anti-tumorale efficace.

Aux côtés de ces LT, qui participent à l'immunité cellulaire anti-tumorale, les Lymphocytes B (LB), eux, sont les acteurs principaux de l'immunité humorale de par leur capacité à produire des immunoglobulines (Ig). Lors de la première rencontre avec un Ag, au sein des organes lymphoïdes secondaires ou tertiaires, les LB naïfs, vont se transformer en cellules B activées et se différencier en plasmocytes producteurs d'anticorps (Ac) ou en LB mémoires. Le rôle des LB dans l'immunité tumorale est encore en cours d'investigation et sujet à controverse (Kaplon et Dieu-Nosjean 2018). Ils ont 2 modalités d'action : une médiée par leur capacité à produire des Ac spécifiques, et une indépendante de ces Ig.

Plusieurs publications montrent qu'une forte proportion de LB au sein des tumeurs solides a un impact pronostique positif, notamment pour le cancer pulmonaire (Germain et al. 2014 ; Hu et al. 2019). Cet effet anti-tumoral repose sur plusieurs mécanismes. Les plasmocytes, produisant

des Ig (**Fig.7**), peuvent induire la lyse des cellules tumorales suivant l'activation de 3 processus moléculaires distincts. On décrit la cytotoxicité dépendante du complément (CDC), la cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC) et la phagocytose cellulaire dépendante des Ac (ADPC). Les processus d'ADCC et l'ADPC nécessitent la participation d'effecteurs cellulaires porteurs du Rc à la fraction constante (Fc) des Ig (FcγRs), que sont les macrophages, les NK et les mastocytes. Ces cellules, une fois activées par la liaison de la Fc des Ig sur leurs récepteurs FcγR peuvent alors induire la destruction des cellules tumorales selon 2 modalités. La lyse cellulaire par cytotoxicité via la libération de perforine et de granzyme contenus dans des granules lytiques de ces granulocytes semble le processus principalement impliqué au début de la réaction inflammatoire. Dans un second temps, la fixation des Ig sur les Rc FcγR de ces granulocytes, induit l'expression des ligands TRAIL et/ou de Fas à leur surface, déclenchant un processus d'apoptose des cellules tumorales après liaison à leurs récepteurs de mort cellulaire (Hassin et al. 2011; Li et al .2014 ; Prager 2019). Toutefois, des mécanismes de compétition entre les différentes classes d'Ig produites par les LB, notamment entre les IgG4 et les IgG1 aux propriétés effectrices plus puissantes, limitent le processus d'ADCC, et l'activation de la voie classique du complément (Karagiannis et al. 2013), réduisant, de fait, le potentiel anti-tumoral des LB associés aux anticorps.

Les LB peuvent contribuer par ailleurs à l'immunité anti-tumorale par d'autres mécanismes indépendants des anticorps. En effet, avec les cellules dendritiques et les macrophages, les LB sont les seuls types cellulaires considérés comme cellules présentatrices d'antigènes « professionnelles », car exprimant à la fois à leur surface le CMH et les signaux d'activation CD28/CD80/CD86. La présentation antigénique par les LB est donc particulièrement efficace, et majore ainsi l'action des LT effecteurs. Par ailleurs, de par leur profil de production cytokinique, les LB constituent une population hétérogène composée de sous-populations fonctionnellement distinctes qui contribuent à la fois aux réponses immunitaires pro- et anti-tumorales. L'équilibre entre ces sous-populations, résultant de processus dynamiques de conversion des LB, est régulé par le microenvironnement tumoral (Lund 2008). Le profil de sécrétion des cytokines permet une subdivision des LB en trois sous-groupes : les LBe1 (B effector-1) sécrétant des cytokines (IFN-γ, IL-12, TNF-α) impliquées dans la polarisation Th1 de LTh, les LBe2 (*B effector-2*) sécrétant des cytokines (IL-2, IL-4, TNF-α, IL-6) impliquées dans les réponses Th2, et les LBreg (B régulateurs) sécrétant des cytokines immunosuppressives (Lund 2008). Si les LBe1 participent à la réponse anti-tumorale, en revanche les LBreg sont impliqués dans les effets pro-tumoraux (Mizoguchi et al. 2000).



**Figure 7 : Les Immunoglobulines (Ig), ou Anticorps (Ac).**

On distingue 5 formes distinctes d'Ig : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM. Bien que les différentes Ig puissent présenter des variations structurales, elles sont toutes construites sur la même unité de base constituée de 4 chaînes polypeptidiques (2 chaînes légères identiques et 2 chaînes lourdes identiques) maintenues ensemble par des ponts disulfures inter- et intra-chaînes ainsi que par des liaisons non-covalentes. Sur la base de la variabilité des séquences, les chaînes légères et les chaînes lourdes peuvent être subdivisées en 2 régions, variable et constante. Chaque forme présente des propriétés uniques déterminées par la région constante des Ig. La digestion des Ig par la papaïne conduit à la libération de 2 fragments identiques nommés Fab (pour antigen binding fragment) et un fragment constant Fc. Les fragments Fab se lient aux Ag spécifiques, et le fragment Fc, porteur de la fonction effectrice de l'Ac, peut interagir avec la cascade du complément, et les R<sub>c</sub> à la Fc (FcγRs). Les IgG sont la classe la plus utilisée en cancérologie.

En plus de ces 3 populations cellulaires, pouvant contribuer à la constitution de ces SLT au sein de la tumeur, et à l'immunité anti-tumorale, d'autres cellules immunitaires sont présentes dans le microenvironnement tumoral (Terme et Tanchot 2017).

Les MDSCs (pour myeloïd-derived suppressor cells) constituent une population hétérogène de progéniteurs myéloïdes immatures de type granulocyte/neutrophile (G-MDSC) ou de type monocyte (M-MDSC). Elles ont un rôle essentiel dans la tolérance immunitaire, au même titre que les LTreg. En effet, elles sont capables (Ma et al. 2018 ; Kolahian et al. 2016) d'inhiber la prolifération des LT (via la production de Arg-1, de NO et de ROS) et d'induire le développement des LTreg contribuant à la constitution d'un environnement immunosuppresseur.

Les TAMs (pour tumor-associated macrophages) ont un rôle ambivalent au sein de la tumeur selon le phénotype prédominant. Les chimiokines ont un rôle particulier dans la polarisation des macrophages tumoraux. Sous l'influence du TNF $\alpha$ , de l'IFN- $\gamma$ , et du LPS, ils sont orientés vers un *phénotype M1*. Ils sont dits activés (production d'IL12 et IL23), pro-inflammatoires (haut niveau de présentation antigénique, production de chimiokines favorisant

la réponse Th1), avec une action anti-tumorale (cytotoxicité dirigée contre les cellules tumorales et nécrose).

Sous l'influence de l'IL4, ils sont orientés vers un *phénotype M2*. Ils sont dits en état d'activation alternative, ont une faible production d'IL12, et ont une action immunosuppressive (production de cytokines Th2 : IL6, IL10, TGF- $\beta$ , expression de CPI inhibiteurs tels que CTLA 4 et PDL1) et pro-tumorale par favorisation de la néo-angiogenèse (production de VEGF). Le profil M2 est le profil prédominant dans le microenvironnement du cancer (Noy et Pollard 2014).

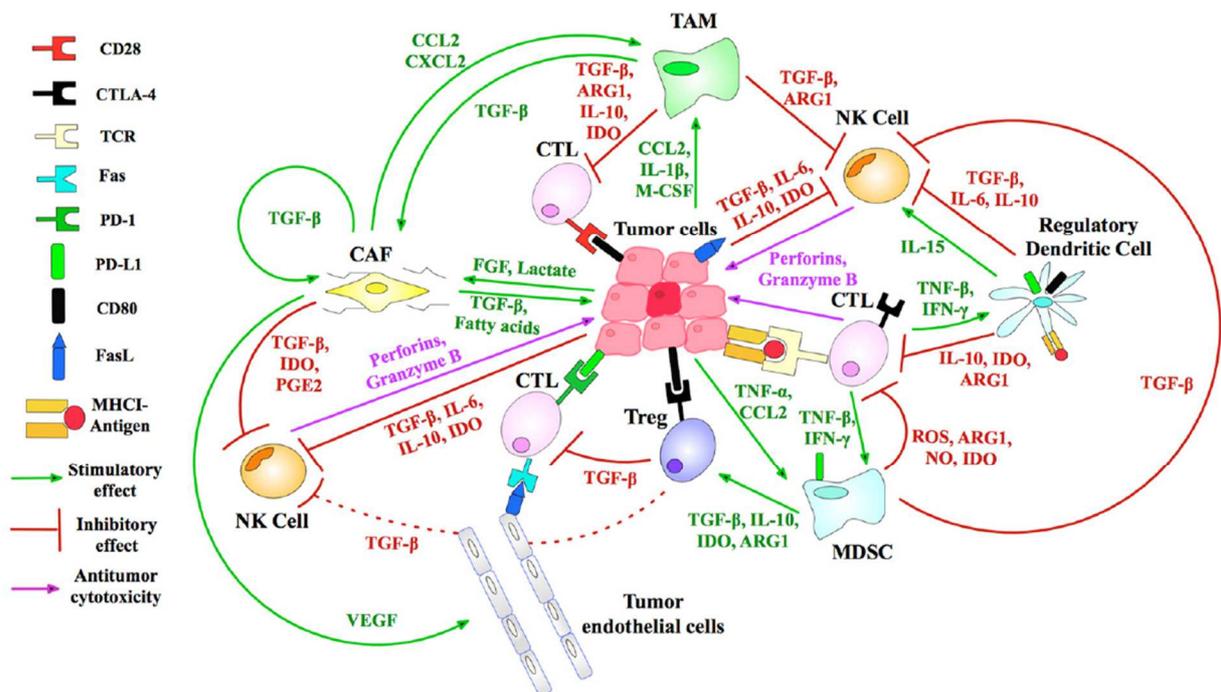
Les neutrophiles ont été initialement identifiés comme ayant un rôle pro-tumoral via la promotion de l'inflammation, de l'angiogenèse et du processus métastatique. Un rapport neutrophiles/lymphocytes élevé lors de l'initiation du traitement pour cancer pulmonaire pourrait d'ailleurs être un facteur de mauvais pronostic (Diem et al. 2017). D'autres études décrivent une action anti-tumorale des neutrophiles via la production de médiateurs cytotoxiques et anti-tumoraux particulièrement dans les cancers pulmonaires de stades précoces (N1) (Eruslanov et al. 2014).

Les cellules Natural Killer (NK) ont un rôle important dans l'action anti-tumorale par reconnaissance directe des cellules tumorales. Cellules de l'immunité innée, elles ont un fort pouvoir de cytolyse (Bernardini et al. 2012). Les cellules tumorales n'exprimant pas ou peu le CMH, sont identifiées comme des cellules « du non-soi » par les NK, qui vont alors induire leur cytolyse. Cette action est médiée par leurs récepteurs inhibiteurs : KIR (killer-cell immunoglobuline like receptors) et CD94/NKG2A qui bloquent l'action cytolytique des NK quand ils détectent la présence du CMH sur les cellules cibles, et l'activent quand ils ne détectent pas le CMH. Les NK expriment également à leur surface des récepteurs activateurs : NKG2D, NCR (natural cytotoxicity receptors) et CD16. C'est le récepteur CD16 qui reconnaît la portion Fc des Ig, et active les processus d'ADCC et d'ADCP selon les modalités décrites plus haut. Les NK activés produisent également un grand nombre de cytokines participant au recrutement et à l'activation d'autres cellules immunitaires.

Toutes les cellules de l'immunité peuvent donc avoir un rôle pro ou anti-tumoral au sein du microenvironnement tumoral, et les cytokines, les facteurs de croissances et les CPI, produits et/ou exprimés par les autres populations cellulaires de ce microenvironnement, jouent un rôle majeur dans la polarisation de ces cellules (**Fig.8**). Il est très difficile d'appréhender dans sa globalité l'état immunitaire d'une tumeur. Il semble très intéressant de développer des index composites prenant en compte : la composition en cellules immunitaires, leur état d'activation,

les cytokines produites, les CPI exprimés, afin de guider les choix des thérapeutiques à proposer (Marshall et Djamgoz 2018).

Les traitements visant à rétablir une immunité anti-tumorale chez les patients, nécessitent une bonne compréhension de ces populations immunitaires et leur comportement. La lutte contre l'environnement immunosuppresseur tumoral au profit d'un environnement immunopermisif est l'objectif à atteindre.



**Figure 8 : Les mécanismes immunosuppresseurs dans le microenvironnement tumoral.**

Les LTreg produisent TGF- $\beta$  et IL10 qui inhibent les LT cytotoxiques (CTL).

Les MDSCs produisent ROS, ARG, NO qui inhibent les CTL.

Les TAMs produisent IDO qui inhibe les CTL, les NK et les cellules dendritiques immatures.

Les CAF et les cellules endothéliales (tumoraux, lymphatiques et vasculaires) produisent du TGF $\beta$  et stimulent l'apoptose des CTL via Fas/FasL.

Le CMH-1 est peu exprimé par les cellules tumorales, pour bloquer la reconnaissance par les CTL.

FasL, exprimé par les cellules tumorales induit l'apoptose des CTL.

Les cellules tumorales sécrètent VEGF qui stimule la néo-angiogenèse, et des lactates et FGF qui favorisent le développement des CAF.

Les cellules tumorales produisent CCL2, CXCL12 et IL1 $\beta$  qui stimulent les TAMs immunosuppresseurs.

Les NK sont bloqués par la production tumorale d'IL6/10, IDO et TGF- $\beta$ , et la production de PGE2, TGF- $\beta$  et IDO par les CAF.

Adapté de Marshall H, Djamgoz M. *Immuno-Oncology : Emerging Targets and Combination therapies*. Front Oncol 2018 ;8 :315.

## C Tissus osseux et métastases

### a. Le tissu osseux sain

La survenue des métastases osseuses dans le contexte du CNPC implique la connaissance des spécificités de ce microenvironnement particulier, afin d'y adapter plus spécifiquement les stratégies thérapeutiques envisagées.

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé d'origine mésenchymateuse.

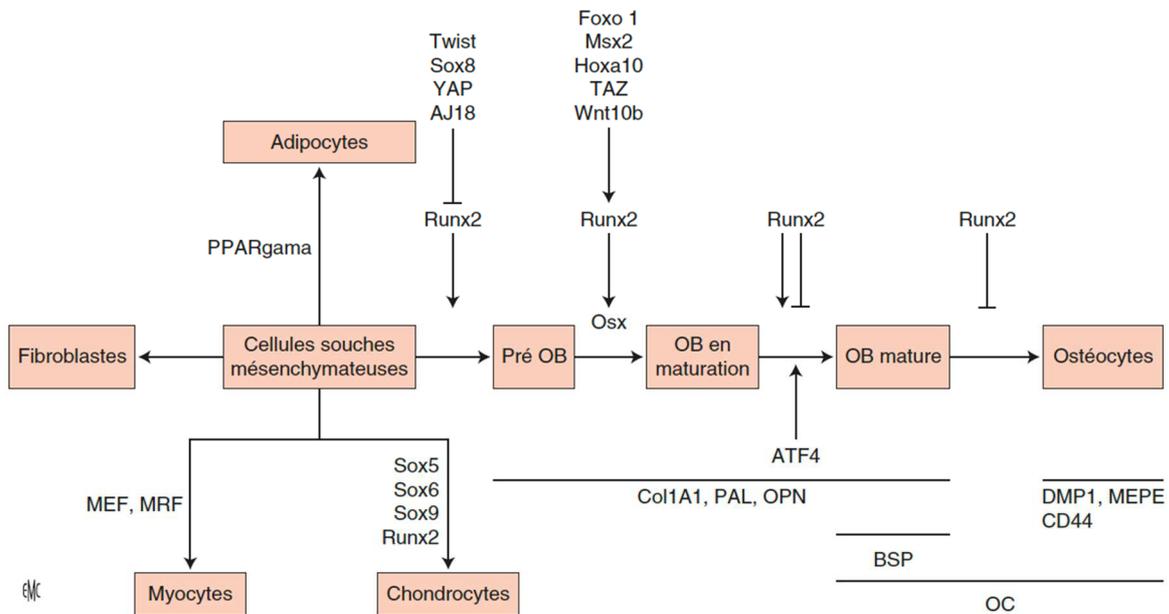
Il remplit 3 fonctions principales (Levasseur 2019):

- une fonction biomécanique (protection des organes, et appareil locomoteur),
- une fonction métabolique de réserve en minéraux (principalement phosphore et calcium),
- une fonction hématopoïétique (production de tous les éléments figurés du sang, dont les cellules immunitaires, dans la médullaire osseuse, à partir de la cellule souche hématopoïétique)(Siddiqui et Partridge 2016 ).

Le tissu osseux est constitué de matrice extracellulaire à plus de 90% et de cellules spécialisées : les cellules de la lignée ostéoblastique et les ostéoclastes.

La matrice extracellulaire est minéralisée, et en constant remodelage : des phases d'apposition de matériel osseux succèdent à des phases de résorption, pour assurer son renouvellement et sa solidité, ainsi que pour maintenir l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme. C'est un mélange de collagène de type I à 80%, de protéines non collagéniques (élastine, fibronectine, ostéonectine, ostéocalcine, ostéopontine, sialoprotéine osseuse, hyaluronane, ...), de protéoglycanes, d'eau, d'enzymes, de facteurs de croissance, de cytokines et de cristaux d'hydroxyapatite. Les protéines non collagéniques de cette matrice extracellulaire sont soit des protéines produites par les ostéoblastes, soit des protéines plasmatiques qui ont été produites par des organes à distance. Ces protéines jouent à la fois un rôle dans la structuration de la matrice osseuse, dans la régulation de la minéralisation et du remodelage osseux, et dans les interactions cellulaires.

Les cellules de la lignée ostéoblastique trouvent leur origine dans la moelle hématopoïétique à partir des cellules souches mésenchymateuses, qui donnent les cellules ostéoprogénitrices. Celles-ci-peuvent, sous l'influence de différents facteurs de transcription, se différencier en chondrocytes, adipocytes ou ostéoblastes. Les ostéoblastes, à leur tour, peuvent se différencier en ostéocytes ou évoluer en cellules bordantes (*Fig. 9*).

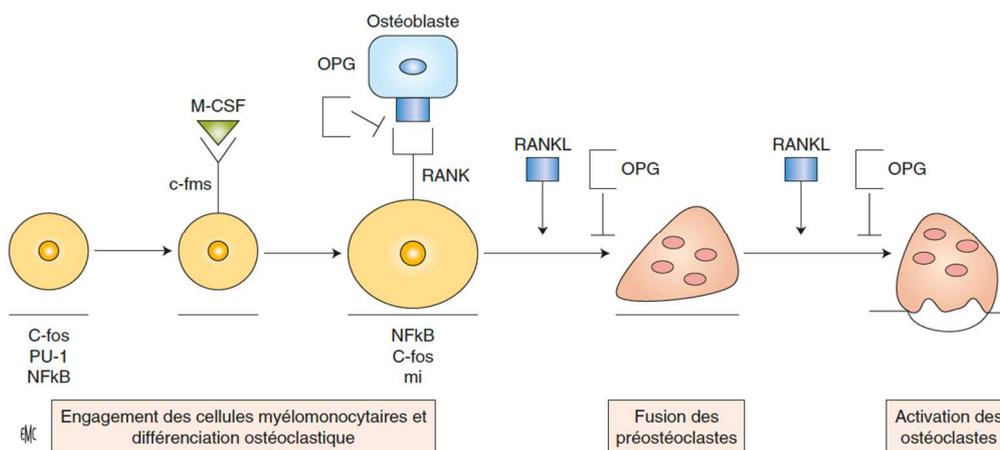


**Figure 9 : Différenciation de la lignée ostéoblastique**

L'engagement de la cellule souche mésenchymateuse vers la voie ostéoblastique se fait sous le contrôle de multiples facteurs de transcription dont Runx2 (Runt-related transcription factor 2), impliquant des voies de signalisation telles que Wnt/LRP5/ $\beta$ -caténine.

Adapté de Levasseur R. *Physiologie du tissu osseux. EMC-Appareil locomoteur 2019 ;14 :1-24.*

Les **ostéoclastes** dérivent, eux, d'un précurseur hématopoïétique circulant mononucléé commun avec les monocytes/macrophages (**Fig. 10**).



**Figure 10 : Différenciation de la lignée ostéoclastique.**

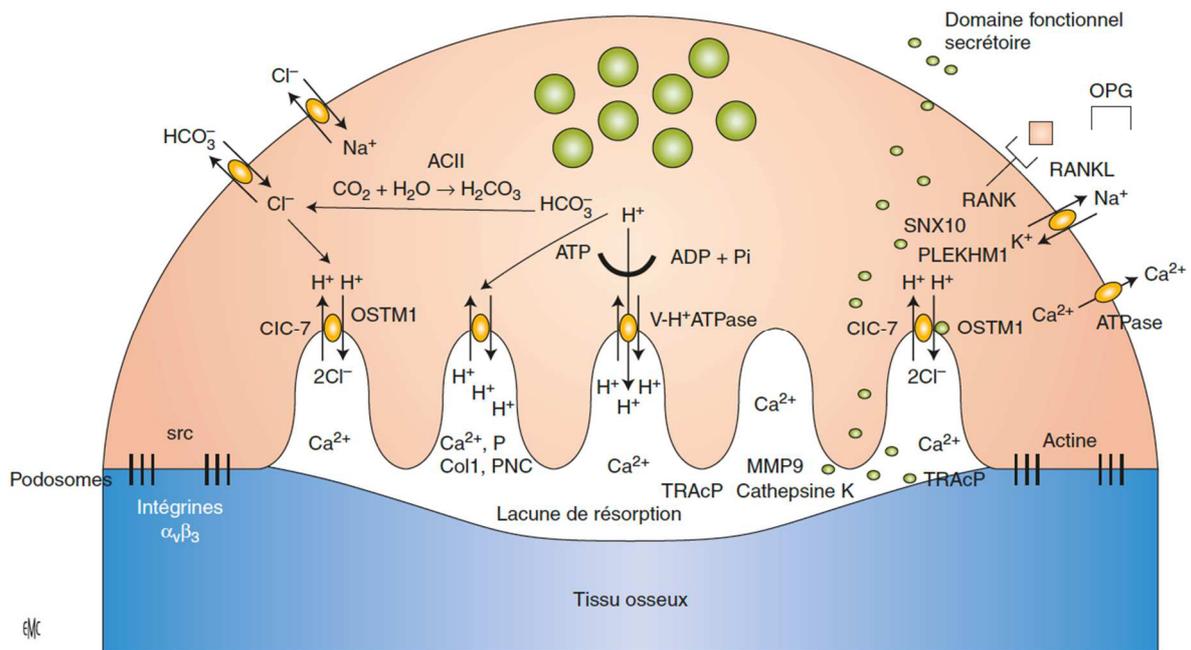
La différenciation de la lignée ostéoclastique se fait sous l'influence de M-CSF puis du système OPG/RANKL/RANK.

Adapté de Levasseur R. *Physiologie du tissu osseux. EMC-Appareil locomoteur 2019 ;14 :1-24.*

Le remodelage osseux est un phénomène permanent d'équilibre entre ostéolyse et ostéoformation. Cet équilibre est dépendant de la communication entre les cellules de la lignée ostéoblastique (ostéoblastes, ostéocytes et cellules bordantes) et les cellules en charge de la résorption osseuse (les ostéoclastes).

Les ostéoblastes produisent les principales protéines constituant la matrice ostéoïde (matrice osseuse non minéralisée). Ils participent également à la minéralisation de cette matrice grâce à une enzyme membranaire : la phosphatase alcaline (PAL). Cette enzyme permet la libération de phosphate inorganique nécessaire à la production de phosphate de calcium sous forme de cristaux d'hydroxyapatite. Au sein de la matrice osseuse minéralisée, les ostéoblastes peuvent se différencier en ostéocytes ou en cellules bordantes (Toppets et al. 2004). Les ostéocytes, ainsi « emmurés » au sein de la matrice minéralisée, dans les ostéoplastes, émettent de longs prolongements cytoplasmiques, qui leur permettent de communiquer avec l'ensemble des cellules du milieu osseux, et de coordonner leurs actions. Ils jouent également un rôle de mécanorécepteur et peuvent induire la résorption osseuse. Les cellules bordantes forment, elles, une monocouche à la surface de l'os, permettant la communication entre la surface osseuse et les ostéocytes. Elles ont la capacité de se diviser et de se différencier en ostéoblastes matures, sous l'effet de la PTH ou lors de l'activation de la voie Wnt, constituant, de fait, une réserve rapidement mobilisable pour l'ostéoformation (Chow et al. 2009 ; Matic et al. 2016).

Les ostéoclastes matures sont des cellules géantes multi-nucléées et polarisées, capables de résorber la matrice osseuse. La surface de contact entre la matrice osseuse et les ostéoclastes constitue la chambre de résorption ou lacune de Howship. La sécrétion d'ions H<sup>+</sup> permet la résorption de la portion minéralisée de la matrice osseuse, et la libération des minéraux, des facteurs de croissance et des cytokines qui y étaient stockées. La digestion de la phase organique de la matrice osseuse s'effectue par la libération du contenu des lysosomes de l'ostéoclaste (phosphatase acide tartrate résistante (TRAP), cathepsine K, MMP...) (*Fig. 11*).



**Figure 11 : L'ostéoclaste mature.**

L'ostéoclaste mature s'ancre à la matrice osseuse grâce à des molécules d'adhésion situées dans les podosomes. Il acidifie la lacune de résorption ainsi délimitée, grâce à la production d'ion  $H^+$  via l'anhydrase carbonique de type II (ACII) et de multiples enzymes et échangeurs d'ions. Il en résulte une forte concentration en calcium. La matrice collagénique est digérée par les enzymes relarguées par l'ostéoclaste (TRAcP, MMP9, Cathepsine K). Les produits de la dégradation du collagène sont excrétés dans le milieu extracellulaire par transcytose. Adapté de Levasseur R. *Physiologie du tissu osseux*. EMC-Appareil locomoteur 2019 ;14 :1-24.

Ostéoblastes et ostéoclastes constituent les unités fonctionnelles de remodelage, et leur action est couplée dans le temps et dans l'espace. Le cycle de remodelage osseux est composé de 7 phases (**Fig. 12**) :

- **Activation** : Sous l'effet de signaux d'ostéorésorption mécaniques ou chimiques (**Tabl. 1**), les cellules bordantes se rétractent et laissent place aux précurseurs ostéoclastiques. Sous l'effet des ostéoblastes qui sécrètent M-CSF et RANKL, les précurseurs ostéoclastiques prolifèrent et se différencient en ostéoclastes matures. La production d'OPG diminue. L'équilibre résorption/formation penche alors en faveur de la résorption.
- **Résorption** : Les ostéoclastes matures vont débiter la dégradation de la matrice osseuse, sous l'effet de différents signaux (**Tabl. 1**). La résorption ostéoclastique se produit au sein des chambres de résorption, par libération d'enzymes lysosomales et production d'HCl, dans les lacunes de Howship.

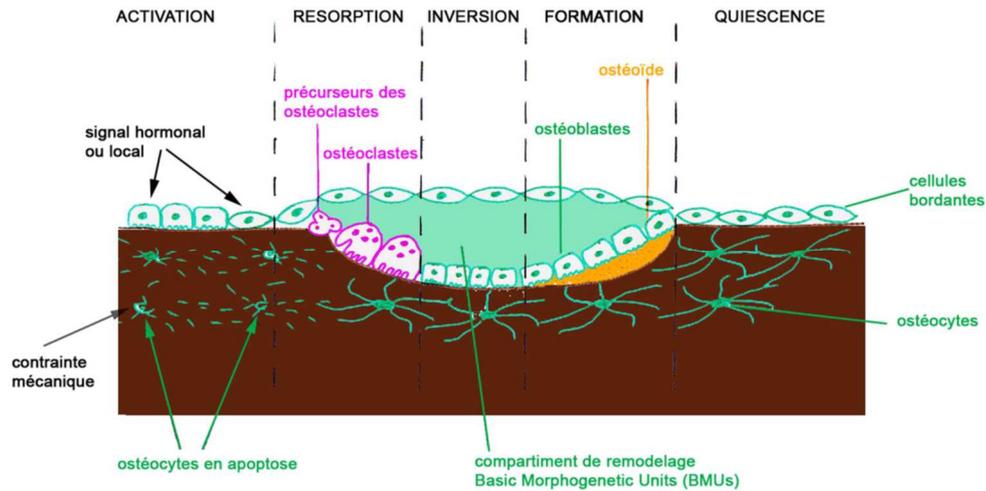
- **Inversion** : la libération de calcium lors de l'ostéorésorption, induit l'apoptose des ostéoclastes. La résorption osseuse ralentit, et des macrophages viennent dégrader les résidus de la matrice osseuse. Le recrutement ostéoblastique augmente.
- **Formation** : les progéniteurs ostéoblastiques prolifèrent au fond des lacunes de Howship, sous l'effet des facteurs de croissance libérés par la résorption de la matrice osseuse. Ils comblent ces lacunes de substance ostéoïde.
- **Minéralisation** : les ostéoblastes minéralisent la matrice osseuse en produisant des cristaux d'hydroxyapatite.
- **Terminaison** : une partie des ostéoblastes meure par apoptose.
- **Quiescence** : une partie des ostéoblastes se différencie en ostéocytes et en cellules bordantes, quiescentes dans l'attente de signaux d'ostéorésorption....

Remodeling Phases	Hormones and Factors Regulating Bone Remodeling
Activation phase	+ , PTH, IGF-1, IL-1, IL-6, PGE <sub>2</sub> , Calcitriol, TNF- $\alpha$ - , Estrogen
Osteoclast recruitment and resorption phase	+ , RANKL, M-CSF, $\alpha\beta 3$ integrins, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , retinoic acid, S1P - , OPG, GM-CSF, estrogen, Calcitonin, IL-4, IL-18, TGF- $\beta$
Reversal phase	TGF- $\beta$ , IGF-1, IGF-2, BMPs, PDGF, or FGF
Osteoblast recruitment and formation phase	+ , WNTs, BMPs, IGF-1, FGF-2, FGF-18, PDGFs, PTH, 1,25(OH) <sub>2</sub> vitamin D <sub>3</sub> , Runx2, TGF- $\beta$ , CT-1, ephrin B2 - , PDGFs, glucocorticoids, leptin, pyrophosphate, Sema4D
Termination phase	Feedback signal of normal sclerostin expression

S1P, sphingosine-1-phosphate; CT-1, cardiotrophin-1; Sema4D, semaphorin 4D.

**Tableau 1 : Hormones et facteurs impliqués dans les différentes phases du remodelage osseux physiologique.**

Adapté de Siddiqui J, Partridge N. Physiological bone remodeling :systemic regulation and growth factor involvement. *Physiology* 2016 ; 31 : 233-245.



**Figure 12 : Etapes du remodelage osseux physiologique.**

Adapté de Chapitre 4 : Le tissu osseux, année universitaire 2011/2012. Dr Anne McFLEER FLORIN

Les relations entre les 2 populations cellulaires osseuses principales sont étroites : les ostéoblastes régulent le développement des ostéoclastes et inversement (Boyce et al 2008).

Les ostéoclastes sécrètent des molécules favorisant la formation osseuse, les couplant aux ostéoblastes, telles que BMP-6, et Wnt-10.

Les ostéoblastes sécrètent les BMP (Bone Morphogenesis Protein), qui régulent l'ostéoformation (interaction ostéoblaste/ostéoblaste) : BMP2 favorise la différenciation des ostéoblastes, et peut également induire leur apoptose (Hay et al. 2004) ; BMP 7 induit une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL), et induit la minéralisation de la matrice extracellulaire par ces mêmes ostéoblastes (Capulli et al. 2014).

Les ostéoblastes produisent également différents éléments qui agissent sur les ostéoclastes. Le premier est M-CSF, qui agit sur de multiples étapes du développement et de de l'activation des ostéoclastes. Ils sécrètent également PTHrp, IL-1b, IL-6 et TNF- $\alpha$  qui favorisent l'ostéoclastogénèse. Enfin, les ostéoblastes produisent le RANKL (Receptor Activator of NFkB Ligand (Anderson et al. 1997) et son antagoniste naturel, l'OPG (ostéoprotégérine) un Rc leurre soluble de RANKL (Simonet et al. 1997). Les ostéoclastes et leurs précurseurs expriment RANK, un Rc de surface de la superfamille du TNF. Quand RANKL se lie à ce Rc, il permet la multiplication, l'activation et la différenciation des ostéoclastes. Quand l'OPG se lie à RANKL, elle empêche la fixation de RANKL sur son Rc RANK et inhibe l'ostéoclastogénèse. Le ratio OPG/RANKL détermine le niveau d'ostéoclastogénèse. L'axe OPG /RANK/RANKL est la voie de communication principale entre les ostéoblastes et les ostéoclastes.

## b. Les métastases osseuses

Il est impossible de dissocier les mécanismes de constitution d'une métastase de la description des caractéristiques d'une cellule tumorale. Comme nous l'avons vu, 2 des 6 caractéristiques principales des cellules de cancer, décrites par *Hanahan et Weinberg* (Hanahan et Weinberg 2000) sont les suivantes : les capacités d'invasion et métastases, et l'induction d'une néo-angiogenèse. Cependant ces 2 critères ne suffisent pas au développement d'une métastase. Déjà en 1889, Paget avait appréhendé la théorie du « seed and soil » : pour qu'une métastase se développe, il faut que la cellule tumorale rencontre le microenvironnement qui lui est adapté et inversement (Fidler 2002 ; Welch et Hurst 2019).

Le milieu osseux est richement vascularisé, particulièrement dans la médullaire osseuse, sous la forme de capillaires fenêtrés. Il constitue également une réserve en facteurs de croissance et en cytokines. C'est un terrain naturellement propice à la formation de métastases, ce qui explique la fréquence de cette localisation dans l'évolution de la majorité des types de cancers (Migliorini et al 2020).

Par ailleurs, la tumeur primitive est capable de préparer le site métastatique à distance, et donc d'optimiser le site osseux pour favoriser le développement de métastases. On parle de « niche pré-métastatique ». La tumeur libère dans la circulation générale, des facteurs de croissance et des cytokines capables de modeler le microenvironnement du futur site de métastase, notamment en favorisant un environnement immunitaire pro-tumoral et une néo-angiogenèse (Wang et al. 2020).

Il existe également un ostéotropisme particulier de certaines cellules tumorales : les cellules tumorales porteuses du récepteur CXCR4 (sein, prostate...) se lient à la chimiokine CXCL12, fortement exprimée en milieu osseux, car produite par les ostéoblastes (Langley et Fidler 2011). L'ensemble de ces éléments, influencé par la multitude de facteurs impliqués dans le processus métastatique osseux, est résumé dans le **tableau 2**.

Regulating factors	Action mechanism
<b>Tumor cell dissemination</b>	
MMP-2	Aacts synergistically with E-cadherin and facilitates tumor angiogenesis
MMP-7	Promotes osteolytic bone metastases by increasing the soluble form of RANKL
MMP-9	Induces tumor angiogenesis
MMP-13	Mediates tumor-induced osteolysis and indicates the invasion and metastasis capacity of tumors
<b>Tumor cell adhesion and invasion</b>	
CXCL12/CXCR4	Facilitates the mobilization of hematopoietic stem cells, tumor proliferation, and angiogenesis
Galectin-3/TF	Promotes adhesion of cancer cells to bone marrow endothelial monolayers
CD44/hyaluronan	Promotes adhesion of cancer cells to bone marrow endothelial monolayers
CCL5/CCR5	Induces tumor cancer cell migration
XCL1/XCR1	Promotes the proliferation and migration of tumor cells
ADAM	Facilitates the degradation of the bone matrix
uPA82	Facilitates the degradation of the bone matrix
COX-2	Facilitates tumor cell adhesion and proliferation in bones
<b>Metastasis formation in bone</b>	
TGFβ	Dual role: suppresses tumor growth at early stage and promotes invasion and metastasis to bones at later stages
IGF-1	Promotes bone colonization of metastasizing tumor cells and facilitates their expansion inside bones
miR-141-3p	Promotes EMT leading to cancer cell invasion and migration
miR-145	Promotes EMT leading to cancer cell invasion and migration
miR-335	Suppresses the development of bone metastases
miR-126	Suppresses the development of bone metastases
miR-206	Suppresses the development of bone metastases
miR-135	Reduces metastasis formations in bone via the downregulation of Runx2
miR-203	Reduces metastasis formations in bone via the downregulation of Runx2
miR-10b	Promotes the bone marrow invasion of tumor cells
miR-21	Promotes the bone marrow invasion of tumor cells
ATX	Regulates the early stage of tumor cell colonization in bones
<b>Osteoclastic metastases</b>	
RANK/RANKL	Activates transcription factor and prevents the apoptosis of mature osteoclasts
PTHrP	Activates the bone resorption activity of osteoclasts
OPG	Competes with RANK for RANKL and thus blocks the RANKL/RANK interaction and osteoclastogenesis
CaSR	Mediates the adhesion, migration and proliferation potential of tumor cells in a calcium-dependent manner
TNF-α	Upregulates the expression of RANKL and induces osteoclast differentiation from TRAF6 <sup>-/-</sup> osteoclast precursors
IL-1	Directly or indirectly promotes osteoclastogenesis by inducing RANKL expression
IL-6	Promotes osteoclastogenesis by inducing RANKL expression in osteoblasts and stromal cells
IL-7	Induces RANKL expression and disturbs the RANKL/OPG balance
GM-CSF	Dual role: stimulates osteoclastogenesis, or suppresses hematopoietic osteoclast precursors
IL-11	Induces the formation of osteoclast-like multinucleated cells
IL-8	Stimulates osteoclastogenesis and bone destruction in metastatic bone diseases
<b>Osteoblastic metastasis</b>	
ET-1	Suppresses osteoblast apoptosis and promotes tumor cell adhesion via E-cadherin augmentation
DKK-1	Converts osteolytic metastasis to osteoblastic metastasis
PTHrP	Participates in the bone remodeling process and facilitates tumor cell proliferation, adhesion and survival
<small>MMPs matrix metallopeptidases, CXCR4 C-X-C chemokine receptor type 4, TF Thomsen-Friedenreich, COX-2 cyclooxygenase-2, TGF-β transforming growth factor beta, IGF insulin-like growth factor, miRNA microRNA, ATX autotaxin, RANKL receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, PTHrP parathyroid hormone-related protein, OPG osteoprotegerin, CaSR calcium-sensing receptor, TNF tumor necrosis factor, GM-CSF granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, ET-1 endothelin-1, Dkk-1 Dickkopf-1</small>	

**Tableau 2 : Principaux facteurs de régulation associés aux différentes phases du développement de métastases osseuses ostéolytiques et ostéocondensantes.**

*Adapté de Wang M, Xia F, Wei Y, Wei X. Molecular mechanisms and clinical management of cancer bon metastasis. Bone Res 2020 ;8 :30.*

On décrit 2 types de métastases osseuses : les lésions ostéocondensantes, ou ostéoblastiques, et les lésions ostéolytiques ou ostéoclastiques (Schmid-Alliana et al. 2018).

Dans le cas du cancer pulmonaire, les 2 types de métastases peuvent coexister, mais le profil le plus fréquent est ostéolytique, particulièrement pour les CNPC (Kuchuk et al. 2012).

Les métastases ostéocondensantes sont associées à une formation osseuse excessive. La stimulation de la formation osseuse résulte notamment d'une activation de la voie de signalisation Wnt via une interaction directe entre cellules tumorales et ostéoblastes (Xiang et Gilkes 2019). Par ailleurs, les facteurs IGF-1, IGF-2, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IL1B, produits par les ostéoblastes, représentent des facteurs chemoattractants pour les cellules tumorales.

Les métastases ostéolytiques, résultent, elles, d'un déséquilibre de la balance entre ostéolyse et ostéoformation, au profit de l'ostéorésorption. L'activité des ostéoclastes est stimulée par la production de certains facteurs par les cellules tumorales (IL-1, IL-6, IL-11, PDGF, MIP1a, TNF, M-CSF, RANKL, PTHrp). La résorption de la matrice osseuse libère des facteurs de croissance qui induisent la multiplication des cellules tumorales, qui à leur tour induisent la résorption de l'os et ainsi de suite.

## **D Comment restaurer l'immunité anti-tumorale ?**

Le but d'un traitement d'immunothérapie anti-cancer est de restaurer une immunité anti-tumorale efficace. L'analyse de la littérature et les éléments évoqués plus haut nous ont conduits à identifier 2 pistes de traitement.

### **a. Les Chimiokines**

#### **i. Définitions et Généralités**

Les cytokines sont des protéines solubles de 8 à 14 kDa, sécrétées par les cellules, capables d'agir à distance sur d'autres cellules, pour en réguler l'activité et la fonction. Ce sont des acteurs majeurs de la composition du microenvironnement tumoral puisqu'elles se trouvent à l'interface entre les différentes cellules qui le composent.

Un des sous-groupes de ces cytokines est celui des chimiokines, ou cytokines chimiotactiques. Elles ont été décrites initialement comme des cytokines dotées de propriétés chémo-attractantes sur les cellules immunitaires, particulièrement les leucocytes (Thelen 2001 ; Roy et al. 2014). Elles représentent donc un moyen potentiel d'augmenter l'infiltrat inflammatoire au sein du microenvironnement tumoral, si on est capable d'augmenter leur concentration localement.

Les chimiokines font par ailleurs l'objet de multiples publications sur leur action directe dans la cancérogenèse, via leur rôle dans la migration cellulaire et l'angiogenèse (Mantovani et al. 2010) (**Tabl. 3**). Elles sont impliquées dans la coordination et le recrutement leucocytaire en condition physiologique comme pathologique (inflammation, infection, cancer), mais aussi dans la régulation de la prolifération, de la différenciation, de la survie et de la sénescence d'autres populations cellulaires (angiogenèse, prolifération et survie des cellules tumorales, invasion et métastases).

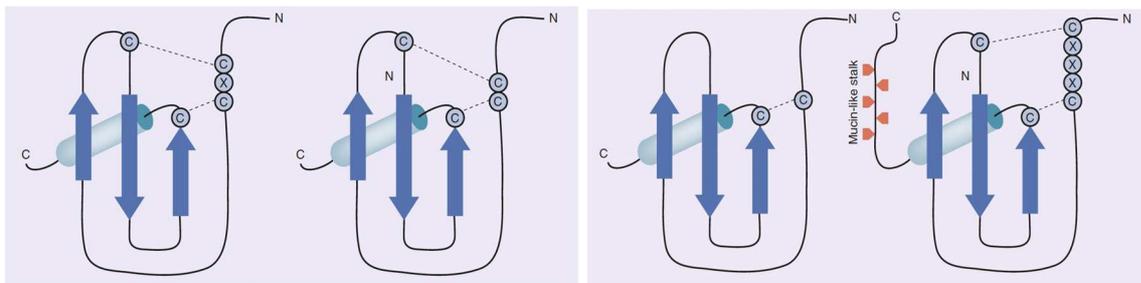
Chemokine	Human tumor	Leukocyte infiltrate	Prognostic value
CCL2	Breast carcinoma	TAM	Negative
	Pancreatic carcinoma	TAM	Positive
	Prostate carcinoma	TAM	Negative
	Colon carcinoma	TAM	Negative
	Gastric carcinoma	T (CD4, CD8)	ND
CCL5	Breast carcinoma	TAM	Negative
	Melanoma	T (CD8)	ND
	Papillary thyroid carcinoma	DC	ND
CCL7	Glioma	TAM	Negative
CCL19	Breast carcinoma	DC	ND
CCL20	Pancreatic carcinoma	DC	ND
	Breast carcinoma	DC	ND
	Papillary thyroid carcinoma	DC	ND
CCL22	Lung carcinoma	Treg	Negative
	Ovarian carcinoma	Treg	Negative
	Prostate carcinoma	Treg	ND
	Gastric carcinoma	Treg	ND
	T, B and Hodgkin's lymphoma	ND	Negative
CXCL1	Gastric carcinoma	PMN	ND
	Colon carcinoma	ND	ND
	Melanoma	ND	ND
CXCL5	Non-small cell lung carcinoma	PMN	ND
CXCL6	Gastrointestinal tumours	PMN	ND
CXCL8	Bronchioloalveolar carcinoma	PMN	Negative
CXCL9/10	Lymphocyte-rich gastric carcinoma	TIL	Positive
	Colorectal carcinoma	TIL	Positive
CXCL12	Ovarian carcinoma	pDC	ND
CXCL16	Colorectal carcinoma	TILs	Positive
	Glioma	ND	ND
	Breast carcinoma	ND	Positive
	Renal carcinoma	ND	Positive
	Pancreatic ductal adenocarcinoma	ND	ND
	Prostat cancer	ND	Negative
CX3CL1	Colorectal carcinoma	TIL	Positive
	Neuroblastoma	TIL	Positive
	Gastric adenocarcinoma	NK and T (CD8)	Positive

**Tableau 3 : Chimiokines impliquées en cancérologie humaine.**

Adapté de Mantovani A, Savino B, Locati M et al. *The chemokine system in cancer biology and therapy. Cytokine Growth Factor Rev.* 2010 ; 21 :27-39.

Quarante-sept chimiokines ont été décrites à ce jour. Bien qu'elles partagent des similitudes d'action, ce sont des critères structuraux qui permettent de les définir : la présence de 4 résidus cystéines, impliquées dans la formation de 2 ponts disulfures, responsables de leur structure en 3 dimensions.

Les chimiokines sont subdivisées en 4 sous-groupes en fonction de l'arrangement de ces résidus cystéines : C, CC, CXC et CX<sub>3</sub>C (**Fig. 13**) (IUIS/WHO 2003).



**Figure 13 : Structure des 4 sous-groupes de chimiokines : CXC, CC, C et CX<sub>3</sub>C**  
Adaptée de Vinader V, Afarinkia K. A beginner's guide to chemokines. *Future Med Chem* 2012 ;4 :845-852

Certaines chimiokines sont produites de manière constitutive, ce sont les chimiokines homéostatiques. Pour d'autres, la production est induite dans certaines circonstances, ce sont les chimiokines inflammatoires.

L'action de ces chimiokines s'effectue via leur interaction avec un Rc membranaire.

Ces Rc sont composés d'une chaîne polypeptidique de 350 à 360 acides aminés, dont l'extrémité N-terminale est extracellulaire et l'extrémité C-terminale est intracellulaire.

Ils présentent 7 domaines transmembranaires. Leur activité de transduction du signal est médiée par une protéine G hétérodimérique, capable d'activer des voies de signalisation intracellulaires, responsables de l'action de la chimiokine.

La spécificité d'interaction entre chimiokine et Rc est variable : certains ligands peuvent se lier à plusieurs Rc différents et inversement, ce qui implique une grande diversité d'action pour une même chimiokine. Plus rarement, cette relation ligand-Rc peut être exclusive. La redondance du système de chimiokines est une sécurité intrinsèque essentielle pour la fonctionnalité du système immunitaire.

Leur action est également fonction de la concentration en chimiokine, de la concentration en Rc et de l'affinité du Rc pour une chimiokine donnée (Bonecchi et al. 2009).

## ii. CX3CL1 ou Fractalkine

### 1. Propriétés

Le nom fractalkine (FKN) a été utilisé pour la première fois pour décrire une chimiokine découverte par Bazan et al. (Bazan J et al. 1997). La FKN est caractérisée par la présence de 3 acides aminés variables, entre les 2 premiers résidus cystéine de l'extrémité N-terminale de ces peptides (chemokine [C-X3-C motif] ligand 1). Dans la nomenclature actuelle, basée sur la structure des chimiokines, CX3CL1 est le seul représentant de la sous-famille CX3C (**Fig.14**). CX3CL1 et CXCL16 sont dites chimiokines non conventionnelles car ce sont les 2 seules décrites pour présenter un ancrage membranaire. Cette spécificité structurelle leur confère une taille plus importante (respectivement 254 et 373 acides aminés versus 60-100 pour les chimiokines conventionnelles). Elles sont constituées de 4 domaines : un domaine chimiokine, un domaine mucine, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire.

CX3CL1 est synthétisée sous **forme membranaire** mais elle peut être clivée par plusieurs protéases (ADAM 10, ADAM 17, cathepsine S) libérant ainsi une **forme soluble**.

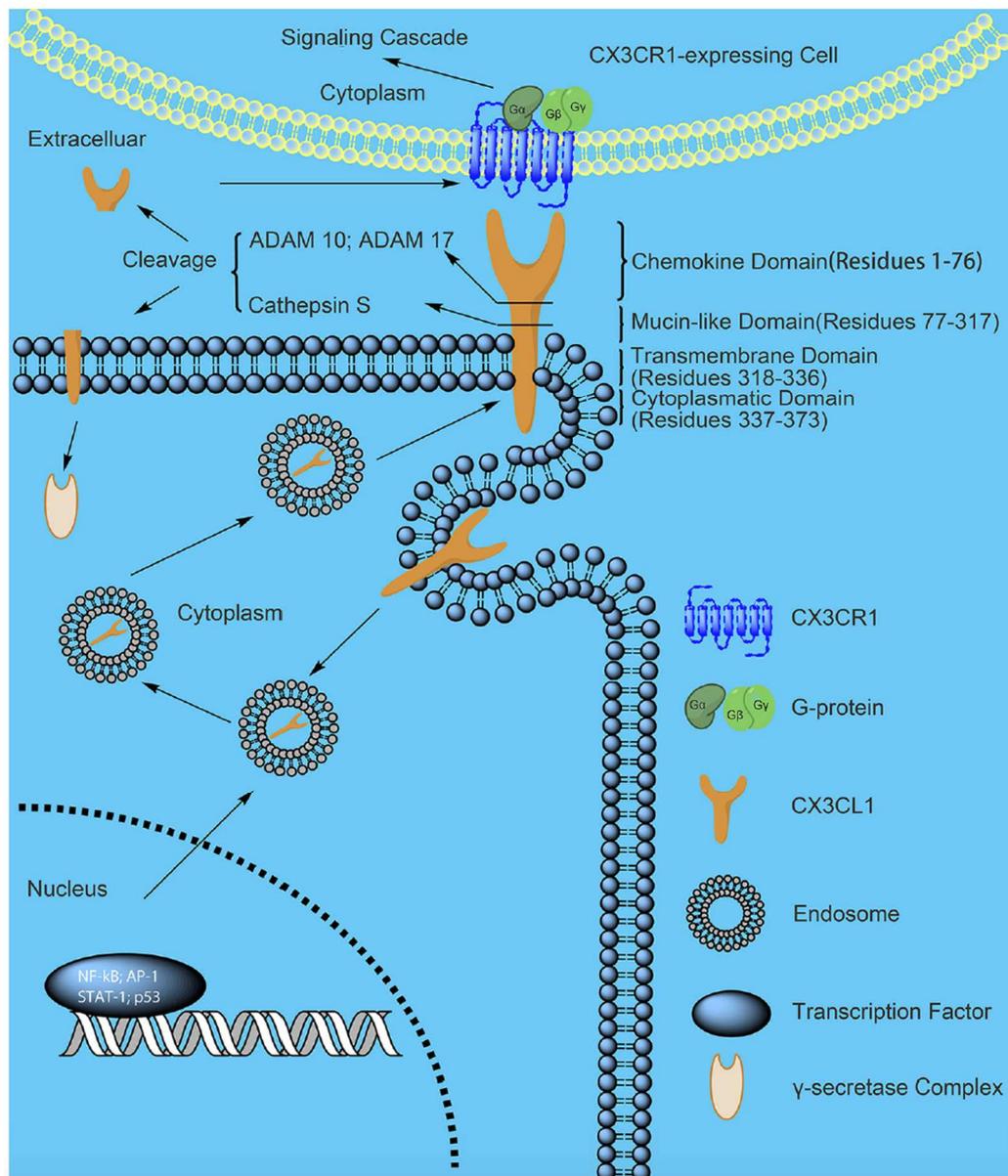
Tous les effets biologiques de CX3CL1 sont médiés par un seul Rc: CX3CR1.

On a longtemps cru que l'axe CX3CL1/CX3CR1 comprenait une paire exclusive de ligand et de Rc, ce qui augmentait l'attractivité de cette voie pour la thérapeutique (Imai et al. 1997). Cependant, en 2010, *Nakayama et al.* ont découvert de manière inattendue que la chimiokine CCL26 était un agoniste fonctionnel pour CX3CR1, de moindre affinité toutefois que CX3CL1 (Nakayama et al. 2010).

**Dans sa forme membranaire**, la FKN assure une adhésion cellulaire forte indépendante des intégrines et des sélectines (Bachelier et al. 2013), qui intervient notamment dans la migration des leucocytes, permettant leur arrêt dans le flux sanguin, avant la diapédèse (White et Greaves 2009).

**Dans sa forme soluble**, elle possède une activité chimiotactique pour les cellules exprimant son Rc. Les cellules qui ont le niveau d'expression le plus important de ce Rc sont : les neutrophiles, les cellules NK, les monocytes CD14+, les LT CD4+ et CD8+, les CD8 et les LB, ainsi que les neurones, les cellules de la microglie, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les précurseurs d'ostéoclastes (Bazan et al. 1997). Sous cette forme, elle participe au recrutement leucocytaire, mais aussi à la migration de tous les types cellulaires qui portent son Rc. Elle favorise aussi la différenciation ostéoclastique et est produite par les

ostéoblastes, l'impliquant dans la régulation de la résorption osseuse (Koizumi et al. 2009, Hoshino et al. 2013).



**Figure 14 : La FKN ou CX3CL1 et son récepteur CX3CR1**

Les facteurs de transcription NF-κB, AP-1, STAT-1 et p53 induisent l'expression de la FKN. Synthétisée sous forme de précurseur (50-75 kDa), la FKN subit différentes modifications post-traductionnelles, notamment des glycosylations, avant de parvenir à une forme mature (100 kDa) ancrée à la surface cellulaire.

Elle exerce son action par sa fixation au récepteur membranaire CX3CR1, un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G, qui active une cascade de signalisation intracellulaire.

La FKN membranaire peut être clivée sous l'action d'ADAM 10, ADAM 17 et de la cathepsine S pour donner un fragment soluble de 85 kDa contenant le domaine chimiokine .

Adapté de Liu W, Jiang L, Bian C et al. Role of CX3CL1 in disease. Arch Immuno Ther Exp 2016 ; 64 :371-383.

## 2. Fractalkine et cancer

Une recherche bibliographique associant les termes « fractalkine » et « neoplasm » sur PubMed en date du 15/07/2020 a permis d'identifier 189 résultats.

Étaient conservés les articles originaux, se rapportant à l'analyse de tumeurs solides, et présentant des données sur l'expression ou non de CX3CR1 par les cellules tumorales, et sur l'impact de la FKN sur les mécanismes de développement tumoral et le pronostic de la maladie. Après lecture des abstracts, 31 articles originaux ont été retenus et 3 revues ont été analysées (Liu et al. 2016, D'Haese et al. 2010 ; Ferreti et al. 2014).

*Dans le cadre du cancer du pancréas*, 4 études analysaient le rôle de la FKN et de son Rc (Marchesi et al. 2008, Xu et al. 2012, Huang et al. 2017, Wang et al. 2017). Les résultats étaient concordants : l'expression de CX3CR1 par les cellules tumorales de cancer du pancréas était associée à un mauvais pronostic du fait d'un potentiel métastatique plus élevé (Huang et al 2017). Cette expression de CX3CR1 par les cellules tumorales expliquait leur neurotropisme (Marchesi et al .2008), les neurones exprimant des niveaux élevés de CX3CL1. L'expression de CX3CR1, par les cellules tumorales d'ADK du pancréas leur conférerait en outre une résistance aux mécanismes de l'apoptose (Wang et al. 2017). La co-expression de CX3CL1 et CX3CR1 dans les cancers du pancréas (Xu et al. 2012) était associée à une moindre survie.

*Dans le cadre du cancer de prostate*, 4 études étaient identifiées (Shulby et al. 2004, Tang et al. 2015, Tang et al. 2016, Liu et al. 2018). Les cellules de cancer de prostate exprimaient CX3CR1 (Shulby et al. 2004). L'expression de CX3CL1 était majorée en condition hypoxique (Tang et al. 2015) et responsable d'une prolifération plus importante des cellules tumorales, ainsi que d'un risque de métastases osseuses plus élevé (Liu et al. 2018). CX3CL1 favorisait par ailleurs la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules de cancer de prostate, et donc le risque de métastase à distance (Tang et al. 2016).

*Pour le cancer du rein à cellules claires*, 1 étude (Yao et al. 2014), rapportait que l'expression de CX3CR1 par les cellules tumorales était associée à un potentiel métastatique plus élevé, et à un plus mauvais pronostic.

*Pour le cancer de l'ovaire*, nous avons identifié 2 études (Main et al. 2017, Singh et al. 2019). L'étude de *Main et al* (Main et al. 2017) identifiait le rôle de CX3CR1 dans l'initiation du processus d'adhésion péritonéale des cellules de cancer de l'ovaire, et donc la constitution de métastases péritonéales. Sa surexpression était associée à un plus mauvais pronostic. *Singh et al* (Singh et al. 2019) confirmaient ces résultats et retrouvaient également une surexpression de CX3CR1 en condition hypoxique.

*Pour le cancer colorectal*, les 2 études identifiées (Otha et al. 2005, Erreni et al. 2016), rapportaient un impact pronostique positif de CX3CL1, par diminution du potentiel métastatique des cellules, et corrélé à la densité en TILs (Otha et al. 2005). La co-expression de CX3CL1 et CX3CR1 dans les tumeurs coliques était associée à un meilleur pronostic (Erreni et al. 2016). Ces résultats ont d'ailleurs été vérifiés dans des travaux menés dans l'équipe (Vitale et al. 2007).

*Pour le carcinome hépatocellulaire*, nous avons identifié une étude (Matsubara et al. 2007). Les patients opérés d'un CHC avec un niveau d'expression plus élevé de CX3CL1 et CX3CR1 avaient un meilleur pronostic, et une meilleure survie sans récurrence.

*Pour les gliomes*, 3 études étaient identifiées (Erreni et al. 2010, Ren et al. 2010, Sciumé et al. 2010). CX3CR1 et CX3CL1 sont exprimés par les cellules tumorales. Les travaux de *Erreni et al* (Erreni et al. 2010) montraient que la surexpression de CX3CL1 était associée à un plus mauvais pronostic. En revanche, ceux de *Ren et al* (Ren et al. 2010) et *Sciumé et al* (Sciumé et al. 2010), démontraient que la surexpression de CX3CL1 réduisait le potentiel invasif du gliome en favorisant l'adhésion intercellulaire.

*Pour le cancer du sein*, 3 études sont identifiées (Jamieson-Gladney et al. 2011, Park et al. 2012, Tsang et al. 2013). Selon les résultats de *Park et al* (Park et al. 2012), la surexpression de CX3CL1 par les cellules de cancer du sein est associée à une infiltration plus importante par les LT CD8+, les NK et les CD, et corrélée à une meilleure survie. Dans l'étude de *Tsang et al* (Tsang et al. 2013), l'expression de CX3CL1 semblait associée à une survie plus courte des patientes atteintes de cancer du sein, bien qu'ils aient noté également une augmentation de l'infiltration par les TILs. Dans l'analyse de *Jamieson et al* (Jamieson-Gladney et al. 2011), l'expression de CX3CR1, est associée au tropisme osseux des métastases de cancer du sein, et à une survie plus courte des patientes.

*Pour le cancer de l'estomac*, nous avons identifié 2 études (Wei et al. 2015, Hyakudomi et al. 2008) qui soulignaient une nouvelle fois la dualité d'effet de l'axe CX3CL1/CX3CR1 en contexte tumoral. *Hyakudomi et al* (Hyakudomi et al. 2008) rapportaient un meilleur pronostic en cas d'augmentation de l'expression de CX3CL1 dans la tumeur, en rapport avec une augmentation de l'infiltration par les LT CD8+ et les NK. *Wei et al* (Wei et al. 2015) rapportaient un potentiel métastatique plus élevé et une plus grande prolifération des cellules tumorales en cas de surexpression de CX3CR1.

Pour le cancer du poumon, nous avons identifié 9 études (Schmall et al. 2015, Zhou et al. 2016, Liu et al. 2019, Su et al. 2018, Shiels et al. 2017, Mauri et al. 2012, Kee et al. 2013, Guo, Chen et al. 2003 et Guo, Zhang et al. 2003). *Mauri et al* décrivaient une expression plus importante de CX3CR1 sur les métastases de cancer pulmonaire que sur les tumeurs primitives, particulièrement en site osseux. Dans l'étude de *Zhou et al* (Zhou et al. 2016), CX3CL1 était plus exprimé dans les tumeurs de plus haut grade. Dans les travaux de *Schmall et al* (Schmall et al. 2015), la co-culture de macrophages M2 et de cellules de cancer pulmonaire induisait une surexpression de l'axe CX3CL1/CX3CR1 et favorisait la progression tumorale. Dans les travaux de *Liu et al* (Liu et al. 2019), CX3CL1 n'avait pas d'effet sur la prolifération *in vitro* des cellules de cancer pulmonaire, mais favorisait la migration *in vitro* dans des chambres de transmigration (Transwell). Dans l'analyse de *Su et al* (Su et al. 2018), l'expression de CX3CL1 n'avait un impact pronostique négatif que dans la sous-population d'ADK pulmonaire du patient fumeur. Les travaux de *Shiels et al* (Shiels et al. 2017), montraient que la présence de CX3CL1 dans les échantillons sanguins de femmes non fumeuses, était corrélée à un risque moindre de développer un cancer du poumon. *Kee et al* (Kee et al. 2013), ont montré que la production de FKN soluble par les cellules tumorales, diminuait la progression tumorale en site pulmonaire dans un modèle murin de cancer du poumon. Il en était de même dans les travaux de *Guo et al* (Guo, Chen et al. 2003 et Guo, Zhang et al. 2003), du fait du recrutement de CD et de NK.

Globalement, l'analyse de la littérature, montre que les 2 formes de FKN, membranaire et soluble, agissent à différents niveaux dans la cancérogenèse (Liu et al 2016 ; D'Haese et al 2010 ; Ferreti et al. 2014) :

- sous sa *forme soluble*, elle agit comme un facteur chimiotactique pour nombre de *cellules immunitaires*, porteuses de son récepteur CX3CR1, ce qui lui confère un effet anti-tumoral ou pro-tumoral selon le contexte micro-environnemental.
- sous sa *forme soluble*, elle agit comme facteur chimiotactique pour certaines *cellules tumorales*, porteuses de son récepteur CX3CR1, ce qui peut favoriser la domiciliation des cellules cancéreuses vers les sites exprimant CX3CL1 et donc favoriser le processus de métastases.
- sous sa *forme membranaire*, elle peut avoir un rôle anti-métastatique, en favorisant l'adhésion entre *cellules tumorales*, quand celles-ci expriment CX3CR1.
- sous sa *forme membranaire, comme soluble*, la FKN peut avoir un effet pro-tumoral en favorisant la prolifération tumorale, par la médiation de signaux de survie et de

prolifération dans certaines *cellules tumorales* (AKT, MAPK/ERK, EGFR) (Tardaguila et al. 2013).

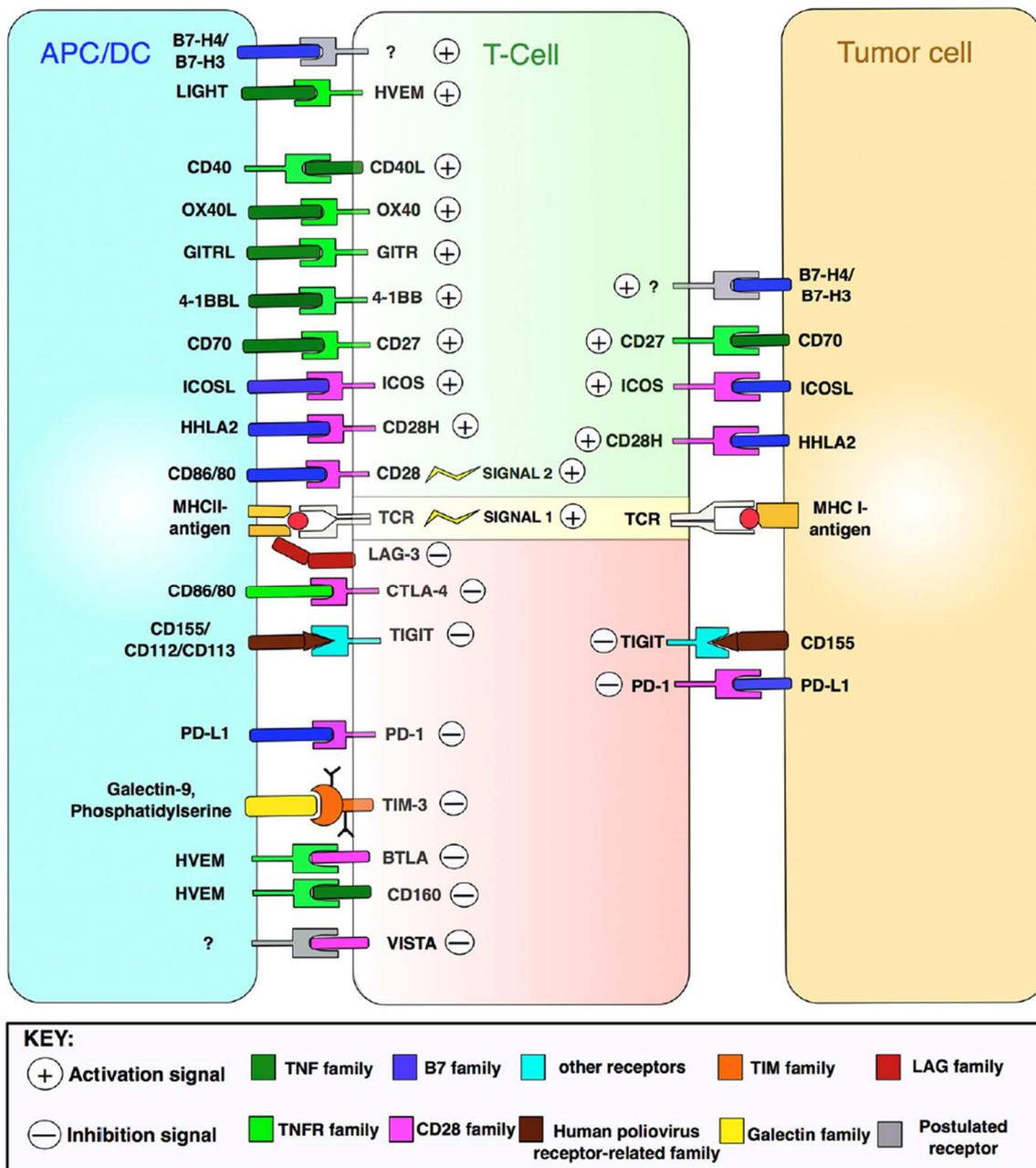
Cette dualité d'action de la FKN dans le développement des tumeurs et des métastases, induit la nécessité d'analyser différents paramètres theragnostiques avant d'envisager son utilisation thérapeutique dans un type tumoral donné, avec notamment, la mesure de l'expression de son récepteur CX3CR1 par les cellules tumorales.

Malgré cette action ambivalente sur le développement tumoral, les nombreuses spécificités de la chimiokine FKN en font une candidate intéressante pour la restauration d'une immunité anti-tumorale, en plus de ses effets potentiels sur le métabolisme osseux.

## b. Les Checkpoints Immunitaires

### i. Définitions et généralités

Pour qu'un cancer se développe, il faut notamment que les cellules tumorales soient capables d'échapper à la vigilance du système immunitaire (Hanahan et Weinberg 2011). Les cellules tumorales et les autres composants cellulaires du microenvironnement tumoral utilisent de nombreux mécanismes pour créer un environnement tolérant à ces cellules tumorales. Nous allons décrire ici les mécanismes de détournement des points de contrôle du système immunitaire ou checkpoints immunitaires ou CPI (*Fig. 15*) qui sont l'un des moyens de développement d'un environnement immunosuppresseur.



Depicted are immune receptor-ligand pairings amenable to pharmacological manipulation by immunomodulatory mAbs. HVEM, herpes virus-entry mediator; LIGHT, lymphocyte activation gene 3 protein; GITR, glucocorticoid-induced TNFR family-related protein; ICOS, inducible T-cell costimulatory; LAG-3, lymphocyte activation gene 3 protein; TIGIT, T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains; TIM-3, T-cell Ig mucin domain-containing 3; BTLA, B-lymphocyte and T-lymphocyte attenuator; VISTA, V-domain Ig suppressor of T-cell activation; TNF, tumor necrosis factor. Figure created by combining information from Mahoney et al. (13), Melero et al. (14), and Khalil et al. (15). See Abbreviations list for further definitions.

### Figure 15 : Activation des LT et cibles thérapeutiques.

L'activation du LT par la cellule présentatrice d'Ag (CPA) est régulée par de multiples signaux. Ici sont représentés les couples ligand/Rc des checkpoints immunitaires exprimés à la surface des LT, des CPA et des cellules tumorales qui pourraient être des cibles thérapeutiques. Ces checkpoints immunitaires sont exprimés à différents moments de la réponse inflammatoire, par les CPA et les CD pour en réguler l'intensité et la durée. Également exprimés de manière constitutive par les cellules tumorales, ils induisent une anergie des LT infiltrant les tumeurs, favorisant ainsi le développement tumoral.

Adaptée de Marshall H, Djamgoz M. Immuno-oncology :Emerging targets and combination therapies. Front Oncol 2018 ,8 :315.

Il existe 3 niveaux de contrôle pour l'activation des LT : la reconnaissance spécifique CMH-Ac-TCR ; l'environnement cytokinique ; et les checkpoints immunitaires (CPI).

Les CPI sont des couples de ligand/récepteur qui interviennent dans la modulation de l'activation des cellules immunitaires afin de limiter la durée et l'intensité de la réaction immune (Pardol 2012). L'expression de ces CPI est soit constitutive, soit, le plus souvent, induite après activation de la réponse inflammatoire et d'autant plus que la réaction inflammatoire persiste.

Il existe à la surface d'une même cellule des ligands et/ou des récepteurs co-activateurs (qui renforcent l'activation) et des ligands et/ou des récepteurs co-inhibiteurs (qui diminuent l'activation). Les Rc des CPI comportent un domaine extracellulaire, et un domaine cytoplasmique capable d'activer ou d'inhiber les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'activation de la réponse T.

C'est l'équilibre complexe entre les signaux activateurs et les signaux inhibiteurs reçus et intégrés à un instant T par une cellule immunitaire qui détermine si elle a la capacité de s'activer ou non.

Le rôle physiologique des CPI est la garantie de la tolérance du système immunitaire aux cellules du « soi » (éviter l'auto-immunité) et la régulation de la réponse inflammatoire (ni trop intense, ni trop durable, ni trop faible) (Garnier et al. 2017 ; Pardol 2012 ; Marshall et Djamgoz 2018).

Ce système peut être perverti par les cellules tumorales qui sont capables d'exprimer, à leur surface, de façon constitutive ou en réponse à des cytokines inflammatoires présentes dans le microenvironnement tumoral, des CPI inhibiteurs. Ceux-ci bloquent l'immunité anti-tumorale, en induisant une anergie des LT, qui ne sont plus capables de les détruire. Les cellules tumorales sont également capables de moduler l'expression de ces CPI à la surface des cellules présentatrices d'Ag et des CD, majorant encore l'anergie et l'épuisement de la réponse T anti-tumorale.

## ii. [Principaux CPI ciblés en pratique clinique](#)

Depuis quelques années, l'utilisation d'immunothérapie anti-CPI s'est développée en pratique clinique : il s'agit d'Ac monoclonaux dirigés contre des points de contrôle du système immunitaire (Vignat et Champiat 2018).

Il existe 2 possibilités pour stimuler les LT : inhiber les CPI inhibiteurs par des Ac bloquants, ou stimuler les CPI activateurs par des Ac agonistes.

Le premier cancer à bénéficier de ce type de traitement a été le mélanome, avec le traitement par Ac anti-CTLA4 en pratique clinique à partir de 2010 en France.

Depuis, les indications se sont rapidement multipliées, notamment dans la prise en charge du cancer du poumon, avec à ce jour l'utilisation courante des Ac anti-PD1 et des Ac anti-CTLA4 (Garnier et al. 2017).

Actuellement les principales cibles de développement thérapeutique sont les suivantes (Barreto et al. 2020) :

- CTLA 4 : *cytotoxic t-lymphocyte-associated protein 4* ou CD 152. L'expression de CTLA-4 est rapidement induite après activation des LT. CTLA4 et CD28 partagent les mêmes ligands, CD80 et CD86, qui ont cependant une affinité plus grande pour CTLA 4. En perturbant les interactions entre CD28 et CD80/CD86, qui délivrent les co-signaux indispensables à l'activation des LT, CTLA 4 inhibe l'activation des LT effecteurs, précocement, au sein des organes lymphoïdes secondaires. Par ailleurs, CTLA 4 est constitutivement exprimé par les LTreg et il contribue à leur activité inhibitrice (Buchbinder et Desai 2016).
- PD1/PDL1 : *programmed death-1* ou CD279. Absent de la surface des LT naïfs, son expression est induite après l'activation du LT, plus *tardivement* que celle de CTLA 4. C'est un des marqueurs de l'épuisement des LT. Ses 2 ligands, PDL1 et PDL2, sont exprimés par une grande variété de cellules (CPA, LT, cellules endothéliales, fibroblastes pour PDL1 ; CD, LB, monocytes et macrophages pour PDL2), dont les cellules tumorales. PD1 inhibe la prolifération des LT, diminue la production d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL2 et diminue la survie des LT. Il est également exprimé par les LB, les NK, les CD et les macrophages, plutôt dans les tissus périphériques (Keir et al. 2007, Keir et al. 2008). L'existence de plusieurs ligands de PD1, induit une plus grande diversité d'effet. L'intérêt de cibler à la fois CTLA4 et PD1 vient du fait qu'ils sont exprimés à des moments différents de l'activation T (Keir et al. 2008).
- LAG 3 : *lymphocyte activation gene 3* ou CD223. Son expression est induite après l'activation des LT, plusieurs jours après l'induction de la réaction inflammatoire. Il est également exprimé par certaines cellules NK, les LB et les LTreg. Il agit comme un inhibiteur des LT effecteurs en se liant au CHM II, avec une affinité plus grande que

CD4. Son blocage permet d'augmenter la réactivité des LT cytotoxiques (Long et al. 2018).

- TIM3 : *T-cell immunoglobulin and mucin containing protein 3*. Il est exprimé par les LT CD8, les LT CD4 helper de type Th1 et Th17, les LTreg, les CD, les monocytes, et les macrophages. Son ligand, galectine 9 est exprimé sur les LTreg et les cellules tumorales, induisant une inhibition de la réponse T CD8 (Das et al. 2017). Il reconnaît aussi HMGB1, la phosphatidylsérine et CEACAM-1 (carcinoembryonic antigen-related cell-adhesion molecule-1). Son blocage en simultané de celui de PD1 semble intéressant dans la prise en charge des tumeurs solides et fait l'objet de multiples essais cliniques en cours (Acharya et al. 2020).
  
- GITR : *glucocorticoïde-induced TNF receptor family-related protein* est un membre de la superfamille des Rc à TNF. Ce Rc de surface est fortement exprimé par les LTreg et dans une moindre dose par les LT naïfs et les LT mémoires, les NK activés, les macrophages et les CD. Son ligand est GITR-L, lui-même principalement exprimé par les cellules présentatrices d'Ag que sont les CD, les LB et les macrophages. Il s'agit à la fois d'un CPI activateur de la réponse T cytotoxique, et d'un inhibiteur de la réponse T reg. Les Ac agonistes de GITR, prometteurs d'effets pro-LT effecteurs et anti-Treg (Knee et al. 2016 ; Han al. 2019 ; Lu et al. 2014 ; Zhu et al. 2015) sont actuellement en cours d'investigation préclinique et clinique.

# Objectifs

Le premier objectif de ce travail de thèse était de déterminer le rôle de la FKN dans le développement de métastases osseuses de CNPC à l'aide d'un modèle syngénique murin utilisant les cellules de la lignée LL2.

Après avoir mis en évidence un effet anti-tumoral de la FKN dans ce modèle, le second objectif était d'identifier les mécanismes sous-jacents, pour découvrir des pistes d'associations thérapeutiques potentielles, permettant d'en augmenter l'effet tant en termes d'intensité de réponse que de durée.

Le troisième objectif était de tester l'effet de ces traitements combinés dans notre modèle murin.

L'hypothèse était que la FKN délivrée localement en site métastatique osseux, devait permettre d'augmenter l'infiltrat inflammatoire au sein de la métastase et qu'un traitement systémique, administré simultanément, en plus de son effet anti-tumoral propre, serait capable d'optimiser l'état d'activation des cellules immunitaires et de potentialiser la réponse anti-tumorale induite par la FKN.

L'objectif clinique, à terme, est de pouvoir développer un système de libération locale d'une chimiokine, la FKN (ciment chargé, nanoparticule...) sur le site de métastase osseuse de CNPC, au moment d'une chirurgie en cas de fracture pathologique ou par cimentoplastie en radiologie interventionnelle, en association avec un traitement systémique immunogène.

# Résultats

## A. CX3CL1 permet de contrôler le développement de métastases de cancer pulmonaire

### a. Résumé de l'article

Le rôle de la FKN dans la biologie du cancer est complexe : elle peut présenter à la fois des effets anti et pro-tumoraux. Le sens de cet effet dépend notamment de la structure de la FKN, de l'expression ou non de son Rc par les cellules tumorales, du type de cancer, de la localisation tumorale et du moment du développement tumoral.

Plusieurs études montrent que la FKN a un effet anti-tumoral dans le CNPC, soutenant une utilisation thérapeutique potentielle. Cependant, aucune publication ne documente ses effets dans le cas particulier des métastases osseuses de cancer du poumon.

Cette étude a pour objectif de déterminer si l'effet anti-tumoral de la FKN s'applique également aux métastases osseuses de cancer pulmonaire.

Pour répondre à cette interrogation, nous avons développé un modèle expérimental de métastases osseuses de CNPC. Nous avons utilisé des cellules de CE pulmonaire murin de la lignée LL2, exprimant soit un niveau faible (LL2-FKN<sub>lo</sub>) soit un niveau élevé de FKN (LL2-FKN<sub>hi</sub>) que nous avons injecté dans le fémur gauche de souris C57Bl/6. Nous avons alors comparé le développement tumoral induit par chacune de ces 2 lignées cellulaires. Afin de mettre en évidence les mécanismes sous-jacents aux effets induits par la FKN, les tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub> et les tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub> ont été soumises à des analyses histologiques, transcriptomiques et de cytométrie en flux.

Nos expériences ont montré que l'augmentation de l'expression de la FKN était associée à un fort effet anti-tumoral réduisant la taille des tumeurs osseuses de 52,4% ( $p=0,0004$ ), le processus d'invasion aux muscles adjacents de 25%, et la taille de la tumeur musculaire de 73% ( $p<0,0001$ ). La composition en leucocytes infiltrant les tumeurs était significativement différente

dans les 2 groupes. Les tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub> présentaient une augmentation des leucocytes potentiellement anti-tumoraux (monocytes inflammatoires, cellules NK et LB) comparés aux tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub>. En effet, les LB, particulièrement représentés au sein des tumeurs LL2-

FKN<sub>hi</sub>, sont capables d'induire une immunité anti-tumorale via l'ADCC et l'ADPC, pouvant impliquer également les NK et les monocytes-macrophages.

De plus, CX3CL1 permettait de rompre le cercle vicieux ostéolyse/ développement métastatique en induisant une augmentation de l'expression de l'OPG, une diminution de celle de RANKL, et une augmentation de celles de différentes BMP, permettant de promouvoir un profil ostéoblastique.

En conclusion, l'expression accrue de FKN dans les tumeurs osseuses LL2 est capable de réduire considérablement, à un moment du développement tumoral, le potentiel malin des cellules LL2. Cet effet pourrait résulter d'une perturbation du cercle vicieux liant la résorption osseuse et la prolifération des cellules tumorales, ainsi qu'à la génération d'un microenvironnement tumoral immunopermissif enrichi en cellules immunitaires potentiellement anti-tumorales, notamment en LB.

b. [Article original](#)



**CX3CL1'S ABILITY TO CONTROL THE DEVELOPMENT OF BONE METASTASES FROM LUNG CANCER: A PRECLINICAL STUDY**

Journal:	<i>International Journal of Cancer</i>
Manuscript ID	IJC-20-3105
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	13-Nov-2020
Complete List of Authors:	Cohen, Charlotte; Université Côte d'Azur, CNRS/INSERM, Institut de Biologie Valrose; Centre Hospitalier Universitaire de Nice Goguet, Emilie; Université Côte d'Azur, CNRS/INSERM, Institut de Biologie Valrose; Uniformed Services University of the Health Sciences, Department of Microbiology and Immunology Antomarchi, Julie; Institut de Biologie Valrose, Faculté de Médecine; Centre Hospitalier Universitaire de Nice Al-Sahlane, Rasha ; Université Côte d'Azur, CNRS/INSERM, Institut de Biologie Valrose; University of Baghdad, College of Sciences, Biotechnology Department Cherfils-Vicini, Julien ; Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de recherche sur le cancer et le vieillissement Glahenhaus, Nicolas; Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire Balaguer, Thierry; Université Côte d'Azur, Centre hospitalier universitaire de Nice Ambrosetti, Damien; Centre Hospitalier Universitaire de Nice Millet, Marie-Ange; Université Côte d'Azur, CNRS/INSERM, Institut de Biologie Valrose Karimdjee Soilihi, Babou; Université Côte d'Azur, CNRS/INSERM , Institut de Biologie Valrose; Polyclinique Saint-Jean Amoretti, Nicolas; Université Côte d'Azur, CNRS/INSERM, Institut de Biologie Valrose; Centre Hospitalier Universitaire de Nice Schmid-Antomarchi, Heidy; Université Côte d'Azur, CNRS/INSERM, Institut de Biologie Valrose Schmid-Alliana, Annie; Université Côte d'Azur, CNRS/INSERM, Institut de Biologie Valrose
Key Words:	CX3CL1, lung cancer, experimental bone metastases, tumor microenvironment

SCHOLARONE™  
Manuscripts

John Wiley & Sons, Inc.

**CX3CL1'S ABILITY TO CONTROL THE DEVELOPMENT OF BONE METASTASES FROM LUNG  
CANCER: A PRECLINICAL STUDY**

**Short title: CX3CL1's impact on experimental lung cancer metastases**

Charlotte Cohen<sup>1,\*</sup>, Emilie Goguet<sup>1,2,\*</sup>, Julie Antomarchi<sup>1</sup>, Rasha Al-Sahlane<sup>1,3</sup>, Thierry Balaguer<sup>1</sup>, Damien Ambrosetti<sup>1</sup>, Marie-Ange Millet<sup>1</sup>, Babou Karimdjee Soilihi<sup>1,4</sup>, Julien Cherfils<sup>1</sup>, Nicolas Glaichenhaus<sup>1</sup>, Nicolas Amoretti<sup>1</sup>, Heidy Schmid-Antomarchi<sup>1,§</sup> and Annie Schmid-Alliana<sup>1,§</sup>

<sup>1</sup>Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, CHU Nice, iBV, IRCAN, IPMC, Nice, France (voir les dernières recommandations)

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Immunology, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, MD, USA

<sup>3</sup>College of Sciences - Biotechnology Department, Bagdad, Iraq

<sup>4</sup>Pôle Santé St Jean, Cagnes/mer, France

**Footnotes:** \* both authors contributed equally to this work and § these *authors* act as equivalent co-senior *authors*

**Corresponding author :** Heidy Schmid-Antomarchi, UMR 7277 CNRS/UMR 1091 INSERM, Equipe BIPOA, Faculté de Médecine, 28 Avenue de Valombrose, 06107 Nice cedex 02, FRANCE

Email: [antomarc@unice.fr](mailto:antomarc@unice.fr) - Phone: 00 334 37 77 98 - Fax: 00 334 93 37 77 50.

**Research article, Molecular Cancer Biology**

**Key words:** CX3CL1, lung cancer, experimental bone metastases, tumor microenvironment

## List of abbreviations

<b>ACTB</b>	beta actin
<b>ADCC</b>	antibody-dependent cellular cytotoxicity
<b>ADCP</b>	antibody-dependent cellular phagocytosis
<b>ADGRE1</b>	adhesion G protein-coupled receptor E1 (F4/80)
<b>BMP</b>	bone morphogenetic protein
<b>CDC</b>	complement-dependent cytotoxicity
<b>CSF1</b>	colony stimulating factor 1
<b>DR5</b>	death receptor 5
<b>FAS</b>	fas cell surface death receptor
<b>FASL</b>	FAS ligand
<b>FOXP3</b>	forkhead box P3
<b>GZM</b>	granzyme
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	interferon $\gamma$
<b>IGKC</b>	immunoglobulin kappa light chain
<b>IL</b>	interleukin
<b>MMP</b>	matrix metalloproteinase
<b>NK cells</b>	natural killer cells
<b>NSCLC</b>	non-small cell lung cancer
<b>OPG</b>	osteoprotegerin
<b>PERF</b>	perforin
<b>PC</b>	plasma cell
<b>RANK</b>	receptor activator for nuclear factor- $\kappa$ B
<b>RANKL</b>	RANK ligand
<b>SDC1</b>	syndecan 1 (CD138)

<b>TIL-B</b>	tumor-infiltrating B lymphocyte
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	tumor necrosis factor $\alpha$
<b>TNFR</b>	TNF receptor
<b>TRAIL</b>	TNF-related apoptosis-inducing ligand
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor

**Novelty and impact :** An increased CX3CL1 expression in LL2 bone tumors drastically reduces, at one point during bone tumor development, cell malignant potential, possibly by disrupting the vicious cycle linking bone resorption and tumor cell proliferation as well as by generating an immunopermissive tumor microenvironment rich in cancer-fighting cells, in particular B lymphocytes. In that regard, CX3CL1 could be an interesting tool to increase and/or predict the success of immune-based therapies requiring immune cell trafficking.

Charlotte Cohen: cohen.c@chu-nice.fr

Emilie Goguet: emilie.goguet.ctr@usuhs.edu

Julie Antomarchi: julie.antomarchi@gmail.com

Rasha Al-Sahlanee: rasha.abdullah@sc.uobaghdad.edu.iq

Thierry Balaguer: balaguer.t@chu-nice.fr

Damien Ambrosetti: ambrosetti.d@chu-nice.fr

Marie-Ange Millet: mmillet@unice.fr

Babou Karimjee Soilihi: babou\_karimjee@hotmail.com

Julien Cherfils: julien.cherfils@unice.fr

Nicolas Glaichenhaus: glaichen@ipmc.cnrs.fr

Nicolas Amoretti: amoretti.n@chu-nice.fr

Heidy Schmid-Antomarchi: antomarc@unice.fr

Annie Schmid-Alliana: schmid@unice.fr

## Abstract

The chemokine CX3CL1/Fractalkine (FKN) was reported in numerous studies to have both pro-tumor and anti-tumor effects. Far from being contradictory, these studies underline the complex CX3CL1 action in cancer biology dependent on the CX3CL1 structure, the expression pattern of its receptor CX3CR1, the type of cancer, the tumor localization and/or the time points during tumor growth. We investigated whether CX3CL1 would act as an impediment or as a support to the development of non-small cell lung cancer (NSCLC) skeletal metastases.

We set up an *in vivo* experimental skeletal metastasis model using the LL2 lung cancer cell line expressing low or high levels of CX3CL1. The resulting LL2-FKN<sub>lo</sub> and LL2-FKN<sub>hi</sub> bone tumors, respectively, were analyzed using histological, flow cytometry and transcriptomic techniques.

The increased CX3CL1 expression was associated with a strong anti-tumor effect, significantly reducing both the size of the bone tumor and the size of the muscle-invading tumor in the FKN<sub>hi</sub> group compared to the FKN<sub>lo</sub> group. Both groups presented a significant difference in the composition of the tumor-infiltrating leukocytes, with an increase in potential anti-tumor leukocytes populations as well as immunity- and osteogenesis-related gene expression in the FKN<sub>hi</sub> group.

The increased CX3CL1 expression in the LL2 bone tumors was able to drastically reduce at some point during bone tumor development the tumor cells' malignant potential, possibly by disrupting the vicious cycle linking bone resorption and tumor cell proliferation as well as by generating an immunopermissive tumor microenvironment rich in cancer-fighting leukocytes, in particular B lymphocytes.

## Introduction

Lung cancer remains the leading cause of cancer-related death worldwide, with non-small cell lung cancer (NSCLC) accounting for 85% of the disease <sup>1</sup>. Nearly 40% of patients present disseminated metastatic disease at diagnosis <sup>2</sup>. Bone metastasis represents one of the most deleterious consequence of lung cancer, associated with dismal prognosis. As many as 30-40% patients with NSCLC develop bone metastases (BMs) with a median survival rate in these patients of about 6 months, the lowest for all solid tumors metastasizing to bone <sup>3</sup>. BMs are associated with bone metabolism disruption and in the vast majority of these skeletal lesions, osteolysis prevails over bone formation leading to the establishment of a “vicious cycle” between tumor cells and osteoclasts. The tumor cells produce factors that activate osteoclasts, thereby stimulating them to resorb bone and release growth factors from the bone that, in turn, influence the aggressive behavior of the tumor cells, causing them to release additional osteoclast-activating factors. BMs generate skeletal-related events (SREs), which may rapidly impede the quality of life of patients by causing pathological fractures, hypercalcemia, nerve compression and loss of mobility <sup>4</sup>. Despite the recent use of systemic therapies that block osteoclast activity, especially bisphosphonates and Receptor Activator for Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand (RANKL) inhibitor, BMs are still incurable, prompting the search for new therapeutic strategies, especially those based on the stimulation of the immune system.

Indeed, infiltration of tumors by lymphocytes, and in particular CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells, is known to be associated with a good prognosis in many types of cancer, including NSCLC <sup>5</sup>. The beneficial effect of a high abundance of tumor-infiltrating T cells reflects the ability of the immune cells to mount a response against cancer cells.

Extravasation and accumulation of leukocytes in tumors is largely influenced by chemokine gradients, which can be diversely blocked by tumor cells <sup>6</sup>. Consequently, only

a small number of leukocytes are generally able to infiltrate the tumor site <sup>7</sup>, which contrasts with inflammatory or infectious diseases. Hence the chemokines, as the main molecules responsible for leukocyte recruitment, appear as potential anti-cancer immunotherapy tools able to strengthen the targeting of leukocytes to tumor sites.

Unlike other chemokines, which are exclusively synthesized as small soluble chemoattractant peptides (except CXCL16) <sup>8-10</sup>, the fractalkine (FKN, CX3CL1) is synthesized as a large membrane-bound molecule, that can be cleaved by proteolytic activity to yield a soluble protein. Each form is associated with a specific function, the soluble form being involved in leukocyte recruitment (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, monocytes, B cells, neutrophils, natural killer (NK) and dendritic cells)<sup>11-15</sup> while the membrane-bound form induces firm cellular adhesion, such as leukocyte adhesion to endothelial cells under physiological flow <sup>15</sup>; both forms mediate their action via the highly selective receptor CX3CR1. The role of the CX3CL1/CX3CR1 axis in the neoplastic process is complex. Indeed, CX3CL1 is known for its tumor-suppressive activity in various cancer models and for its role as a positive prognosis marker in several types of solid tumors <sup>11, 16-18</sup>, but on the other hand, it has been shown that interactions between CX3CL1<sup>+</sup> endothelial and stromal cells and CX3CR1<sup>+</sup> tumor cells (breast, prostate notably) were determinant in the arrest and initial lodging necessary for skeletal metastasis <sup>16, 19, 20</sup>. In NSCLC, several studies have shown that the activation of the CX3CL1/CX3CR1 axis has an important anti-tumor effect <sup>21</sup> while others studies clearly demonstrate a pro-tumoral action of CX3CL1<sup>22-24</sup>. Far from being contradictory, these studies underline that the pro- or anti-tumor effect of CX3CL1 depends both on the tumor characteristics, the tumor microenvironment and the tumor growth stage. In any case, the CX3CL1/CX3CR1 axis seems to have a real impact on the development of NSCLCs, prompting in-depth investigation, especially on bone metastases, for which no study has been reported.

Interestingly, CX3CL1 has been described for its contribution to bone metabolism through its positive control, as a membrane-bound molecule, of osteoclastic differentiation<sup>25,26</sup>. Because of its involvement in anti-tumor immune response, bone metastasis addressing and osteoclastic activity, the CX3CL1/CX3CR1 axis could represent a double-edged sword in an immunotherapy approach targeting bone metastases.

We investigated whether CX3CL1 would act as an impediment, or on the contrary, as a support to the development of lung cancer skeletal metastases.

We examined the effects of an increased bone tumor-CX3CL1 expression on tumor growth, using a syngeneic murine model of experimental bone metastases from lung cancer.

Our results highlight the ability of CX3CL1 to generate at some point during bone tumor development an anti-tumor microenvironment and, thus, to slow down tumor growth in this specific setting.

## Materials and Methods

### Animals and cell lines

Female C57/Bl6, 6-8 weeks of age, were purchased from Harlan (Gannat, France). The LL2 cells (Lewis Lung cancer (RRID:CVCL\_4358), ATCC, USA), a murine spontaneous epidermoid carcinoma cell line derived from C57/Bl6 mice, stably transfected with empty pCI-neo vector (Promega, France) were maintained in DMEM medium (Lonza, Switzerland) supplemented with 10% heat-inactivated Hyclone FCS (GE Healthcare, USA), 50 U/ml streptomycin, 50 U/ml penicillin and 1 mg/ml neomycin (Lonza, Switzerland). LL2 cells were subjected to serial dilutions to select cell clones expressing low or high levels of CX3CL1 (LL2-FKN<sub>lo</sub> and LL2-FKN<sub>hi</sub>, respectively). Chemokine expression was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (mouse CX3CL1 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems) and cell proliferation was determined using a cell proliferation kit (Roche, USA). The selected LL2-FKN<sub>lo</sub> and LL2-FKN<sub>hi</sub> cell clones, showed *in vitro* similar proliferation rates and respectively produced CX3CL1 levels of 0.024 and 0.304 ng/ml/24hr/10<sup>6</sup> cells (i.e. 12 times more in LL2-FKN<sub>hi</sub> than in LL2-FKN<sub>lo</sub>).

### Experimental bone metastasis

All the procedure involving animals and their care were conducted in accordance with institutional guidelines in the IRCAN animal facility and after approval by the national ethics committee. After a 2 week-acclimatization period, the mice were randomly distributed in 2 groups: LL2-FKN<sub>lo</sub> and LL2-FKN<sub>hi</sub> (12 mice/group).

For the induction of experimental bone metastases from lung cancer origin, the mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of Ketamine/Xylazine (125 and 6.3 mg/kg, respectively) before performing the surgery once a deep plane of anesthesia is achieved.

The skin was incised and the underlying muscle fibers were separated to gain access to the greater trochanter. An access to the medullary cavity was realized by performing a femoral reaming with a 25G needle, left in place until injection of the cells. The cells (LL2-FKN<sub>lo</sub> and LL2-FKN<sub>hi</sub>) were resuspended ( $5 \times 10^5$ ) in a solution consisting of 10  $\mu$ l of platelet poor-plasma (collected from a C57/Bl6 female and prepared under sterile conditions) and 1  $\mu$ l of 2% CaCl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (for coagulation) right before intramedullary injection, using a 0.5 ml insulin syringe. The incision was closed by one suture (nonabsorbable nylon 4.0; Surgical Specialties, USA). For the entire duration of the experiment, the mice were treated with pediatric paracetamol (100 mg/kg/day) and tramadol (20 mg/kg/day), both administered via drinking water.

Fifteen days after tumor induction, the mice were sacrificed and both hind legs were harvested. Both legs were weighted whole after sacrifice. The soft tissues (muscle tissue + muscle-invading tumor) were separated from the bone before further processing. A biopsy of the muscle-invading tumor was immediately frozen at -80°C for qPCR analysis while the femur was prepared for histological analysis. The remaining soft tumor tissues were processed for FACS analysis of tumor-infiltrating leukocyte population while the femur was fixed in a FineFIX solution (Milestone Srl, Italy) for histological analysis.

### **Flow cytometry analysis**

Flow cytometry analysis of tumor-infiltrating leukocytes populations was performed on muscle-invading tumor samples. The soft tumor tissues were first manually minced into small fragments then digested in HBSS (Sigma-Aldrich, USA) containing 1 mg/ml collagenase A (Roche, Switzerland) and 0.1 mg/ml DNase I (Roche, Switzerland) at 37°C for 40-50 minutes, under agitation. After incubation, the cell suspension was filtered through 2 successive cell strainers (100  $\mu$ m then 40  $\mu$ m) and centrifuged. Red blood cells

were lysed for 10 min in a lysing solution (145 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub> and 1 mM EDTA). After 1 washing step in a PBS solution with 3% Hyclone and 5 mM EDTA, the cells were centrifuged and resuspended in a PBS solution with 0.5% Hyclone serum and 2 mM EDTA.

Phenotypic analysis of infiltrating leukocyte populations was performed by staining with the following antibody mixes:

- **Lymphoid lineage:** APC-Cy7-conjugated anti-CD45 (30-F11; BD Biosciences), PE-Cy7-conjugated anti-CD3 (17A2; BD Biosciences), FITC-conjugated anti-CD4 (RM4-4; BD Biosciences), APC-conjugated anti-CD8 (53-6.7; BD Biosciences), PE-conjugated anti-NK1.1 (PK136; eBioscience), and BD Horizon PE-conjugated anti-B220 (RA3-6B2; BD Biosciences).
- **Myeloid lineage:** APC-Cy7-conjugated anti-CD45 (30-F11; BD Biosciences), eFluor450-conjugated anti-F4/80 (BM8; eBioscience), APC-conjugated anti-CD11b (M1/70; eBioscience), PE-Cy7-conjugated anti-CD11c (N418; eBioscience), FITC-conjugated anti-Ly6G (1A8; BD Biosciences), PerCP-Cy5.5-conjugated anti-Ly6C (HK1.4; eBioscience), PE-conjugated anti-B220 (RA3-6B2; Pharmingen), and Alexa Fluor 700-conjugated anti-MHC II (I-A / I-E) (M5/114.15.2; eBioscience).

4x10<sup>6</sup> cells/sample were incubated with each antibody mix for 30 minutes at +4°C, in the dark. After a washing step, cells were resuspended in ice-cold PBS/ 0.5% BSA/ 2.5 mM EDTA, until ready for analysis.

In order to get more information concerning T cell function, infiltrating leukocyte populations were stained with a third antibody mix: Alexa Fluor 700-conjugated anti-CD45 (30-F11, BioLegend), FITC-conjugated anti-CD4, BV650-conjugated anti-CD8 (SK1, BioLegend), and PE-Cy7-conjugated anti-CD3. 2x10<sup>6</sup> cells/sample were incubated with the antibody mix for 30 minutes at +4°C, in the dark. After a washing step, cells were

resuspended in ice-cold PBS/ 0.5% BSA/ 2.5 mM EDTA, then fixed using the Fix/Perm buffers kit, according to the manufacturer's instructions (BioLegend). After fixation, the cells were washed then incubated with BV421-conjugated anti-FOXP3 antibody (MF14, BioLegend), for intracellular staining. Cells were then washed and resuspended in ice-cold PBS/ 0.5% BSA/ 2.5 mM EDTA until ready for analysis.

Flow cytometry acquisitions were carried out using a LSR-Fortessa (BD Biosciences, USA) or an ARIA III cell analyzer (BD Biosciences), and data analyses were performed using the Kaluza software (Beckman Coulter, USA) and the FlowJo software (V.10, Tree Star), respectively.

### **Gene expression analysis**

Total RNA from soft tumor tissues, or cultured cells, was extracted using a NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel, Germany) and reverse-transcribed into cDNA using the Superscript III enzyme (Invitrogen, USA) in a Flexicycler (Analytik Jena, Germany). Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies, USA) and carried out using SYBR Premix Ex Taq II, Tli RNase H Plus (Takara, Japan). Relative levels of mRNA expression were determined using  $\Delta C_T$  values obtained by subtracting  $C_T$  control (actin) from  $C_T$  target gene, measured in the same RNA preparation (primer sequences of target genes listed in table 1).

The Comparative  $C_T$  Method ( $\Delta\Delta C_T$  Method) was then used, where the mean  $\Delta C_T$  values for the LL2-FKN<sub>lo</sub> group were compared to the mean  $\Delta C_T$  values for the LL2-FKN<sub>hi</sub> group ( $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ LL2-FKN}_{hi} - \Delta C_T \text{ LL2-FKN}_{lo}$ ). The final result for each analyzed gene was expressed as a stimulation/inhibition factor given by the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  formula<sup>27</sup> and taking 2 as the cut-off value.

## **Histology**

The femur samples were fixed in a FineFIX solution (Milestone Srl, Italy) for 24 hr, then decalcified in a 10% EDTA solution at 37°C for 15-20 days. After decalcification, the femurs were sectioned in two to three pieces longitudinally and embedded in paraffin. Serial sections of 4 µm were deparaffinized, hydrated and stained with Haematoxylin-Eosin (H&E) for morphological analysis. Selected H&E-stained sections were scanned, using a x100 objective scanning system Leica SCN 400 (Leica, Germany). Each scan was visually inspected for scan-quality before subsequent review and analysis by an experimented anatomopathologist (Laboratoire Central d'Anatomopathologie, CHU Pasteur Nice).

## **Statistical analysis**

Statistical comparisons were performed using the non-parametric Mann & Whitney *U*-test and p values less than 0.05 were considered statistically significant.

## Results

### Gene expression in Lewis lung carcinoma cells

Cells were first checked by qPCR for *Cx3cl1* and *Cx3cr1* mRNA expression. Consistent with protein expression level, *Cx3cl1* mRNA expression was significantly higher in LL2-FKN<sub>hi</sub> cells than in LL2-FKN<sub>lo</sub> cells (Figure 1). In contrast, neither the LL2-FKN<sub>hi</sub> cells nor the LL2-FKN<sub>lo</sub> cells expressed *Cx3cr1* mRNA. This ensured that any potential effect that we could observe would not be the result of an autocrine loop (Figure 1).

LL2-FKN<sub>hi</sub> and LL2-FKN<sub>lo</sub> cells were also tested for the mRNA expression of the TNF-family death receptors *Fas*, *Dr5*, *Tnfr-1a* and *Tnfr-1b*. Both cell groups expressed these genes at similar expression levels (data not shown).

### Increased CX3CL1 expression reduces bone tumor burden

In order to assess the bone tumor extent, the tumor-bearing bones were first analyzed by histology. The tumor extent was evaluated by an experienced anatomopathologist and expressed in mm, as the spreading of tumor cells along the femoral shaft, on longitudinal bone sections (Figure 2A). A statistically significant decrease in median bone tumor extent could be observed in the LL2-FKN<sub>hi</sub> group compared to the LL2-FKN<sub>lo</sub> group (10.5 mm vs 5.00 mm, respectively; i.e. 52% decrease;  $p=0.0004$ ) (Figure 2B). The extent of necrosis was also evaluated histologically by two independent pathologists (Figure 2C); it was expressed as the percentage of necrotic areas in the tumor tissues and showed a statistically significant decrease of necrosis in the LL2-FKN<sub>hi</sub> tumors compared to LL2-FKN<sub>lo</sub> tumors (median necrosis extent of 2.5% vs 15%, respectively; i.e. 83% decrease;  $p=0.0056$ ) (Figure 2D).

### **Increased CX3CL1 expression reduces tumor invasive potential**

Bone metastases tumor cells possess the ability to invade adjacent tissues, including muscles, depending on their aggressiveness. Indeed, palpable muscle tumors could be observed in the thigh muscles, adjacent to the bone tumor developing in the femur (Figure 3A). However, if an important tumor invasion of the thigh muscles (mainly the *biceps femoralis* and the *vastus lateralis*) could be observed in 100% of the mice from in the LL2-FKN<sub>lo</sub> group, only 75% of the mice from the LL2-FKN<sub>hi</sub> group were affected.

Moreover, the median tumor weight was significantly reduced by 73% in the LL2-FKN<sub>hi</sub> group compared to the LL2-FKN<sub>lo</sub> group (median weight of 0.83 g vs 3.08 g, respectively;  $p=0.0002$ ) (Figure 3B).

### **Immunity-related events contribution to the tumor-suppressive activity of CX3CL1**

Soluble CX3CL1 has been described as a chemotactic factor for several distinct leukocyte subpopulations<sup>11-15</sup>, which prompted us to investigate the immune mechanisms behind the anti-tumor activity in this model of experimental bone metastasis of lung cancer origin. The flow cytometry data exhibited greater leukocytes infiltrates in LL2-FKN<sub>hi</sub> tumors than in LL2-FKN<sub>lo</sub> tumors (CD45<sup>+</sup> cells) (Figure 4A). However, only a few leukocytes subpopulations were impacted. Indeed, flow cytometry analysis of LL2-FKN<sub>hi</sub> tumors showed a significant infiltration increase of inflammatory monocytes (Figure 4B), B cells (Figure 4C), NK cells (Figure 4D) (5.9-, 3.4- and 3-fold increase, respectively), whereas the CD4<sup>+</sup> T cell (Figure 4E) and CD8<sup>+</sup> T cell (data not shown) counts were similar in both tumor groups, LL2-FKN<sub>hi</sub> and LL2-FKN<sub>lo</sub>. Nevertheless, among the CD4<sup>+</sup> T cells, the percent of the Treg cells (Figure 4F) were significantly increased in LL2-FKN<sub>hi</sub> tumors compared to LL2-FKN<sub>lo</sub> tumors (median value of 31.5% versus 15.2%,  $p=0.010$ , respectively).

In agreement with the flow cytometry results, the transcriptomic profile comparison of both tumor types revealed in LL2-FKN<sub>hi</sub> tumors a statistically significant up-regulation for *F4/80*, *Cd19* and *Foxp3* mRNAs (3.0-fold p=0.001, 9.9-fold p=0.008, 8.4 fold p=0.014, respectively), which are considered reliable markers for monocytes, B cells and Treg cells, respectively (Figure 5). In addition, *Cd138* and *Igkc* gene transcripts, viewed in NSCLC<sup>28</sup> as relevant plasma cell markers, were significantly increased in LL2-FKN<sub>hi</sub> tumors compared to LL2-FKN<sub>lo</sub> tumors (3.4-fold increase, p= 0,01 and 4.7-fold increase, p=0.027, respectively ).

This comparative qPCR analysis also highlighted significant differences in the expression of multiple immunity-related genes, such as chemokines and cytokines (Figure 5).

In agreement with a higher inflammatory macrophage rate in LL2-FKN<sub>hi</sub> tumors, we observed significant up-regulations of *Il-1 $\beta$*  (2.4-fold increase, p=0.009) and *Il-6* (5.4-fold increase, p=0.04). Moreover, consistent with higher Treg cell rate, higher *Il-10* expression was highlighted in LL2-FKN<sub>hi</sub> tumors compared to LL2-FKN<sub>lo</sub> tumors (3-fold increase, p=0.001). Among the other tested factors, we observed significant up-regulations of *Mmp2* (9.9-fold increase, p=0.02), *Mmp9* (7.3-fold decrease; p=0.002), *Trail* (3.8-fold increase, p= 0.03), *Vegfa* (5.8-fold increase, p=0.02) and *Vegfc* (5.8-fold increase; p=0.02) mRNAs, in LL2-FKN<sub>hi</sub> tumors whereas *Gzmb*, *Gzmc* and *Perf* mRNAs were down-regulated (3.4-fold decrease, p= 0.004 ; 5.6-fold decrease, p= 0.03 and 4.4-fold decrease, p= 0.0048, respectively). *Ccl2*, *Ccl5*, *Fasl*, *Gzma*, *Ifn $\gamma$* , *Il-1 $\alpha$* , *Il-12*, *Csf1*, and *Tnf $\alpha$*  mRNAs were unchanged (data not shown).

### **Disruption of the bone tumor “vicious cycle” by increased CX3CL1 expression**

In LL2-FKN<sub>hi</sub> tumors, quantitative real time PCR revealed also a statistically significant up-regulation for several transcripts of genes involved in bone metabolism, such as the

Bone Morphogenic Proteins, *Bmp2* (7.7-fold increase; p=0.0007), *Bmp3* (7.6-fold increase, p=0.0035), *Bmp4* (15.9-fold increase; p=0.0008), *Bmp5* (14.1-fold increase; p=0.018), and *Opg* (8.9-fold increase; p=0.0021). In contrast, statistically significant down-regulation of *Rankl* (2.3-fold decrease, p=0.0008) and *Bmp6* (10.9-fold decrease p= 0.002), mRNA was observed (Figure 5) whereas *Bmp1* and *Rank* gene transcripts were unchanged (data not shown).

## Discussion

The aim of this study was to investigate the potential anti-tumor effect of CX3CL1 in bone metastases from lung cancer using an experimental tumor model in a syngeneic mouse. Our data clearly show that increased CX3CL1 expression by LL2 tumors strongly reduces their overall growth in the bone compartment and their expansion into the adjacent muscles.

This anti-tumor effect of CX3CL1 was associated with a significant recruitment of specific leukocyte subsets: inflammatory monocytes, B cells, NK cells and higher ratios of CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg among CD4 T cells as well as significant modifications in immunity- and bone-related gene expression in the tumor microenvironment.

Altogether our data highly suggest several possible mechanisms to explain the anti-tumor effect of CX3CL1 in this model of experimental bone metastasis from lung cancer.

Dysregulation of the functional equilibrium in the RANK/RANKL/OPG triad is largely described to be responsible for the tumor bone-associated osteolysis and is resulting in the combination of increased bone resorption with little to no bone repairs. Rationally, the most promising strategy to counteract bone tumor progression should therefore to be able to inhibit the osteolytic process as well as to stimulate bone reconstruction. In this line, the analysis of the transcriptomic profile of LL2-FKN<sub>hi</sub> tumors showed a significant increase of *Opg* transcripts as well as a significant decrease of *Rankl* transcripts, leading to the reduction of both differentiation and function of osteoclasts <sup>29,30</sup>. At the same time, an increase of several *Bmp* transcripts suggested osteoblastogenesis stimulation.

All these effects seem to indicate that the increased intra-tumoral CX3CL1 expression promotes a shift from an osteoclastic phenotype to an osteoblastic one. This phenotypic switch in the tumor microenvironment favors a decrease in the osteolytic activity, and

could thus disrupt the vicious cycle linking bone resorption and tumor cells proliferation, that would otherwise been established in a bone tumor microenvironment<sup>30</sup>. This feature could explain, at least in part, the decrease in tumor burden that was observed in the LL2-FKN<sub>hi</sub> tumor group compared to the LL2-FKN<sub>lo</sub> group. In addition to its central role in tumor-induced osteolysis, bone destruction and tumor progression, there is emerging evidence for direct pro-metastatic effects of RANKL, independent of osteoclasts. Indeed, RANKL has the ability to stimulate metastasis via its action on RANK-expressing cancer cells, resulting in an increased invasion, migration and proliferation index<sup>31</sup>. Recent studies have shown the functional expression of RANK, RANKL and OPG by human non-small lung cancer cells<sup>32</sup>.

As the samples used for the transcriptomic analysis are from muscle-invading tumors, we cannot exclude that a regulation such as that one occurs in our model. Thus, in this extra-osseous environment, the increase of OPG leading to the trapping of RANKL could directly inhibit the mobility and development of lung cancer cells. Still because of this extra-osseous environment, the sources of *Opg* transcripts are most probably another cell population than the osteoblasts, as usually described in the bone metabolism. In 2010, Pacifici *et al.* described the B cells as the major source of OPG *in vivo*, exceeding the osteoblast population in this aspect<sup>33</sup>. Indeed, the increase of *Opg* transcripts we could observe in the LL2 FKN<sub>hi</sub> group was positively correlated with a statistically significant increase of intra-tumor recruitment of B cells. In addition to this role as a potential source of OPG, and thus as an actor in downregulation of tumor-related osteolysis, B cells have been linked to the immune anti-tumor response<sup>34</sup>.

The B cell contribution to the anti-tumor responses has been far less investigated than those of T cells and NK cells. It is only recently that their role in controlling cancer progression has become evident. There remains, however, considerable controversy over

the influence of tumor-infiltrating B lymphocytes (TIL-Bs) and antibody-producing plasma cells (PCs) even if, in human cancers, most studies reported a positive or neutral prognostic effect for TIL-B and PC, with only a small minority reporting a negative effect. In non-small cell lung cancer, the presence of TIL-Bs has, however, been linked to a favorable clinical outcome, and the infiltration of mature PCs into tumor tissue has been associated with prolonged survival <sup>28</sup>.

The tumor microenvironment contains a heterogenous population of B cells with functionally distinct subsets, contributing to both pro- as well as anti-tumor immune responses. The balance among subtypes, resulting from dynamic conversion processes of B cells, is at least partially regulated by the tumor microenvironment, and may determine whether B cells have a pro- or anti-tumorigenic function <sup>35</sup>.

B cells, including PCs, express CX3CR1 and are known to be recruited by CX3CL1, however B cell recruitment induced by CX3CL1 in solid tumors has never been reported, as well as its potential impact on tumor development <sup>36</sup>.

There are, in this context of bone metastases from lung cancer, some indications that B cells could contribute to the CX3CL1 anti-tumor effects. Indeed, B cells are able to suppress tumor progression by secreting immunoglobulins, promoting T cell response, killing cancer cells directly and also by maintaining the structure and function of tertiary lymphoid structure <sup>37</sup>. In line with that, our data have shown that a higher CX3CL1 expression in the tumor microenvironment was associated to higher *Cd138* and *Igkc* mRNAs tumor expression, which are considered the most relevant markers for antibody-secreting plasma cells <sup>38</sup>. Thus, in a CX3CL1-rich tumor microenvironment, plasma cell-derived tumor specific-antibodies could mediate tumor lysis by complement-dependent cytotoxicity (CDC), antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) or antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP).

If the CDC mechanism only involves antibodies and tumors cells expressing target antigen, in contrast, the ADCC and ADCP mechanisms also require immune effector cells expressing Fc-gamma receptors (FcγRs). Thus, ADCC is predominantly attributed to NK cells, although monocytes/macrophages, especially those of M1-like phenotype, may also induce ADCC<sup>39,40</sup>. However, increasing evidence supports a major role for macrophages in tumor cell elimination, especially via their contribution in the ADCP mechanism<sup>41</sup>.

Interestingly, the increased intratumoral CX3CL1 expression was correlated to a population increase of NK cells and M1-like macrophages in the tumor micro-environment.

Thus, NK cells, as well as inflammatory monocytes/macrophages, could exercise their cell-mediated cytotoxic activity via the directed release of lytic granules containing perforin and granzymes, or via the induction of death receptor-mediated apoptosis by expressing TRAIL and/or Fas ligand to engage TRAIL receptors (DR4, DR5) or CD45/Fas, respectively, on the surface of target cells. These two distinct cytotoxic mechanisms were shown to act on different time scales with rapid granule-mediated cell death and slower TRAIL receptors-induced apoptosis<sup>42</sup>. Moreover, a recent study has highlighted that NK cells switch from inducing a fast granule-mediated cell death in their first killing events to a slow death receptor-mediated killing during subsequent tumor cells encounters<sup>43</sup>. It would seem that death receptor-mediated apoptosis become more prominent only after depletion of the majority of granules and increased expression of surface death ligands. Gradual loss of perforin and granzymes could thus be functionally compensated by death-receptor pathway to ensure effective cellular cytotoxicity. However, while practically all tumor cells are sensitive to granule-mediated killing, death receptor-mediated apoptosis requires the presence of CD95/Fas or TRAIL receptors DR4/R5.

In LL2-FKN<sub>hi</sub> tumors, perforin and granzymes expression was reduced and TRAIL was enhanced suggesting that lytic granule reserves were exhausted and death receptor-mediated killing ensured cellular cytotoxicity, in this group compared to LL2-FKN<sub>lo</sub> tumors. Consistent with this assumption, TRAIL receptors DR5 are expressed on LL2-cells.

In-depth analysis of the transcriptomic profile, leukocyte tumor infiltration as well as the CX3CL1 protein structure (membrane-bound and soluble), at different stages of bone tumor development, seems required in order to explain the counterintuitive overexpression of several cell markers or factors linked to tumor proliferation and metastasis (such as Foxp3, IL-10, MMP2 or VEGFs) <sup>44</sup> in the LL2-FKN<sub>hi</sub> tumors while the bone tumor extent is clearly reduced, as well as the tumor invasiveness into adjacent muscle tissues, in this group compared to the LL2-FKN<sub>lo</sub> group. However, it is likely that the increase in such markers announces a tumor microenvironment switch from anti-tumor phenotype toward tumor-supporting one. The increase in Tregs, known as essential actors in the immune escape of tumors, as well as the increase in VEGFs, critical factors for tumor vascularization, especially support this assumption. It would be very instructive to submit LL2-FKN<sub>hi</sub> tumors to therapeutic strategies targeting Tregs and their secreted factors and/or to strategies targeting angiogenesis that, we believe, could enhance/prolong the effects of increased CX3CL1 expression.

It is the expression of various immune mediators and modulators as well as abundance and activation state of different cell types in the tumor microenvironment that dictate in which direction the balance is tipped and whether tumor-promoting inflammation or anti-tumor immunity will ensue. It is safe to assume that tumor-promoting inflammation and anti-tumor immunity co-exist at different points along the path of tumor progression

and that environmental and microenvironmental conditions dictate the balance between the two <sup>44</sup>.

Our results highlight the ability of CX3CL1 to tip this balance at one point during bone tumor development in favor of anti-tumor immunity and, thus, to slow down the tumor growth. It is reasonable to believe that the CX3CL1 anti-tumor effects might be prolonged if the immunosuppressive drift of tumor microenvironment is prevented or fought.

In the past decade, immune-based therapies, especially immune checkpoint inhibitors, have become an integral part of contemporary cancer treatment. However, a fundamental prerequisite for the success of such therapies is a sufficient trafficking of tumor-infiltrating leukocytes into the tumor microenvironment. As a consequence, strategies to improve cancer immunotherapies through enhancing immune cell infiltration are being explored.

Because CX3CL1 is able to drive lymphocytes and other cancer fighters into the tumor microenvironment, CX3CL1 might be able to increase the success of such therapies. In this case, the CX3CL1 role into bone metastasis from lung cancer might serve as a predictive factor for response to these immune-based therapies.

## **Acknowledgments and disclosures**

### **Acknowledgements**

We would like to thank the staff of the IRCAN animal facility, especially Marielle Maret, José Rubi Correia Merlé and Sami Smara, for excellent handling and care of animals

### **Conflicts of interest**

There are no conflicts of interest to disclose.

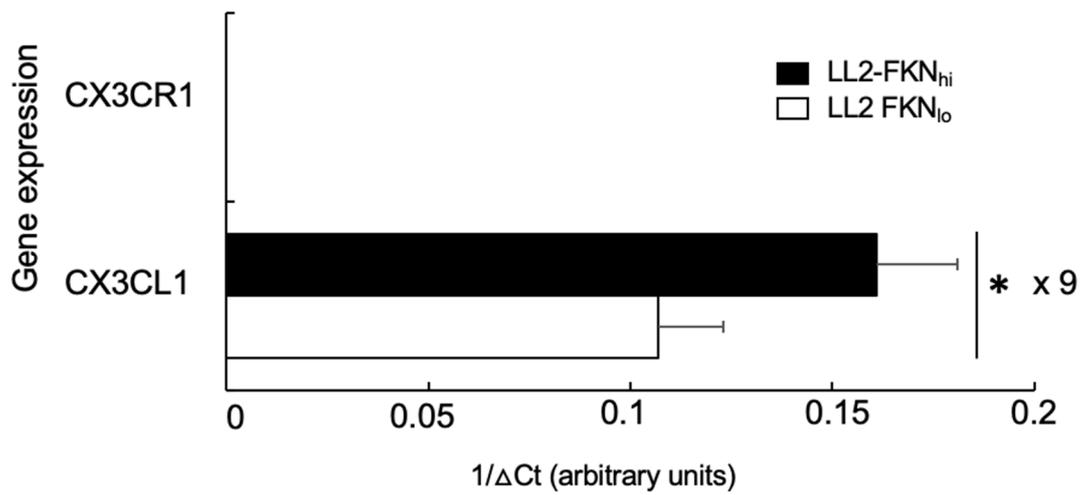
### **Ethical statements**

All the procedure involving animals and their care were conducted in accordance with institutional guidelines in the IRCAN animal facility (Accreditation B0608815, Permission of the Principal Investigator N° 06-126) and after approval by the national ethics committee (Permit number APAFIS#8529-2017010413143140).

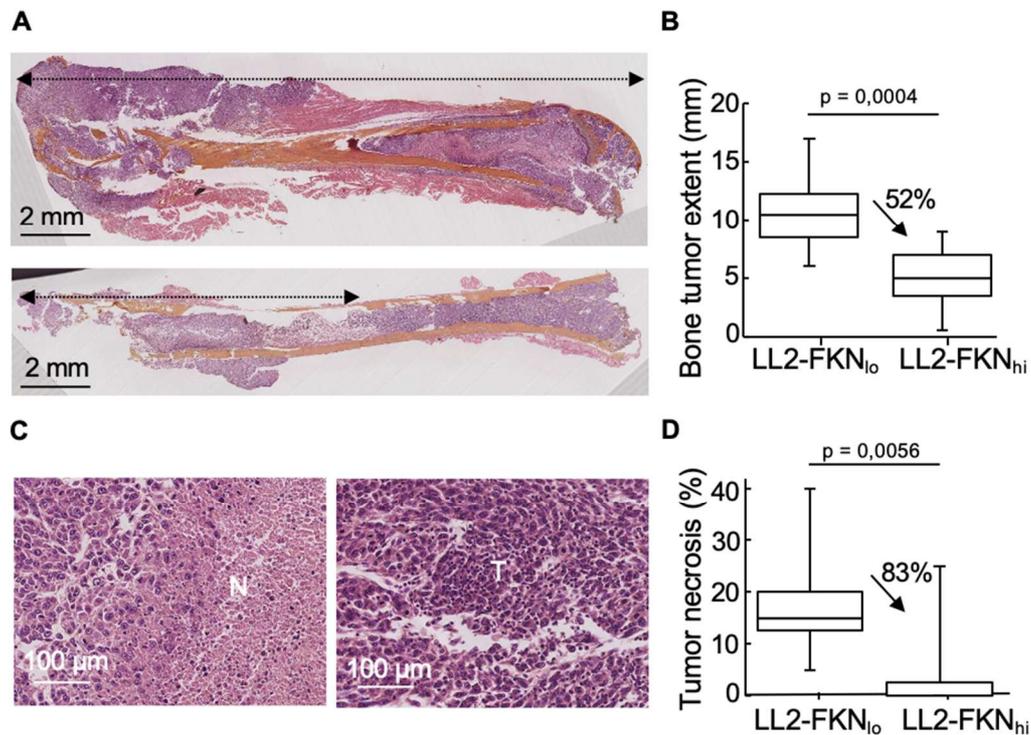
### **Funding**

This study was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche médicale (INSERM), the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) of Nice and GOTHa (Groupe d'Oncologie Thoracique Azuréen). IRCAN animal facility is supported by FEDER, Région Provence Alpes-Côte d'Azur, Conseil Départemental 06 and Inserm.

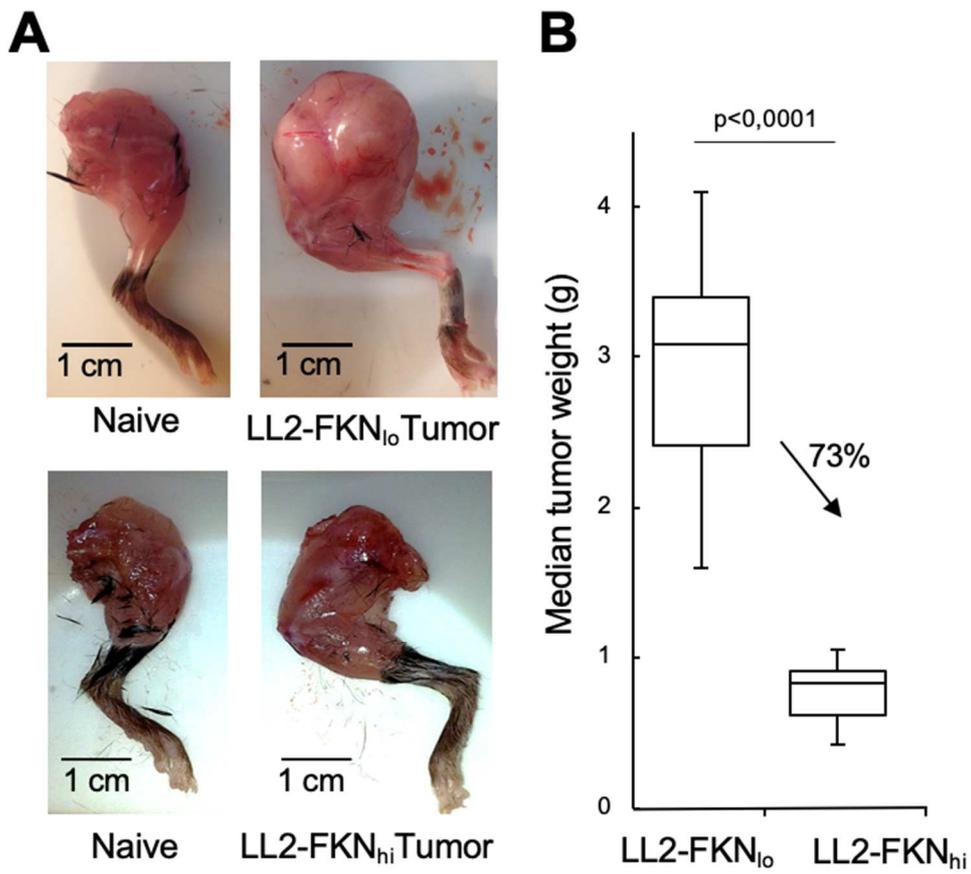
## Figures



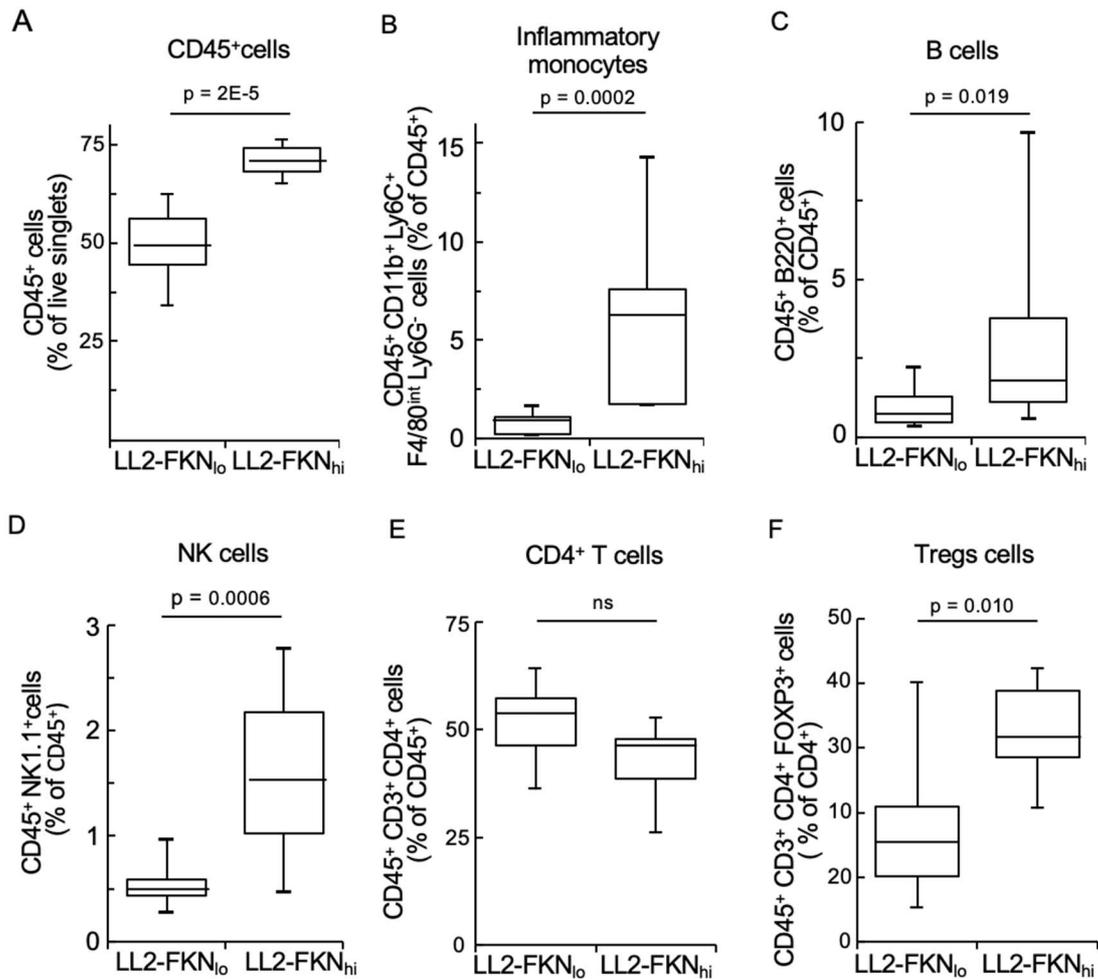
**Figure 1. Real-time PCR analysis of the *Cx3cl1/Cx3cr1* pair expression in LL2-FKN<sub>hi</sub> compared LL2-FKN<sub>lo</sub> cells.** The values are means of three independent measurements, the error bars represent standard deviations and the asterisks indicate statistically significant values,  $P < 0.01$ .



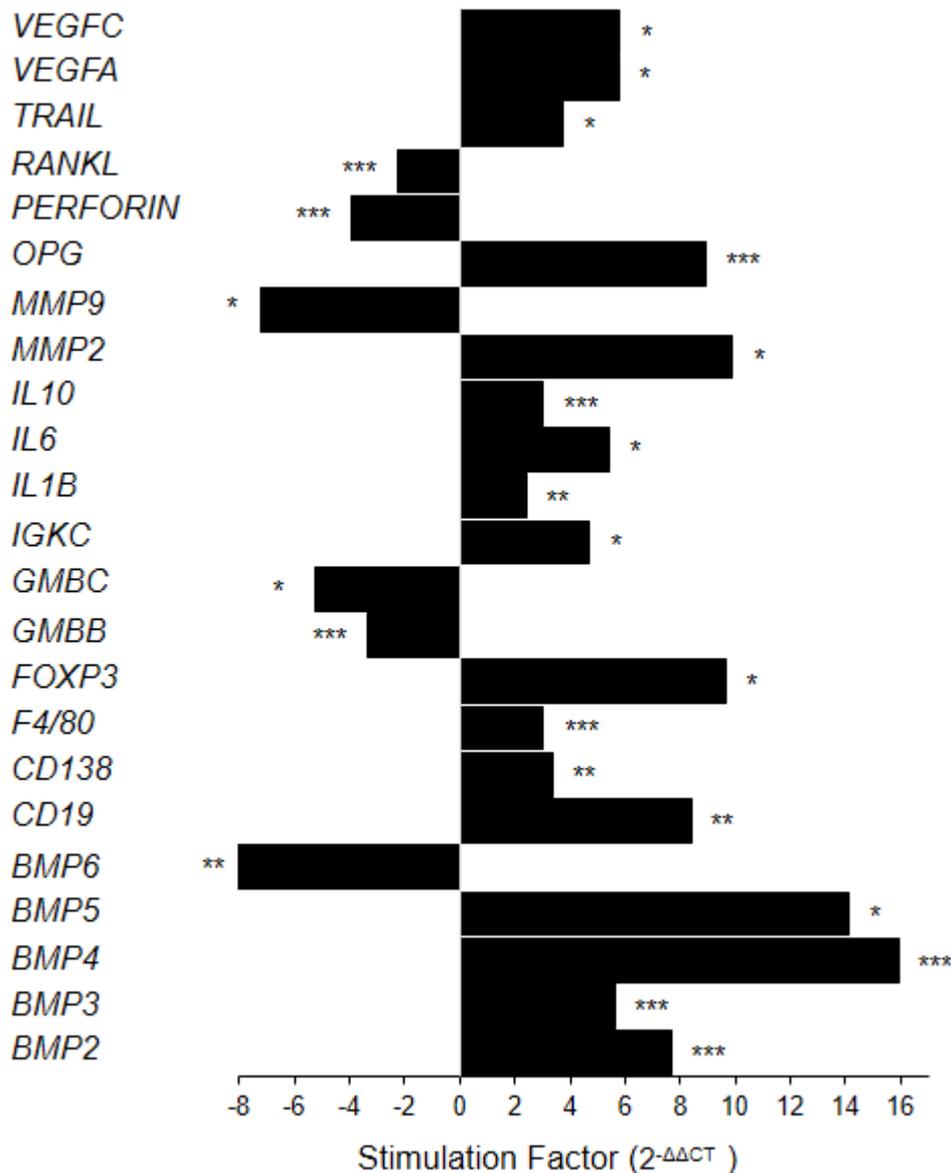
**Figure 2. Comparative histological analysis of bone tumors expressing high or low CX3CL1 level.** (A) Representative H&E staining of tumor-bearing femurs from the LL2-FKN<sub>lo</sub> group (upper panel) and LL2-FKN<sub>hi</sub> group (lower panel); the arrows represent the bone tumor extent on the longitudinal sections. (B) Assessment of bone tumor extent by measuring the length of tumor tissue along longitudinal femur sections, expressed in mm. (C) H&E-stained sections magnification (x20) of bone tumors from the LL2-FKN<sub>lo</sub> group (left panel) and LL2-FKN<sub>hi</sub> group (right panel); area of necrosis (N) in a LL2-FKN<sub>lo</sub> tumor; extensive leukocyte infiltration in a LL2-FKN<sub>hi</sub> tumor (T). (D) Histologic evaluation of necrotic areas in the tumors.



**Figure 3. Effects of increased intratumoral CX3CL1 expression on tumor development and invasiveness.** Representative crude photographs of the control hind leg (right leg) and the tumor-bearing hind leg (left leg) of mice injected with LL2-FKN<sub>lo</sub> (upper panel) or LL2-FKN<sub>hi</sub> tumor cells (lower panel). (B) Weight comparison of the tumor-bearing hind legs.



**Figure 4. Phenotypic characterization of tumor-infiltrating leukocyte subsets in LL2-FKN<sub>hi</sub> and LL2-FKN<sub>lo</sub> tumors.** The flow cytometry analysis of tumor-infiltrating leukocytes subsets were performed on muscle-invading tumor samples. (n=12 mice/group). (A) Frequency of CD45<sup>+</sup> cells as a percentage of live single cells. (B-E) Frequency of inflammatory monocytes, B cells, NK cells and CD4<sup>+</sup> T cells, respectively, as a percentage of CD45<sup>+</sup>-gated cells. (F) Frequency of Treg cells as a percentage of CD4<sup>+</sup> T cells. Independent-samples Mann-Whitney U test was performed with a significance level of 0.05 ( $p < 0.05$ ). The results are given as mean  $\pm$  SD. Only the statistically significant results are represented.



**Figure 5. Quantitative real-time PCR analysis of LL2-FKN<sub>hi</sub> tumors compared to LL2-FKN<sub>lo</sub> tumors.** The relative gene expression levels were calculated using actin as the endogenous control and the stimulation factor was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formula (LL2-FKN<sub>hi</sub> compared to LL2-FKN<sub>lo</sub>). The results are given as median value of mRNA expression (n=12 mice/group). Representative of 3 separate experiments. Independent-samples Mann-Whitney *U* test was performed with a significance level of 0.05 ( $p < 0.05$ ). Only the statistically significant results are represented. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$

## **Table Legends**

**Table 1. List of primer sequences used for real-time PCR analysis in this study**

**Table 1**

Gene symbol Protein name (Abbreviation)	FORWARD 5'-3'	REVERSE 5'-3'	Size (BP)	Reference Genebank cDNA
<i>Actb</i> beta actine	AGATCTGGCACCACACCT TCT	TTTTCACGGTTGGCCT TAGG	102	NM_007393.5
<i>Adgre1</i> adhesion G protein-coupled receptor E1 (F4/80)	GATACAGCAATGCCAAGC AGT	TTGTGAAGGTAGCAT TCACAAGTGTA	79	NM_010130
<i>Bmp1</i> bone morphogenetic protein 1 (BMP1)	ACCCTCCAAGACAGCACT G	GGCTACGGTACAGGT CCAT	145	NM_009755.3
<i>Bmp2</i> bone morphogenetic protein 2 (BMP2)	TGCCCCCTAGTGCTTCTT AGAC	AGCAACACTAGAAGA CAGCGGG	82	<a href="#">NM_007553.3</a>
<i>Bmp3</i> bone morphogenetic protein 3 (BMP3)	AACTCCTCAAACGAAGGG GTT	ACAGTGTGGCTGACA AAATGTT	80	NM_173404
<i>Bmp4</i> bone morphogenetic protein 4 (BMP4)	TTGATACCTGAGACCGGG AAG	ACATCTGTAGAAGTG TCGCCTC	118	NM_0077557
<i>Bmp5</i> bone morphogenetic protein 5 (BMP5)	TTACTTAGGGGTATTGTG GGCT	TGAACGTGATTGTCT CCCAAG	86	NM_077555
<i>Bmp6</i> bone morphogenetic protein 6 (BMP6)	AACGCCCTGTCCAATGAC G	ACTCTTGCGGTTCAAG GAGTG	138	NM_007556
<i>Ccl2</i> c-c motif chemokine ligand 2 (CCL2)	AGGCTGGAGAGCTACAAG AGGAT	ATCCAGGTTTTTAAT GTATGTCTGGA	134	<a href="#">NM_011333</a>
<i>Ccl5</i> c-c motif chemokine ligand 5 (CCL5)	TGCCACGTCAAGGAGTA TTTC	AACCCACTTCTTCTCT GGGTTG	111	NM_013653
<i>Cd19</i> B-lymphocyte surface antigen B4 (CD19)	TCCCTGGGTCTATGGAA AT	CTGGTCTGCCCAAGG TT	157	NM_009844
<i>Csf1</i> colony stimulating factor 1 (CSF1)	CCTGTGTCCGAACCTTCC AT	ATCAGGCTTGGTCACC ACAT	166	NM_007778.4
<i>Cx3cl1</i> c-x3-c motif chemokine ligand 1 (CX3CL1)	CCGCGTTCTTCCATTTGT GTA	GCTGATAGCGGATGA GCAAAG	99	NM_009142
<i>Cx3cr1</i> c-x3-c motif chemokine receptor 1 (CX3CR1)	CTGCTGAGGCCTGTTATT TGG	CTTCCGGCTGTTGGTG AGA	115	NM_009987
<i>Dr5</i> death receptor 5 (DR5)	CTGGAAGACTGGAGCATG GA	GCCAGGTTCCGTGTTG TG	150	NM_020275
<i>Fas</i> fas cell surface death receptor (FAS)	GTGCACAGCAACCAGCAA TAC	AGG GTC ATC CTG TCT CCT TTT C	150	NM_007987.2
<i>Fasl</i> fas ligand (FASL)	GTAGACAGCAGTGCCACT TCATC	GCAGTGGGAGTGGTT GTGA	150	NM_0101177
<i>Foxp3</i> forkhead box P3 (FOXP3)	CCCAGGAAAGACAGCAAC CTT	TTCCACAACCAGGCCA CTTG	88	<a href="#">NM_054039</a>

<i>Gzma</i> granzym a (GZMA)	ACTCAAGACCGTATATGG CTCTACTTAA	AGCCCAAGAATGAA CTTAGATCTCT	133	<a href="#">NM_010370.3</a>
<i>Gzmb</i> granzym b (GZMB)	TCCTGCTACTGCTGACCT TGTC	TGCTGATCCTTGATCG AAAGTAAG	220	<a href="#">NM_013542.3</a>
<i>Gzmc</i> granzym c (GZMC)	ATGAGTTTCTGAAAGTTG GTG	TCATTAGAACGGTCA TCAGG	217	<a href="#">NM_010371.3</a>
<i>Ifng</i> interferon $\gamma$ (IFN $\gamma$ )	CAGCAACAGCAAGGCGAA A	GCTGGATTCCGGCAAC AG	129	<a href="#">NM_008337.4</a>
<i>Igkc</i> immunoglobulin kappa light chain (IGKC)	GCGTCCTGAACAGTTGGA CT	ACTCGTCCTTGGTCAA CGTG	84	AJ294736.1
<i>Il-1<math>\alpha</math></i> interleukin 1 $\alpha$ (IL1 $\alpha$ )	CAGGATGTGGACAAACAC TATCTCA	TCGTCTCCTCCCGACG AGTA	113	NM_010554
<i>Il-1<math>\beta</math></i> interleukin 1 $\beta$ (IL1 $\beta$ )	GAAGTTGACGGACCCCAA AAG	GTGCTGCGAGATTTG AA	92	NM_008361
<i>Il-6</i> interleukin 6 (IL6)	ACAAGTCGGAGGCTTAAT TACACAT	AAGTGCATCATCGTT GTTCATACA	102	<a href="#">NM_031168.2</a>
<i>Il-10</i> interleukin 10 (IL10)	GAAGTTGACGGACCCCAA AAG	GTGCTGCTGCGAGAT TTGAA	95	NM_010548
<i>Il-12</i> interleukin 12 (IL12)	GGTGCAAAGAAACATGGA CTTG	GACAGAGACGCCATT CCACAT	92	NM_008352
<i>Mmp2</i> matrix metalloproteinase 2 (MMP2)	TTCCTCTGGTGCTCCACT ACATAC	AGGGCTGTCCATCAGC ATTG	105	NM_008610
<i>Mmp9</i> matrix metalloproteinase 9 (MMP9)	TGAGTCCGGCAGACAATC CT	CGCCCTGGATCTCAGC AATA	62	NM_013599
<i>Opg</i> osteoprotegerin (OPG)	TCCGGCGTGGTGCAA	AGAACCCATCTGGAC ATTTTTTG	66	NM_008764
<i>Perf</i> perforin (PERF)	GAGAAGACCTATCAGGAC CA	AGCCTGTGGTAAGCA TG	166	NM_010370.2
<i>Rank</i> receptor activator for nuclear factor- $\kappa$ B (RANK)	CTTGGACACCTGGAATGA AGAAG	AGGGCCTTGCTGCAT C	41	NM_009399
<i>Rankl</i> rank ligand (RANKL)	GGAAGTCAACACATTGT GGG	GCCTTCCATCATAGCT GGAGC	60	NM_011613
<i>Sdc1</i> syndecan 1 (CD138)	TAGATGGCCTATTGCGGC TG	CCCTAGCGGTCTCTAT GGGT	90	NM_011519.2
<i>Tnfa</i> tumor necrosis factor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )	AGGCGGTGCCTATGTCTC A	GGGTCTGGGCCATAG AACTG	131	NM_013693
<i>Tnfr1a</i> tnf receptor 1a (TNFR1a)	GACACGGTGTGTGGCTGT AA	AAGAACCCTGCATGG CAGTT	154	NM_011609
<i>Tnfr1b</i> tnf receptor 1b (TNFR1b)	TCCTGGYGCAGAGGAAAA AG	GCTGGAACCTGGGTGC TGTAGT	133	NM_011610
<i>Trail</i> TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)	TGAACAGACCCTGCTTGC A	GCCACTTTCTGAGGTC TTCCA	150	NM_009425
<i>Vegfa</i> vascular endothelial growth factor a (VEGFA)	TTTACTGCTGTACCTCCA CCA	ATCTCTCCTATGTGCT GGCTTT	317	<a href="#">NM_0013170 41.1</a>
<i>Vegfc</i> vascular endothelial growth factor c (VEGFC)	GGGAAGAAGTTCCACCAT CA	ATGTGGCCTTTTCCAA TACG	143	NM_009506

## REFERENCES

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013;**63**: 11-30.
2. Morgensztern D, Ng SH, Gao F, Govindan R. Trends in stage distribution for patients with non-small cell lung cancer: a National Cancer Database survey. *J Thorac Oncol* 2010;**5**: 29-33.
3. Sugiura H, Yamada K, Sugiura T, Hida T, Mitsudomi T. Predictors of survival in patients with bone metastasis of lung cancer. *Clinical orthopaedics and related research* 2008;**466**: 729-36.
4. Weilbaecher KN, Guise TA, McCauley LK. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nature reviews Cancer* 2011;**11**: 411-25.
5. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews Cancer* 2012;**12**: 298-306.
6. Slaney CY, Kershaw MH, Darcy PK. Trafficking of T cells into tumors. *Cancer research* 2014;**74**: 7168-74.
7. Bellone M, Calcinotto A. Ways to enhance lymphocyte trafficking into tumors and fitness of tumor infiltrating lymphocytes. *Frontiers in oncology* 2013;**3**: 231.
8. Ludwig A, Schulte A, Schnack C, Hundhausen C, Reiss K, Brodway N, Held-Feindt J, Mentlein R. Enhanced expression and shedding of the transmembrane chemokine CXCL16 by reactive astrocytes and glioma cells. *J Neurochem* 2005;**93**: 1293-303.
9. Hu W, Liu Y, Zhou W, Si L, Ren L. CXCL16 and CXCR6 are coexpressed in human lung cancer in vivo and mediate the invasion of lung cancer cell lines in vitro. *PLoS one* 2014;**9**: e99056.
10. Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity* 2012;**36**: 705-16.
11. Ferretti E, Pistoia V, Corcione A. Role of fractalkine/CX3CL1 and its receptor in the pathogenesis of inflammatory and malignant diseases with emphasis on B cell malignancies. *Mediators of inflammation* 2014;**2014**: 480941.
12. Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, Murphy G, Greaves DR, Dempsey PJ, Raines EW. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* 2001;**276**: 37993-8001.
13. Richard-Fiardo P, Cambien B, Pradelli E, Beilvert F, Pitard B, Schmid-Antomarchi H, Schmid-Alliana A. Effect of fractalkine-Fc delivery in experimental lung metastasis using DNA/704 nanospheres. *Cancer gene therapy* 2011;**18**: 761-72.
14. White GE, Greaves DR. Fractalkine: one chemokine, many functions. *Blood* 2009;**113**: 767-8.
15. Bachelier F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD, Mantovani A, Matsushima K, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacological reviews* 2014;**66**: 1-79.
16. Guo J, Chen T, Wang B, Zhang M, An H, Guo Z, Yu Y, Qin Z, Cao X. Chemoattraction, adhesion and activation of natural killer cells are involved in the antitumor immune response induced by fractalkine/CX3CL1. *Immunol Lett* 2003;**89**: 1-7.
17. Guo J, Zhang M, Wang B, Yuan Z, Guo Z, Chen T, Yu Y, Qin Z, Cao X. Fractalkine transgene induces T-cell-dependent antitumor immunity through chemoattraction and activation of dendritic cells. *International journal of cancer* 2003;**103**: 212-20.

18. Lavergne E, Combadiere B, Bonduelle O, Iga M, Gao JL, Maho M, Boissonnas A, Murphy PM, Debre P, Combadiere C. Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo. *Cancer research* 2003;**63**: 7468-74.
19. Jamieson-Gladney WL, Zhang Y, Fong AM, Meucci O, Fatatis A. The chemokine receptor CX(3)CR1 is directly involved in the arrest of breast cancer cells to the skeleton. *Breast Cancer Res* 2011;**13**: R91.
20. Jamieson WL, Shimizu S, D'Ambrosio JA, Meucci O, Fatatis A. CX3CR1 is expressed by prostate epithelial cells and androgens regulate the levels of CX3CL1/fractalkine in the bone marrow: potential role in prostate cancer bone tropism. *Cancer research* 2008;**68**: 1715-22.
21. Kee JY, Arita Y, Shinohara K, Ohashi Y, Sakurai H, Saiki I, Koizumi K. Antitumor immune activity by chemokine CX3CL1 in an orthotopic implantation of lung cancer model in vivo. *Mol Clin Oncol* 2013;**1**: 35-40.
22. Mauri FA, Pinato DJ, Trivedi P, Sharma R, Shiner RJ. Isogenic comparison of primary and metastatic lung cancer identifies CX3CR1 as a molecular determinant of site-specific metastatic diffusion. *Oncol Rep* 2012;**28**: 647-53.
23. Schmall A, Al-Tamari HM, Herold S, Kampschulte M, Weigert A, Wietelmann A, Vipotnik N, Grimminger F, Seeger W, Pullamsetti SS, Savai R. Macrophage and cancer cell cross-talk via CCR2 and CX3CR1 is a fundamental mechanism driving lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;**191**: 437-47.
24. Su YC, Chang H, Sun SJ, Liao CY, Wang LY, Ko JL, Chang JT. Differential impact of CX3CL1 on lung cancer prognosis in smokers and non-smokers. *Mol Carcinog* 2018;**57**: 629-39.
25. Hoshino A, Ueha S, Hanada S, Imai T, Ito M, Yamamoto K, Matsushima K, Yamaguchi A, Iimura T. Roles of chemokine receptor CX3CR1 in maintaining murine bone homeostasis through the regulation of both osteoblasts and osteoclasts. *J Cell Sci* 2013;**126**: 1032-45.
26. Koizumi K, Saitoh Y, Minami T, Takeno N, Tsuneyama K, Miyahara T, Nakayama T, Sakurai H, Takano Y, Nishimura M, Imai T, Yoshie O, et al. Role of CX3CL1/fractalkine in osteoclast differentiation and bone resorption. *Journal of immunology* 2009;**183**: 7825-31.
27. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* 2008;**3**: 1101-8.
28. Lohr M, Edlund K, Botling J, Hammad S, Hellwig B, Othman A, Berglund A, Lambe M, Holmberg L, Ekman S, Bergqvist M, Ponten F, et al. The prognostic relevance of tumour-infiltrating plasma cells and immunoglobulin kappa C indicates an important role of the humoral immune response in non-small cell lung cancer. *Cancer letters* 2013;**333**: 222-8.
29. Buijs JT, van der Pluijm G. Osteotropic cancers: from primary tumor to bone. *Cancer letters* 2009;**273**: 177-93.
30. Lamoureux F, Moriceau G, Picarda G, Rousseau J, Trichet V, Redini F. Regulation of osteoprotegerin pro- or anti-tumoral activity by bone tumor microenvironment. *Biochimica et biophysica acta* 2010;**1805**: 17-24.
31. Dougall WC, Holen I, Gonzalez Suarez E. Targeting RANKL in metastasis. *BoneKey reports* 2014;**3**: 519.
32. Peng X, Guo W, Ren T, Lou Z, Lu X, Zhang S, Lu Q, Sun Y. Differential expression of the RANKL/RANK/OPG system is associated with bone metastasis in human non-small cell lung cancer. *PLoS one* 2013;**8**: e58361.
33. Pacifici R. The immune system and bone. *Arch Biochem Biophys* 2010;**503**: 41-53.
34. Fremd C, Schuetz F, Sohn C, Beckhove P, Domschke C. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology* 2013;**2**: e25443.

35. Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol* 2008;**20**: 332-8.
36. Birbrair A. Tumor Microenvironment The Role of Chemokines - Part A Advances in Experimental Medicine and Biology,, ed. 1st Cham: Springer International Publishing : Imprint: Springer., 2020:XI, 101 p. 15 illus., 13 illus. in color.
37. Wang SS, Liu W, Ly D, Xu H, Qu L, Zhang L. Tumor-infiltrating B cells: their role and application in anti-tumor immunity in lung cancer. *Cell Mol Immunol* 2019;**16**: 6-18.
38. Wouters MCA, Nelson BH. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating B Cells and Plasma Cells in Human Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2018;**24**: 6125-35.
39. Lo Nigro C, Macagno M, Sangiolo D, Bertolaccini L, Aglietta M, Merlano MC. NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: biological evidence and clinical perspectives. *Ann Transl Med* 2019;**7**: 105.
40. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers* 2014;**6**: 1670-90.
41. Gul N, van Egmond M. Antibody-Dependent Phagocytosis of Tumor Cells by Macrophages: A Potent Effector Mechanism of Monoclonal Antibody Therapy of Cancer. *Cancer research* 2015;**75**: 5008-13.
42. Hassin D, Garber OG, Meiraz A, Schiffenbauer YS, Berke G. Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable. *Immunology* 2011;**133**: 190-6.
43. Prager I, Liesche C, van Ooijen H, Urlaub D, Verron Q, Sandstrom N, Fasbender F, Claus M, Eils R, Beaudouin J, Onfelt B, Watzl C. NK cells switch from granzyme B to death receptor-mediated cytotoxicity during serial killing. *The Journal of experimental medicine* 2019;**216**: 2113-27.
44. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;**140**: 883-99.

## **B. Résultats complémentaires**

### **a. Introduction**

La première partie de ce travail de thèse a permis de mettre en évidence qu'une expression accrue de CX3CL1 dans les tumeurs osseuses LL2 en réduit considérablement le potentiel malin.

Les principaux mécanismes impliqués dans cet effet semblent être une inhibition du cercle vicieux liant la résorption osseuse et la prolifération des cellules tumorales ainsi que l'induction d'un microenvironnement tumoral immunopermissif.

Néanmoins, la surexpression de facteurs associés habituellement à la progression tumorale et au développement de métastases (tels que FOXP3, Il-10, MMP2 ou VEGF) était ici contre-intuitive car associée à une diminution du développement tumoral. La surexpression de ces facteurs semblait indiquer une évolution en cours du microenvironnement tumoral d'un statut immunopermissif vers un statut immunosuppresseur. Ce constat nous incitait à rechercher des modifications du microenvironnement des tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub> au cours du temps. Il nous fallait donc analyser/caractériser à différents moments du développement tumoral des lésions LL2-FKN<sub>hi</sub>, le phénotype de la tumeur, son profil transcriptomique, l'infiltrat leucocytaire tumoral en précisant son niveau d'activation ainsi que l'expression des différents CPI. Il nous fallait surtout déterminer si l'effet de la FKN diminuait au cours du développement tumoral, et le cas échéant, identifier les mécanismes sous-jacents.

Au cours des dernières années, les immunothérapies, et plus particulièrement celles qui utilisent les inhibiteurs de checkpoints immunitaires sont devenues un traitement clé dans la prise en charge des cancers. Les effets de la FKN semblant, en partie au moins, dépendre d'une composante immunitaire, nous nous sommes attachés à tester, dans ce même modèle murin, les effets d'une expression accrue et locale de FKN en association avec différents modulateurs de CPI.

Par ailleurs, les premiers résultats en cours de publication suggéraient l'implication des LTreg dans la limitation de l'effet de la FKN sur le développement tumoral. Nous avons exploré différentes pistes de traitements inhibiteurs des LTreg en association à l'augmentation de l'expression locale de FKN, pour confirmer l'implication des LTreg dans la limitation de son effet, et identifier des associations thérapeutiques pouvant potentiellement être transposées en pratique clinique.

C'est l'ensemble de ces résultats complémentaires qui vont être présentés dans cette 2<sup>ème</sup> partie.

## b. Matériels et Méthodes

Cf page 61

## c. Résultats

### i. Analyse cinétique des tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub>

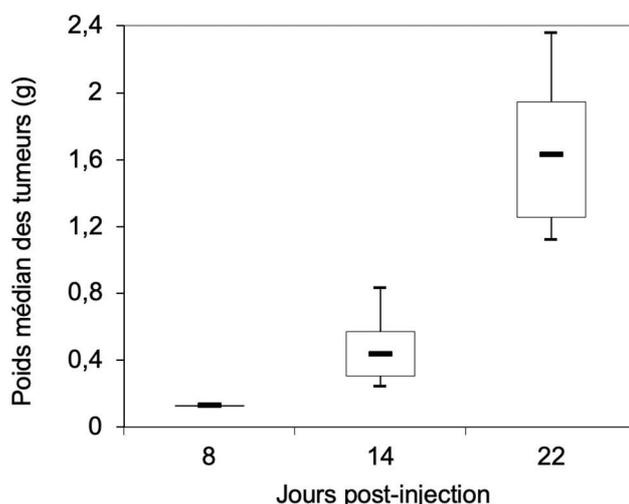
#### 1. Effet anti-tumoral de la FKN au cours du temps

Les expériences *in vivo* réalisées précédemment n'ont pas pu être menées au-delà de J14 du fait de l'impotence fonctionnelle des animaux et du volume des lésions observées dans les groupes LL2-FKN<sub>lo</sub>.

Des expériences *in vivo*, utilisant uniquement les cellules LL2-FKN<sub>hi</sub> ont donc été réalisées, dans lesquelles le développement tumoral a été suivi sur une période 22 jours. Les résultats sont présentés dans la **Figure 16**.

A J8 post-injection, seuls 20% des animaux avaient développé une tumeur, contre 75% à J14 et 100% à J22. De plus, les poids médians des tumeurs étaient significativement augmentés ( $p < 0,05$ ) entre J8 et J14 (0,13 g vs 0,44 g,) et entre J14 et J22 (0,28 g vs 1,64 g).

Ces résultats mettent ainsi en évidence une atténuation de l'effet anti-tumoral de la FKN au cours du temps.



**Figure 16 : Analyse du développement des tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub> au cours du temps.** Les souris ( $n=30$ ) ont reçu une injection de  $5 \times 10^5$  cellules LL2-FKN<sub>hi</sub> dans le fémur. Les animaux ont été sacrifiés à J8 ( $n=10$ ), J14 ( $n=10$ ) et J22 ( $n=10$ ) post-injection. Le jour du sacrifice, le développement tumoral a été évalué dans les muscles adjacents des fémurs injectés. Box plot : les marques à l'intérieur des boîtes indiquent les médianes. Les boîtes s'étendent du 25<sup>e</sup> au 75<sup>e</sup> percentiles et les valeurs minimum et maximum sont utilisées pour les moustaches.

## 2. Infiltration des tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub> par les LTreg au cours du temps

Les résultats des travaux précédents (article soumis), ont mis en évidence, tant en cytométrie de flux qu'en PCR quantitative, une augmentation significative du ratio de LT CD4+/FOXP3+ parmi les LT CD4+ infiltrant les tumeurs prélevées à J14 dans le groupe LL2-FKN<sub>hi</sub> comparé au groupe LL2-FKN<sub>lo</sub>.

Cette observation nous a conduits à nous intéresser aux LTreg infiltrant les tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub> au cours du temps.

L'évaluation de cette sous-population leucocytaire a été réalisée par une approche de PCR quantitative en utilisant le gène FOXP3 comme marqueur.

Ces expériences ont mis en évidence, qu'il n'y avait pas de différence significative du niveau d'expression de FOXP3 entre J8 et J14 et J22 dans les tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub> (résultats non présentés) suggérant un taux d'infiltration élevé et stable des LTreg dans ces tumeurs au cours du temps.

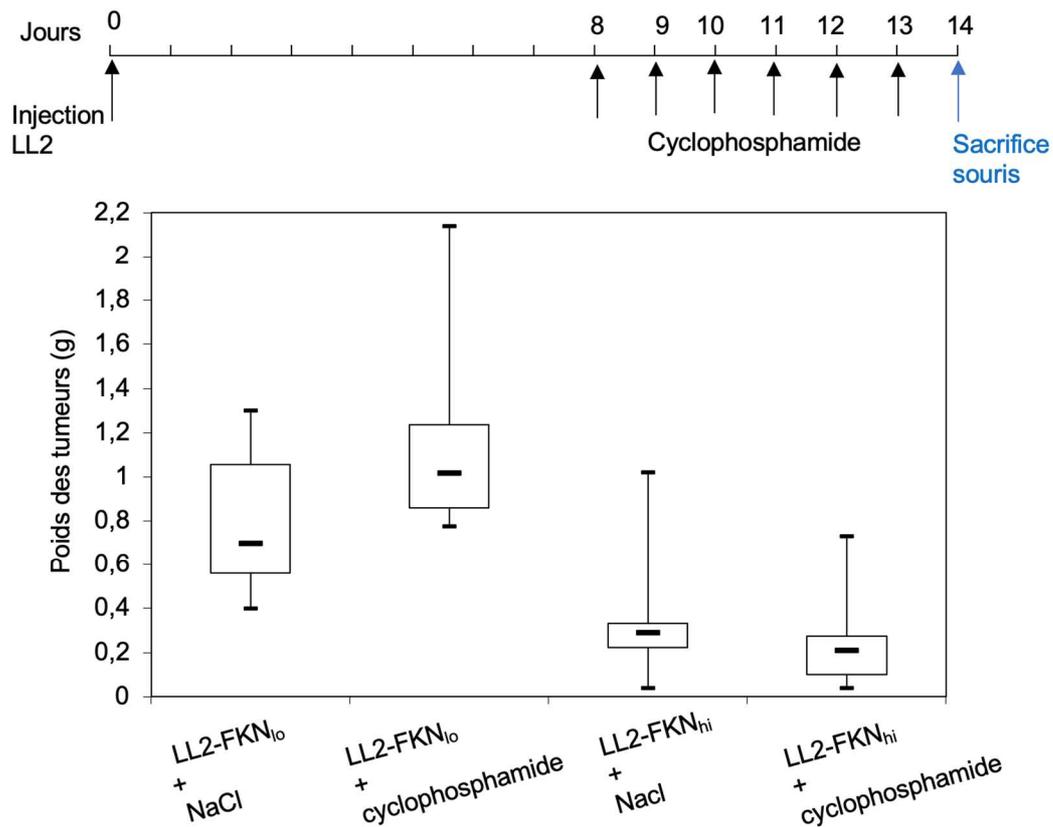
### ii. Effet des traitements par des inhibiteurs de LTreg

Comme nous avons constaté une augmentation de l'infiltration par les LTreg des tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub> comparées aux tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub>, nous nous sommes attachés à cibler cette population cellulaire à la fois pour essayer de prolonger l'effet de la FKN, et pour prouver l'implication des LTreg dans la perte d'effet de la FKN au cours du développement tumoral.

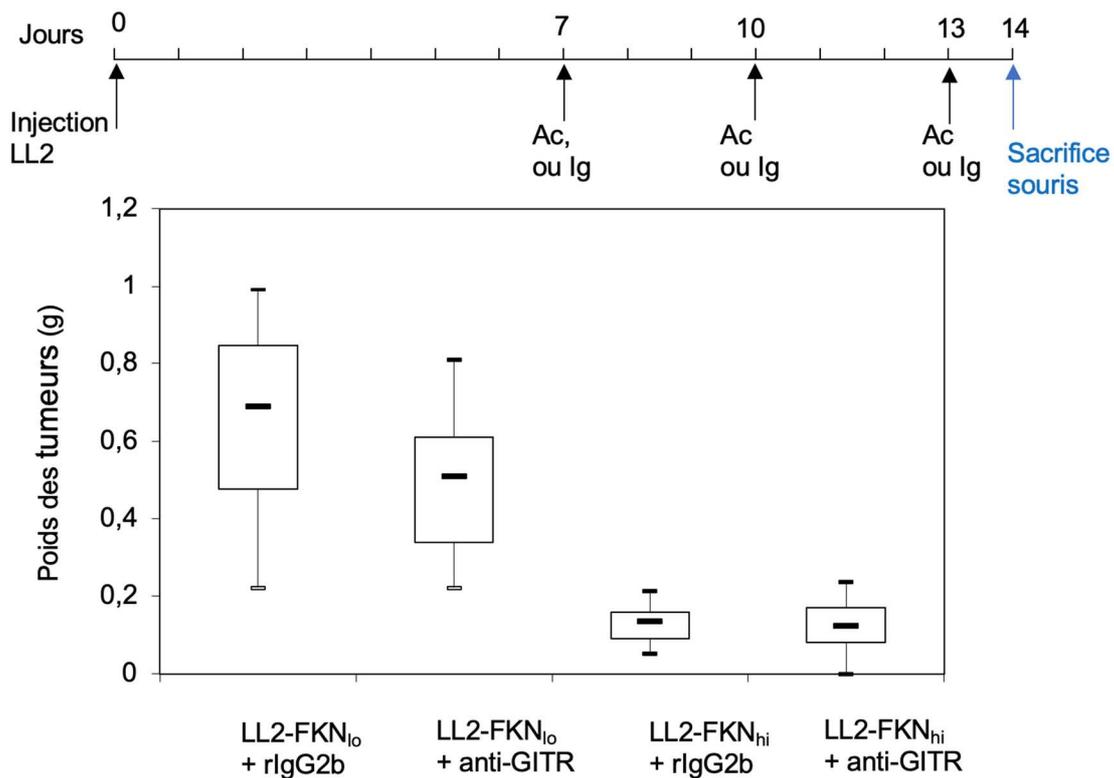
Nous avons choisi le cyclophosphamide et les Ac anti-GITR dans l'objectif de bloquer les LTreg.

La **figure 17** montre que le traitement par cyclophosphamide n'avait pas d'effet significatif sur le poids des tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub> (0,70g VS 1,02g ; p=0,09), malgré une diminution significative du niveau d'expression de FOXP3 (fold -2,15 ; p=0,005). En revanche, le traitement par Ac anti-GITR (**Fig.18**) diminuait significativement le poids de ces tumeurs (0,805g VS 0,5g ; p=0,001). Dans le même temps, le niveau d'expression de FOXP3 était diminué significativement (fold -2 ; p=0,04), et ceux de CD8a et CD8b étaient augmentés significativement (respectivement fold 2,71 et 2,35 ; p=0,008 et p=0,015) (résultats non présentés).

Appliqués aux souris porteuses de tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub>, les mêmes traitements par cyclophosphamide (**Fig.17**) et Ac anti-GITR (**Fig.18**) n'avaient d'effet significatif ni sur le niveau d'expression de FOXP3 (résultats non présentés) ni sur le poids des tumeurs.



**Figure 17: Effet d'un traitement par cyclophosphamide sur les tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub> et LL2-FKN<sub>hi</sub>.** A J=0, les cellules LL2-FKN<sub>hi</sub> ou LL2-FKN<sub>lo</sub> ( $5 \times 10^5$ ) ont été injectées dans le fémur des souris (n=48). Les animaux ont reçu de J=8 à J=13 une injection intrapéritonéale quotidienne de 1mg/kg de cyclophosphamide (n=24) ou de NaCl à 0,9% (n=24), puis ont été sacrifiées à J14. Le jour du sacrifice, le développement tumoral a été évalué dans les muscles adjacents aux fémurs injectés. Les marques à l'intérieur des boîtes indiquent les médianes. Les boîtes s'étendent du 25<sup>e</sup> au 75<sup>e</sup> percentiles et les valeurs minimum et maximum sont utilisées pour les moustaches.



**Figure 18 : Effet d'un traitement par des anticorps monoclonaux anti-GITR sur les tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub> et LL2-FKN<sub>hi</sub>.** Après injection des souris par les cellules LL2-FKN<sub>lo</sub> (n=24) ou LL2-FKN<sub>hi</sub> (n=24), les souris ont reçu par voie ip 3 injections de 250 µg d'anticorps monoclonaux anti-GITR (n=12) ou IgG2b de rat (Isotype contrôle de GITR, n=12). Le jour du sacrifice, le développement tumoral a été évalué dans les muscles adjacents des fémurs injectés. Les marques à l'intérieur des boîtes indiquent les médianes. Les boîtes s'étendent du 25<sup>e</sup> au 75<sup>e</sup> percentiles et les valeurs minimum et maximum sont utilisées pour les moustaches.

### iii. Analyse du niveau d'expression des CPI dans les tumeurs LL2

Les tumeurs disposent de plusieurs moyens pour échapper à la destruction par le système immunitaire et, notamment celui de détourner à leur profit les CPI inhibiteurs des LT effecteurs. Ayant comme objectif de coupler la stratégie FKN à celles utilisant les anticorps inhibiteurs de CPI, nous avons fait un état des lieux du niveau d'expression des CPI dans les tumeurs LL2. Nous avons focalisé notre étude sur l'expression des CPI : PD1, PDL1, PDL2, CTLA4, TIM3, GAL9, et LAG3 et analysé leur niveau d'expression par PCR quantitative dans les tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub> et LL2-FKN<sub>lo</sub> prélevées à J14 post-injection. Les tumeurs analysées étaient issues de 2 séries indépendantes d'expérimentations représentant plus d'une vingtaine d'échantillons pour chacun des 2 groupes de tumeurs.

Ainsi nous avons observé que tous les CPI testés étaient exprimés dans les tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub> et LL2-FKN<sub>hi</sub> (résultats non présentés). De plus, comme présenté dans le **Tableau 4** une augmentation significative de l'expression des CPI PDL1, CTLA4, TIM3, GAL9, et LAG3 a été observée dans les tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub> comparées aux tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub>. En revanche, pour les CPI PD1 et PDL2, nous avons identifié une fois une surexpression et une fois une inhibition de leur niveau d'expression. Cette discordance nous a conduit à les étudier dans 3 autres expérimentations indépendantes amenant à considérer finalement une cinquantaine de tumeurs. Néanmoins l'ensemble de cette étude n'a pas permis de statuer sur l'impact de la surexpression de la FKN sur le niveau d'expression de PD1 et PDL2, leur niveau d'expression restant variable pour un même niveau d'expression de FKN.

CPI	Expérimentation 1 (n=12 souris)		Expérimentation 2 (n= 10 souris)		Facteur de stimulation moyen
	facteur de stimulation	p	facteur de stimulation	p	
PDL1	2,1	0,045	1,8	0,005	1,95 ± 0,15
CTLA4	7	0,001	7,9	<0,001	7,45 ± 0,45
TIM3	1,8	0,024	2,3	<0,001	2,05 ± 0,25
GAL9	2,0	0,029	3,3	>0,001	2,65 ± 0,65
LAG3	2,1	0,021	2,0	<0,001	2,05 ± 0,05

**Tableau 4 : Analyse comparative du niveau d'expression des CPI dans les tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub> et LL2-FKN<sub>lo</sub>.** L'analyse par PCR quantitative des CPI a été réalisée sur les tumeurs envahissant le muscle, prélevées à J14 post injection. Le niveau relatif de l'expression des gènes a été calculé en utilisant l'actine comme gène de ménage et les facteurs de stimulation ont été calculés en utilisant la formule  $2^{-ddCt}$  (LL2-FKN<sub>hi</sub> par rapport à LL2-FKN<sub>lo</sub>).

#### iv. Effet des traitements anti-CPI sur les tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub> et LL2-FKN<sub>hi</sub>

##### 1. Effet des traitements anti-CPI en monothérapie

Les tumeurs LL2 exprimant les CPI, nous avons recherché si le développement de ces tumeurs était sensible aux traitements par des Ac anti-CPI, et, le cas échéant, si le niveau d'expression de la FKN dans les tumeurs pouvait impacter la réponse à ces traitements. Plusieurs Ac monoclonaux anti-CPI ont ainsi été testés en utilisant un même schéma d'administration choisi en accord avec les données de la littérature (**Fig. 19**).



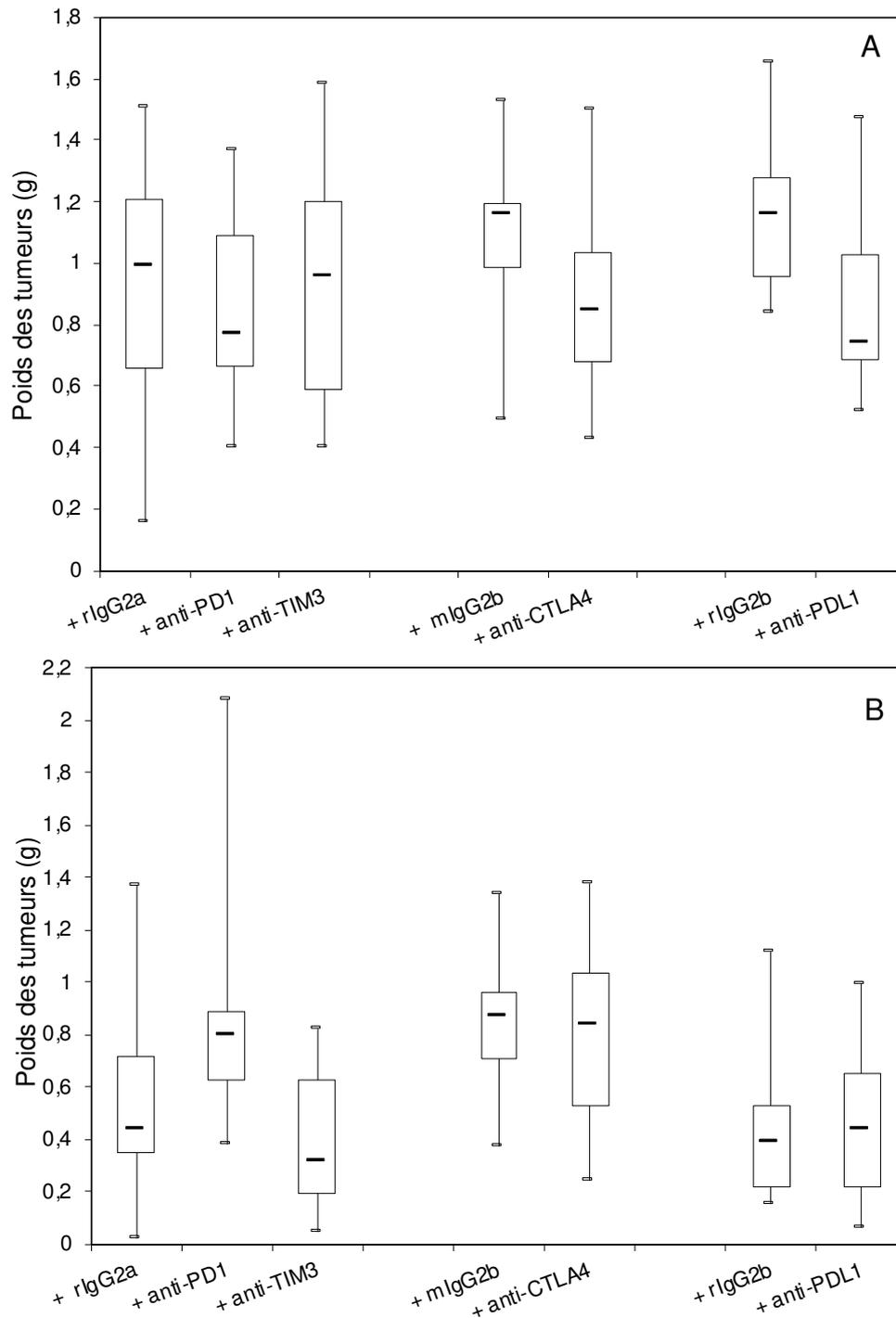
**Figure 19 : Schéma de traitement par les anticorps anti-CPI.** A J=0, les cellules LL2-FKN<sub>hi</sub> ou LL2-FKN<sub>lo</sub> ( $5 \times 10^5$  cellules) ont été injectées dans le fémur des souris. Les animaux ont reçu à J=1, J=5, J=9 et J=13 une injection intrapéritonéale d'anticorps anti-CPI ou d'isotypes contrôles correspondants puis ont été sacrifiés à J14.

A ce jour, nous avons testé les effets des Ac monoclonaux dirigés contre les CPI PD1, CTLA4, PDL1, et TIM3 sur le développement des tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub> et LL2-FKN<sub>hi</sub>.

L'effet de chacun des Ac testés a été comparé à des conditions contrôles dans lesquelles les souris ont été traitées par les isotypes contrôles correspondant à chacun des Ac testés, à savoir rIgG2a pour les anti-PD1 et les anti-TIM3, mIgG2b pour les anti-CTLA4 et rIgG2b pour les anti-PDL1.

Comme le montrent les résultats présentés dans la **Figure 20 A**, les traitements par des Ac anti-PD1 ou par des Ac anti-TIM3 n'avaient pas d'effet sur les poids de tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub>. En revanche, les traitements par Ac anti-CTLA4 ou par Ac anti-PDL1 diminuaient significativement le poids de ces tumeurs, respectivement de 38 et 35% (1,16g versus 0,85g ;  $p=0,0041$  et 1,16g VS 0,75g ;  $p=0,014$ ) (**Fig. 20 A**).

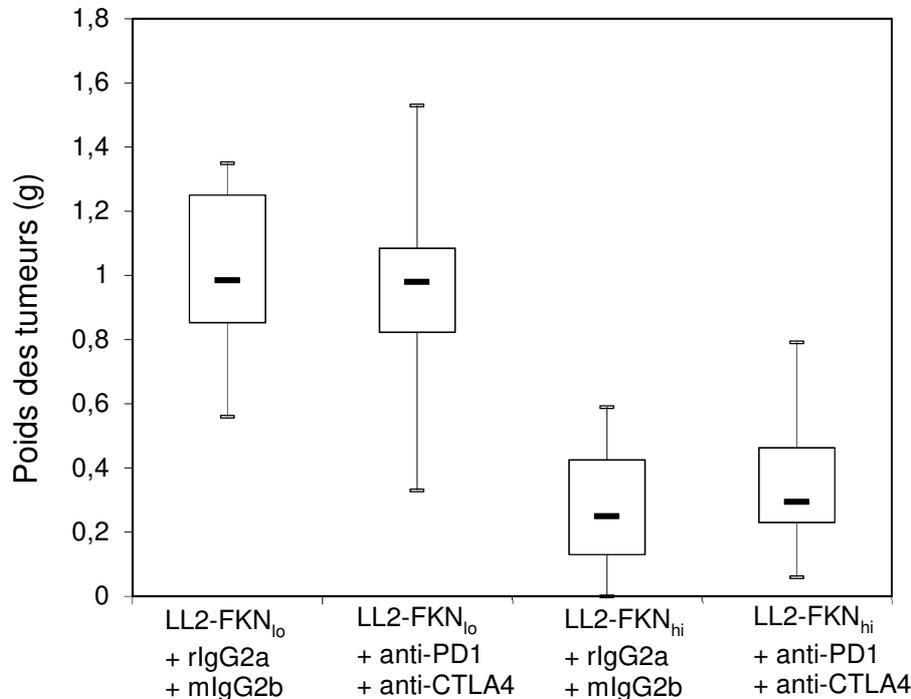
Par ailleurs, alors que les traitements par Ac anti-CTLA4, anti-TIM3, et anti-PDL1, appliqués aux souris porteuses de tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub> n'avaient pas d'effet significatif sur les poids tumoraux (**Fig. 20 B**), le traitement par Ac anti-PD1 entraînait une augmentation significative du poids tumoral (0,44g VS 0,80g ;  $p=0,022$ ).



**Figure 20 : Effet des traitements par des anticorps monoclonaux anti-CPI sur les tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub> et LL2-FKN<sub>hi</sub>.** Après injection intra-fémorale des cellules LL2-FKN<sub>lo</sub> (panel A) ou cellules LL2-FKN<sub>hi</sub> (panel B), les souris ont reçu par voie intrapéritonéale(ip) 4 injections de 250 µg d'anticorps monoclonaux anti-PD1 (n=12), anti-TIM3 (n=12), ou anti-PDL1(n=12) ou d'isotypes contrôles (IgG2a de rat, n=12 ou IgG2b de rat, n=12) ou de 100 µg d'anticorps monoclonaux anti-CTLA4 (n=12) ou d'isotype contrôle (IgG2b de souris). Le jour du sacrifice, le développement tumoral a été évalué dans les muscles adjacents aux fémurs injectés. Les marques à l'intérieur des boîtes indiquent les médianes. Les boîtes s'étendent du 25<sup>e</sup> au 75<sup>e</sup> percentiles et les valeurs minimum et maximum sont utilisées pour les moustaches.

## 2. Effet d'un traitement associant 2 Ac anti-CPI

Suivant le même schéma thérapeutique comprenant 4 injections à partir de J1, le traitement associant les Ac anti-CTLA4 et anti-PD1 n'a pas montré d'effet significatif sur les poids des tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub> ni LL2-FKN<sub>hi</sub> (**Fig. 21**).

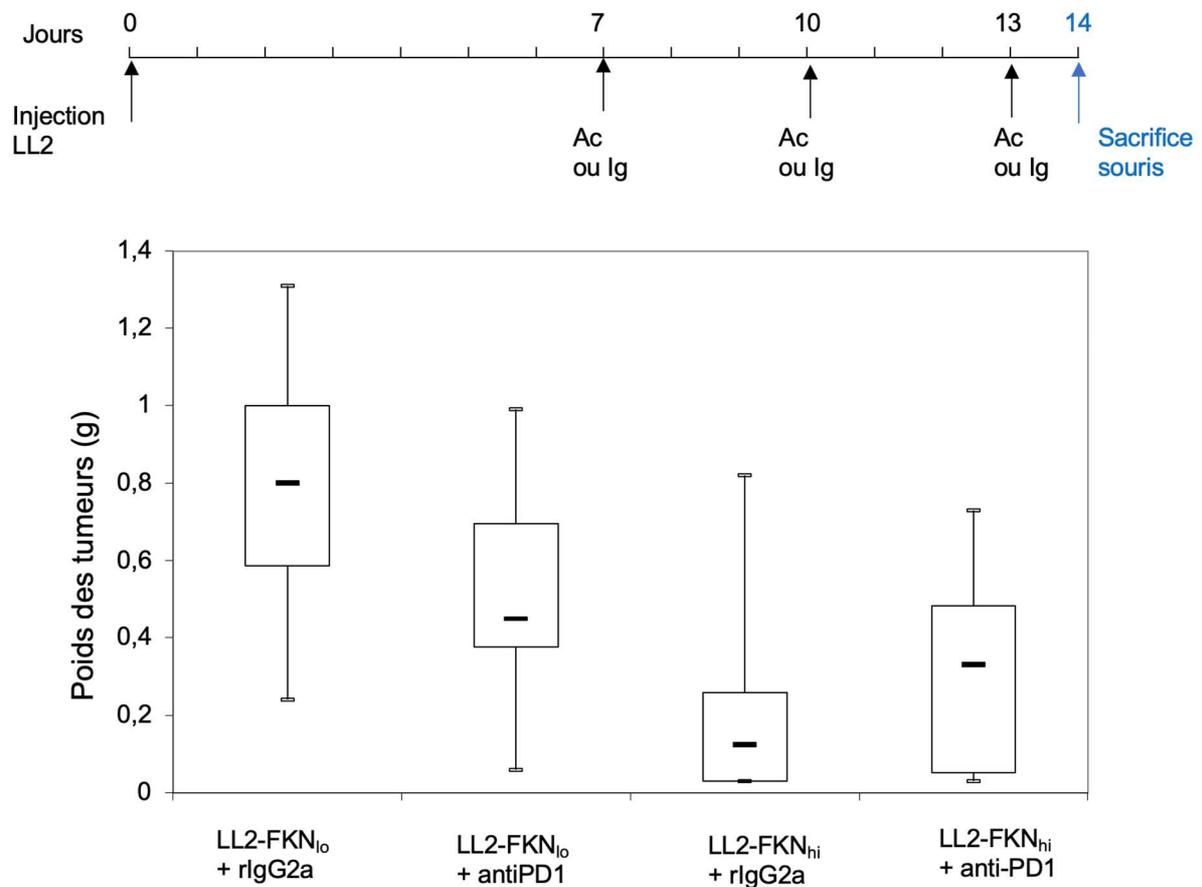


**Figure 21 :** Effet d'un traitement associant les anticorps monoclonaux anti-PD1 et anti-CTLA4 sur les tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub> et LL2-FKN<sub>hi</sub>. Après injection intra-fémorale des cellules LL2-FKN<sub>lo</sub> (n=24) ou LL2-FKN<sub>hi</sub> (n=24), les souris ont reçu par voie ip 4 injections de 250 µg d'anticorps monoclonaux anti-PD1 (n=12) ou d'IgG2a de rat (n=12), plus 100 µg d'anticorps monoclonaux anti-CTLA4 (n=12) ou d'IgG2b de souris (n=12). Le jour du sacrifice, le développement tumoral a été évalué dans les muscles adjacents des fémurs injectés. Les marques à l'intérieur des boîtes indiquent les médianes. Les boîtes s'étendent du 25<sup>e</sup> au 75<sup>e</sup> percentiles et les valeurs minimum et maximum sont utilisées pour les moustaches.

## 3. Effet d'un traitement anti-PD1 appliqué suivant un nouveau protocole

Nous avons choisi de tester un autre protocole de traitement par anti-PD1 du fait des résultats obtenus avec le schéma d'administration à partir de J1. Nous avons ici réalisé 3 injections, en débutant le traitement plus tardivement, à J7 de l'injection des cellules tumorales (**Fig. 22**).

Dans ces conditions, le traitement par Ac anti-PD1, comparé au traitement par les isotypes contrôles, inhibait significativement le développement des tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub> de 44% (0,45g versus 0,8g ; p=0,028). Ce même protocole de traitement n'avait pas d'effet significatif sur le groupe LL2-FKN<sub>hi</sub>.



**Figure 22 : Effet d'un nouveau protocole de traitement par anti-PD1 sur les tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub> et LL2-FKN<sub>hi</sub>.** A J=0, les cellules LL2-FKN<sub>hi</sub> ou LL2-FKN<sub>lo</sub> ( $5 \times 10^5$ ) ont été injectées dans le fémur des souris (n=48). Les animaux ont reçu à J=7, J=10 et J=13 une injection intrapéritonéale de 250  $\mu$ g d'anticorps anti-PD1 (n=24) ou IgG2a de rat (n=24) puis ont été sacrifiées à J14. Le jour du sacrifice, le développement tumoral a été évalué dans les muscles adjacents des fémurs injectés. Les marques à l'intérieur des boîtes indiquent les médianes. Les boîtes s'étendent du 25<sup>e</sup> au 75<sup>e</sup> percentiles et les valeurs minimum et maximum sont utilisées pour les moustaches.

#### d. Discussion

Le résultat principal de cette 2<sup>ème</sup> partie de notre travail est le constat d'une atténuation de l'effet anti-tumoral de la FKN au cours du temps, manifestation de l'existence d'une dynamique tumorale. Il existe une véritable évolutivité du microenvironnement tumoral contrôlé en permanence par une balance entre les éléments pro et anti-tumoraux. Ceci conduit à plus ou moins long terme à un état immunosuppresseur, qui semble ici contribuer à neutraliser l'effet anti-tumoral de la FKN.

Cette perte progressive d'effet de la FKN dans les tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub> est associée à une majoration de l'infiltrat tumoral par les LTreg, comparées aux tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub>. Or, cette sous-population lymphocytaire est connue pour son rôle pivot dans la génération d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur. Dans la littérature, de nombreuses études, dont certaines réalisées dans un contexte de CNPC, ont d'ailleurs relaté l'impact pronostique négatif de l'infiltration tumorale par les LTreg (Tao et al. 2012 ; Petersen et al. 2006). La fonction immunosuppressive des LTreg se fait via la production de cytokines bloquant les LT effecteurs, via l'expression de CPI, et via la limitation de l'activité des cellules présentatrices d'Ag (diminution de l'expression de CD80-86). Ces cellules exercent également un rôle pro-tumoral direct via leur capacité à promouvoir l'angiogenèse tumorale par 2 mécanismes : la diminution de la production de facteurs angiostatiques tels que TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$  (significativement augmentés dans nos expériences), et la production de VEGF A, dont l'expression est effectivement augmentée à J14 dans les tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub> (Liu et al. 2016).

Dans le but de démontrer le rôle des LTreg dans l'amortissement des effets de la FKN, et de prolonger l'effet de la FKN, nous avons réalisé des expériences de déplétion des tumeurs en LTreg par un traitement métronomique de cyclophosphamide ou par des Ac anti-GITR. Ces expériences ne sont pas concluantes pour le moment. En effet, ces 2 types de traitement ciblant les LTreg, réduisaient, au mieux, de moitié la teneur en LTreg des tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub>, et n'avaient pas d'effet sur celle des tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub>. Aucun de ces traitements, dans les schémas thérapeutiques que nous avons choisis, n'était capable de freiner le développement des tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub>, et seul le traitement par des Ac anti-GITR entravait significativement la croissance des tumeurs LL2-FKN<sub>lo</sub>. Ces résultats semblent indiquer que les doses de traitement utilisées ne sont pas suffisantes pour être efficaces dans des conditions de teneur élevée en LTreg.

Le mécanisme d'action de ces 2 agents utilisés pour restreindre le taux de LTreg diffèrent, et le choix de l'un ou de l'autre pourrait se révéler déterminant en termes d'efficacité. Le mode d'action du cyclophosphamide est aspécifique: il agit sur toutes les cellules en division (Galluzzi et al. 2012). Son effet préférentiel sur les LTreg pourrait s'expliquer par le fait que ces cellules semblent avoir une plus grande capacité proliférative au sein des tumeurs et qu'elles expriment peu de glutathion, une enzyme de détoxification. Utilisé selon un protocole métronomique (dose faible mais itérative), le cyclophosphamide détruit les cellules immunosuppressives telles que les LTreg et les MDSCs, tout en favorisant la différenciation des LTh17 et en restaurant la fonction des LT et des NK (Ghiringhelli et al. 2007). Cependant, de plus fortes doses s'avèreraient lympho-ablatrices et inductrices d'immunosuppression (Bao et al. 2020). Confrontés à la difficulté de devoir augmenter les doses de cyclophosphamide pour en majorer l'effet sur les LTreg, mais sans induire d'immunosuppression, nous avons plutôt fait le choix de nous orienter vers un autre traitement, plus spécifique dans la déplétion des LTreg : des Ac agonistes du CPI activateur de GITR. GITR est exprimé par différentes sous-populations lymphocytaires incluant les LT, les cellules NK, les LB et les LTreg, son niveau d'expression étant particulièrement élevé sur les LTreg. Dans la littérature, les Ac agonistes anti-GITR (clone DTA-1) s'avèrent avoir des capacités spécifiques à inhiber la fonction des LTreg, et à stimuler les LT cytotoxiques (Knee et al. 2016; Shimizu et al. 2002). Utilisés dans plusieurs modèles de tumeurs syngéniques murines, ces Ac exercent, in vivo, un puissant effet anti-tumoral, associé à une diminution de l'infiltration par les LTreg FOXP3+, et une augmentation de l'infiltration et de l'activation des LT CD8+ (Knee D et al. 2016).

Utilisés dans notre modèle, les Ac agonistes de GITR ont eu un effet anti-tumoral dans le groupe LL2-FKN<sub>lo</sub> et cet effet était bien associé à une diminution de niveau d'expression de FOXP3 et une augmentation de ceux de CD4 et CD8. Ce même traitement s'avérait sans effet sur le développement des tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub>. Il faut préciser qu'en condition LL2-FKN<sub>hi</sub>, les Ac anti-GITR n'induisaient pas de modification significative des niveaux d'expression de FOXP3, CD4, et CD8. Ceci suggérait que les conditions d'administration de ce traitement (quantité d'Ac et nombre d'injections notamment) étaient limitantes. Il était donc impératif d'adapter notre protocole de traitement à cette situation de densité élevée en LTreg. De nouvelles expérimentations animales vont être menées en ce sens.

Par ailleurs, dans l'objectif de prolonger l'effet anti-tumoral de la FKN au cours du temps, et du fait de l'expression des inhibiteurs de CPI tant dans les tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub>, que LL2-FKN<sub>lo</sub>, nous avons testé l'effet d'inhibiteurs de CPI dans notre modèle.

Nos expériences montrent qu'effectivement, certains traitements anti-CPI sont capables de freiner le développement des tumeurs du groupe LL2-FKN<sub>lo</sub> avec une diminution du poids tumoral comprise entre 30 et 44% suivant le CPI ciblé. En revanche, dans les conditions de forte expression intra-tumorale de FKN (tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub>), nous ne sommes pas parvenus, à ce jour, à potentialiser et/ou prolonger l'effet anti-tumoral de la FKN par l'association à des Ac anti-CPI.

La densité élevée des tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub> en LTreg pourrait, en partie au moins, contribuer à expliquer la différence de sensibilité aux CPI entre les 2 groupes de tumeurs. Encore incomplètement élucidés, les mécanismes de résistance aux CPI sont complexes et dépendent de multiples facteurs (Bai et al. 2017 ; Seidel et al. 2018). La présence de cellules immunomodulatrices telles que les LTreg, les MDSCs et les TAMs dans le microenvironnement tumoral est un des facteurs identifiés, contribuant à la résistance au blocage de l'axe PD1/PDL1-PDL2 et CTLA4. En effet, les LTreg expriment PD1, et CTLA4 de manière constitutive. Il semblerait que l'activation de PD1-PDL1 sur les LTreg soit nécessaire au développement et au maintien de leur fonction suppressive (Francisco et al. 2009) et que l'activation de CTLA4 induise une activation des LTreg et donc le développement de leur activité immunosuppressive (Wing et al. 2008). Intuitivement, on s'attendrait à ce que le blocage de ces checkpoints activateurs des LTreg participe à l'activité anti-tumorale des Ac anti-CPI. Cependant à ce jour, il existe une vraie controverse dans la littérature sur l'impact des Ac anti CTLA4 et anti-PDL1 sur les LTreg (Han et al. 2019). L'effet anti-tumoral des inhibiteurs de CPI, via l'inhibition des LTreg, n'est pas prouvée. *Paterson et al* (Paterson et al. 2015), ont d'ailleurs montré que la délétion de CTLA-4 dans des modèles murins adultes induit une protection contre l'auto-immunité via une stimulation des LTreg alors que les souris déficientes en CTLA4 développent une auto-immunité incompatible avec la vie. De fait, on ne peut exclure l'hypothèse d'une stimulation des LTreg induite par un traitement par Ac anti-CTLA4. Par ailleurs, les traitements par immunothérapies anti-PD1 semblent induire une augmentation du ratio LTreg/LTh dans des modèles murins de carcinomes épidermoïdes (Dodagatta-Marri et al 2019). Ainsi, l'utilisation d'Ac anti CTLA4 ou anti PD1 dans les tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub>, richement infiltrées par des LTreg, pourrait majorer l'activation de ces cellules immunosuppressives et neutraliser l'effet anti-tumoral de ces traitements.

Enfin, les LTreg semblent également avoir, via les CPI un impact sur l'état d'activation des LB. Dans une étude de 2013, *Sage et al* (Sage et al. 2013) ont démontré que le blocage de l'axe PD1/PDL1 induisait une augmentation d'activité des LTreg folliculaires, elle-même responsable d'une diminution de l'activité des LTh folliculaires et ainsi d'une diminution de l'immunité humorale, révélée par une diminution de la production d'Ac in vitro. Replacée dans le contexte de notre modèle, cette hypothèse qui relie une augmentation de l'activité des LTreg à une diminution de l'immunité humorale dépendante des LB, pourrait contribuer à expliquer l'absence de bénéfice thérapeutique d'un traitement FKN/anti-PD1 par rapport à un traitement par FKN seule, et, en outre, donner des bases moléculaires aux mécanismes sous-jacents à l'atténuation de l'effet anti-tumoral de la FKN au cours du temps.

L'augmentation de l'infiltration tumorale par les LTreg dans les tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub>, pourrait donc à la fois participer à la perte d'effet de la FKN avec le temps, mais aussi à l'absence d'effet des CPI sur les tumeurs FKN<sub>hi</sub> contrairement aux tumeurs FKN<sub>lo</sub>.

# Discussion Générale, Perspectives et Conclusion

L'optimisation de la prise en charge des métastases osseuses de cancers pulmonaires constitue un enjeu majeur de santé publique, du fait du mauvais pronostic de ces lésions, de leurs conséquences fonctionnelles, et de leur impact sur la qualité de vie des patients.

Le développement des immunothérapies en pratique clinique, avec la mise sur le marché des inhibiteurs de CPI, d'abord dans le cadre du mélanome, puis dans la prise en charge du CNPC, ont permis de ré-ouvrir la voie de la recherche en immunothérapies anticancéreuses. Les traitements actuellement utilisés en pratique clinique sont les Ac inhibiteurs de CTLA4 et de PD1/PDL1. Les résultats sont prometteurs, avec des survies prolongées pour les patients répondeurs, mais le taux de réponse est encore insuffisant. Il est donc essentiel d'identifier les mécanismes de résistance à ces traitements, des marqueurs prédictifs de leur efficacité, et des associations thérapeutiques capables d'optimiser leur effet.

Les chimiokines, ayant des propriétés chémoattractantes sur les cellules immunitaires, et en particulier les leucocytes, ont un rôle essentiel dans l'établissement de l'immunité anti-tumorale. Elles constituent ainsi des pistes thérapeutiques potentielles notamment en association à des modulateurs de CPI. En effet l'association d'un traitement local, capable de majorer l'infiltrat immunitaire intra-tumoral, à un traitement systémique, capable de lever les freins à l'activation de ces mêmes cellules immunitaires, semble une stratégie d'intérêt.

La chimiokine CX3CL1/Fractalkine (FKN) a été décrite dans la littérature comme ayant un effet pro-tumoral dans certaines tumeurs et un effet anti-tumoral dans d'autres.

Loin d'être contradictoires, ces résultats soulignent l'action complexe de la FKN dans la biologie du cancer. Cette fonction dépend, entre autres, de la forme de CX3CL1 (membranaire ou soluble), de l'expression de son Rc CX3CR1, du type de cancer, de la localisation de la tumeur et du développement tumoral.

Notre étude montre que l'augmentation de la FKN dans le microenvironnement osseux inhibe le développement de métastases osseuses expérimentales de CNPC. Cet effet anti-tumoral est associé à une augmentation du recrutement des LB, des monocytes inflammatoires et des cellules NK dans la tumeur ainsi qu'à des modifications significatives du niveau d'expression de gènes impliqués dans l'ostéof ormation et la régulation de l'immunité. Nous décrivons ici, pour la première fois, la probable intervention des LB dans le processus de réponse immune anti-tumorale induite par la FKN, en l'occurrence via l'activation de l'ADCC et de l'ADCP, et plus particulièrement de la voie des R<sub>c</sub> de mort.

Cet effet anti-tumoral de la FKN s'appuie également sur l'induction de l'expression d'OPG, et de plusieurs BMP, ainsi que d'une répression de l'expression de RANKL qui impactent le métabolisme osseux en permettant de promouvoir un profil ostéoblastique, rompant ainsi le cercle vicieux ostéolyse/ développement métastatique. Enfin, indépendamment des ostéoclastes, l'OPG interagit directement avec RANKL, empêchant ainsi son action pro-métastatique, et renforçant l'action anti-tumorale de la FKN.

Notre étude montre par ailleurs que l'effet anti-tumoral induit par la FKN s'estompe au cours du temps. Compte tenu de l'impact de la FKN sur le recrutement des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral, il semblait pertinent de tester les effets d'agents capables de contrôler l'état d'activation des cellules immunitaires et/ou leur densité. Nous avons donc testé les effets d'une expression élevée de FKN au sein des tumeurs, associée à des traitements systémiques visant les CPI (Ac anti-PD1, anti-PDL1, anti-TIM3, anti-CTLA4) ou visant à éliminer les LTreg (Ac anti-GITR ou cyclophosphamide).

Probablement du fait d'une trop forte teneur en LTreg, les traitements visant à éliminer les LTreg n'ont pas été efficaces aux doses testées dans les tumeurs LL2-FKN<sub>hi</sub>. Malgré ces premiers résultats, la déplétion en LTreg nous paraît une piste prometteuse, d'autant que les LTreg, via les CPI, peuvent diminuer l'immunité médiée par les LB, un des acteurs potentiels de la réponse anti-tumorale dans notre modèle animal. De fait, des traitements dits « renforcés » avec les Ac anti-GITR seront bientôt évalués dans notre modèle animal.

Il nous faudra également réaliser des expériences de déplétion en LB dans notre modèle de tumeurs osseuses LL2-FKN<sub>hi</sub>, afin de démontrer formellement leur implication dans l'effet anti-tumoral de la FKN. Nous envisageons d'utiliser le Rituximab (Ac anti-CD20).

Ce travail met également en évidence qu'aucun des traitements par inhibiteurs de CPI testés ici ne s'avère capable de potentialiser/prolonger l'effet anti-tumoral induit par une augmentation de la FKN dans le microenvironnement tumoral, alors que certains de ces traitements étaient efficaces en condition LL2-FKN<sub>lo</sub>.

Les LTreg expriment des CPI, et certains, comme CTLA4, à un haut niveau et de façon constitutive, et ce, contrairement à d'autres types de cellules immunitaires. L'impact des inhibiteurs de CPI sur l'activité des LTreg, et notamment CTLA4, est encore controversée à ce jour. Il nous paraît donc indispensable, à l'avenir, de tester, en contexte FKN<sub>hi</sub>, les stratégies thérapeutiques associant les traitements anti-CPI aux traitements visant à dépléter les tumeurs en LTreg.

Nous souhaitons également tester des protocoles de traitement ciblant le VEGF, qui semblent avoir un rôle à jouer en association avec la FKN du fait de la surexpression de ce facteur que nous avons pu constater dans les groupes LL2-FKN<sub>hi</sub>.

La FKN a la capacité d'induire transitoirement une réponse immune anti-tumorale et ainsi de ralentir le développement des tumeurs osseuses de CNPC. Il est raisonnable de penser que les effets anti-tumoraux de la FKN puissent être prolongés si la dérive immunosuppressive du microenvironnement tumoral est empêchée ou neutralisée.

# Bibliographie

Acharya N, Sabatos-Peyton C, Anderson A. Tim-3 finds its place in the cancer immunotherapy landscape. *J Immunother Cancer* 2020; 8: e000911

Altorki N, Markowitz G, Gao D et al. The lung microenvironment: an important regulator of tumor growth and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2019; 19: 9-28

Anderson D, Maraskovsky E, Billingsley W et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic –cell function. *Nature* 1997; 390: 175-179

Bachelier F, Ben-Baruch A, Burkhardt A, et al. Update on the Extended Family of Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors. *Pharmacol Rev* 2013; 66: 1–79

Bai J, Gao Z, Li X et al. Regulation of PD-1/PD-L1 pathway and resistance to PD-1/PDL1 blockade. *Oncotarget* 2017; 8: 110693-110707

Bao L, Hao C, Wang J et al. High dose cyclophosphamide administration orchestrates phenotypic and functional alterations of immature dendritic cells and regulates Th cell polarization. *Front Pharmacol* 2020; 11: 775

Barrueto L, Caminero F, Cash L et al. Resistance to checkpoint inhibition in cancer immunotherapy. *Transl Oncol* 2020; 13: 100738

Bazan J, Bacon K, Hardiman G et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997; 385: 640-644

Beatty G, Gladney W. Immune Escape Mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 687-692

Bernardini G, Gismondi A, Santoni A. Chemokines and NK cells: Regulators of development, trafficking and functions. *Immunol Lett* 2012; 145: 39–46

Bonecchi R, Galliera E, Borroni E et al. Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Front Biosci* 2009; 14: 540-551

Boon T, van den Bruggen P. Human tumor antigen recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* 1996; 183: 725-729

Boyce B, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling; *Arch Biochem Biophys* 2008; 473: 139-146

Bremmes R, Busund L, Kilvaer T et al. The role of tumor-infiltrating lymphocytes in the development, progression, and prognosis of non-small cell lung cancer. *J Thor Oncol.* 2016; 11: 789-800

Buchbinder E, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways. *Am J Clin Oncol.* 2016; 39: 98-106

- Burnett FM. Immunological surveillance. Oxford: Pergamon Press; 1970
- Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. Arch Biochem Biophys 2014; 561: 3-12
- Chow J, Guise T, Chirgwin J. The critical role of the bone microenvironment in cancer metastases. Mol Cell Endocrinol 2009; 310: 71-81
- D'Haese J, Demir I, Friess H et al. Fractalkine/CX3CR1: why a single chemokine-receptor duo bears a major and unique therapeutic potential. Expert Opin Ther Targets.2010; 14: 207-219
- Das M, Zhy C, Kuchroo V. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. Immunol Rev 2017; 276: 97-111
- De Groot P, Wu C, Carter B, Munden R. The epidemiology of lung cancer. Transl Lung Cancer Res. 2018; 7: 220-233
- Diem S, Schmid S, Krapf M et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) as prognostic markers in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with nivolumab. Lung Cancer 2017; 11: 176-181
- Dieu-Nosjean M, Giraldo N, Kaplon H et al. Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancer. Immunol Rev. 2016; 27: 260-275
- Dodagatta-Marri E, Meyer D, Reeves M et al. Anti-PD-1 therapy elevates Treg/Th balance and increases tumor cell pSmad3 that are both targeted by a-TGFb antibody to promote durable rejection and immunity in squamous cell carcinomas. J Immunother Cancer 2019; 7: 62
- Dunn G, Bruce A, Ikeda H et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol. 2002; 3: 991-998
- Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. Ned Tidschr Geneesk. 1909; 5: 273-290
- Erreni M, Siddiqui I, Marelli G et al. The fractalkine-receptor axis improves human colorectal cancer prognosis by limiting tumor metastatic dissemination. J Immunol 2016; 196: 902-914
- Erreni M, Solinas G, Brescia P et al. Human glioblastoma tumours and neural cancer stem cells express the chemokine CX3CL1 and its receptor CX3CR1. Eur J Cancer 2010; 46: 3383-3392
- Eruslanov E, Bhojnagarwala P, Quatromoni J et al. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell response in early-stage human lung cancer. J Clin Invest. 2014; 124: 5466-5480
- Ferreti E, Pistoia V, Corcione A. Role of fractalkine/CX3CL1 and its receptor in the pathogenesis of inflammatory and malignant disease with an emphasis on B Cell Malignancies. Mediators Inflamm. 2014; 2014: 480941
- Fidler I. The pathogenesis of cancer metastasis: The « seed and soil » hypothesis revisited. Nat Rev Cancer 2002; 3: 453-458

- Francisco L, Salinas V, Brown K, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2009; 206:3015–3029
- Gadeel S, Rodriguez-Abreu D, Speranza G et al. Updated analysis from Keynote-189: Pembrolizumab or placebo plus Pemetrexed and platinum for previously untreated metastatic non squamous NSCLC. *J Clin Oncol* 2020; 38: 1505-1517
- Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discovery* 2012; 11: 215–233
- Garnier C, Soumelis V, Mandavit M et al. Les « immune checkpoints » comment ça marche. *Annales de pathologie* 2017; 37: 18-28
- Germain C, Gnjatic S, Tamzalit F et al. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am J Resp Crit Care Med* 2014; 189: 832-844
- Ghiringhelli F, Menard C, Puig P et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 641-648
- Goc J, Germain C, Vo-Bourgais T et al. Dendritic cells in tumor associated tertiary lymphoid structures signal Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res* 2014; 74: 705-715
- Guo J, Chen T, Wang B et al. Chemoattraction, adhesion and activation of natural killer cells are involved in the antitumor immune response induced by fractalkine/CX3CL1. *Immunol Lett* 2003; 89: 1-7
- Guo J, Zhang M, Wang B et al. Fractalkine transgene induces T-Cell dependent antitumor immunity through chemoattraction and activation of dendritic cells. *Int J Cancer* 2003; 103: 212-220
- Han S, Toker A, Liu Q et al. Turning the Tide against regulatory T cells. *Front Oncol* 2019; 9: 279
- Hanahan D. and Weinberg R. Hallmarks of cancer. The next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674
- Hanahan, D. and Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70
- Hassin D, Garber O, Meiraz A et al. Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable. *Immunology* 2011; 133: 190-196
- Hay E, Lemonnier J, Fromige O et al. Bone morphogenic protein receptor IB signaling mediates apoptosis independently of differentiation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 1650-1658

Hendry S, Salgado R, Gevaert T et al. Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologist and proposal for a standardized method from the immunology biomarkers working group: Part 2. *Adv Anat Pathol* 2017; 24: 311-335

Henry D, Costa L, Goldwasser F et al. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastasis in patient with advanced cancer or multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 2011; 29: 1125-1132

Hoshino A, Ueha S, Hanada S, et al. Roles of chemokine receptor CX3CR1 in maintaining murine bone homeostasis through the regulation of both osteoblasts and osteoclasts. *J Cell Sci* 2013; 126: 1032–1045

Hu X, Zhang J, Wang J et al. Landscape of B cell immunity and related immune evasion in human cancer. *Nat Genet* 2019; 51: 560-567

Huang L, Ma B, Ma J et al. Fractalkine/CX3CR1 axis modulated the development of pancreatic ductal adenocarcinoma via JAK/STAT signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 493: 1510-1517

Hyakudomi M, Matsubara T, Hakudomi R et al. Increased expression of fractalkine is correlated with a better prognosis and an increased number of both CD8+T cells and natural killer cells in gastric adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2008; 15: 1775-1782

Imai T, Hieshima K, Baba M et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1 which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997; 91: 521-530

IUIS/WHO subcommittee on Chemokine Nomenclature. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Cytokine* 2003; 7: 48-49

Jamieson-Gladney W, Zhang Y, Fong A et al. The chemokine receptor CX3CR1 is directly involved in the arrest of breast cancer cells to the skeleton. *Breast Cancer Res* 2011; 13: R91

Jemal A, Bray F, Center M et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69–90

Kaplon H, Dieu-Nosjean M. Quel avenir pour les lymphocytes B infiltrant les tumeurs solides. *Médecine/sciences* 2018; 34: 72-78

Karagiannis P, Gilbert A, Josephs D, et al. IgG4 subclass antibodies impair antitumor immunity in melanoma. *J Clin Invest* 2013; 123: 1457-1474

Kee J, Arita Y, Shinohara K et al. Antitumor immune activity by chemokine CX3CL1 in an orthotopic implantation of lung cancer model in vivo. *Mol Clin Oncol* 2013; 1: 35-40

Keir M, Butte M, Freeman G et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008; 26: 677-704

Keir M, Francisco L, Sharpe A. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 309-314

- Knee D, Hewes B, Brogdon J. Rational for anti-GITR cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* 2016; 67: 1-10
- Koizumi K, Saitoh Y, Minami T, et al. Role of CX3CL1/Fractalkine in Osteoclast Differentiation and Bone Resorption. *J Immunol* 2009; 183: 7825–7831
- Kolahian S, Oz H, Zhou B et al. The emerging role of myeloid-derived suppressor cells in lung disease. *Eur Respir J.* 2016; 47: 967-977
- Kuby Immunology seventh edition. North American Edition. New York 2013
- Kuchuk M, Addison C, Clemons M et al. Incidence and consequences of bone metastases in lung cancer patients. *J Bone Oncol.* 2012; 2: 22-29
- Langley R, Fidler I. The seed and soil hypothesis revisited-the role of tumor stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer* 2011; 128: 2527-2535
- Le Cancer en France Edition 2014. Institut national du Cancer disponible en ligne: <http://lesdonnees.e-cancer.fr>
- Levasseur R. Physiologie du tissu osseux. EMC-Appareil locomoteur 2019; 14: 1-24
- Li J, Figueira S, Vrazo A et al. Real-Time Detection of CTL function reveals distinct patterns of caspase activation mediated by Fas versus Granzyme B. *J Immunol* 2014; 193: 519-528
- Liu C, Workman C, Vignali D. Targeting regulatory T cells in tumors. *The FEBS journal* 2016; 283: 2731-2748
- Liu P, Liang Y, Jiang L et al. CX3CL1/fractalkine enhances prostate cancer spinal metastasis by activating the Src/FAK pathway. *Int J Oncol* 2018; 53: 1544-1556
- Liu W, Jiang L, Bian C et al. Role of CX3CL1 in disease. *Arch Immuno Ther Exp* 2016; 64: 371-383
- Liu W, Liang Y, Chan Q et al. CX3CL1 promotes lung cancer cell migration and invasion via the Src/focal adhesion kinase signaling pathway. *Oncol Rep* 2019; 41: 1911-1917
- Long L, Zhang X, Chen F et al. The promising immune checkpoint LAG-3: from tumor microenvironment to cancer immunotherapy. *Genes Cancer* 2018; 9: 176-189
- Lopez-Olivo M, Shah N, Pratt G et al. Bisphosphonates in the treatment of patients with lung cancer and metastatic bone disease: a systematic review and meta-analysis. *Support Care Cancer* 2012; 20: 2985-2998
- Lu L, Xu X, Zhang B et al. Combined PD-1 blockade and GITR triggering induce a potent antitumor immunity in murine cancer models and synergizes with chemotherapeutic drugs. *J Translat Med* 2014; 12: 36
- Lund F. Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Curr opin Immunol* 2008; 20: 332-338

- Ma J, Xu H, Wang S. Immunosuppressive role of myeloid-derived suppressor cells and therapeutic targeting in lung cancer. *J Immunol Res.* 2018; 25: 6319649
- Main H, Xie J, Muralidhar G et al. Emergent role of the fractalkine axis in dissemination of peritoneal metastasis from epithelial ovarian cancer. *Oncogene* 2017; 36: 3025-3036
- Mantovani A, Savino B, Locati M et al. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010; 21: 27-39
- Marchesi F, Piemonti L, Fedele G et al. The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 9060-9069
- Marshall H, Djamgoz M. Immuno-Oncology: Emerging Targets and Combination therapies. *Front Oncol* 2018; 8: 315
- Matic I, Matthews B, Wang X et al. Quiescent bone lining cells are major source of osteoblasts during adulthood. *Stem Cells* 2016; 34: 2930-2942
- Matsubara T, Ono T, Yamanoi A et al. Fractalkine-CX3CR1 axis regulates tumor cell cycle and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol* 2007; 95: 241-249
- Mauri F, Pinato D, Trivedi P et al. Isogenic comparison of primary and metastatic lung cancer identifies CX3CR1 as a molecular determinant of site-specific metastatic diffusion. *Oncol Rep* 2012; 28: 647-653
- Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 2011; 480: 480-489
- Migliorini F, Maffulli N, Trivellas A et al. Bone metastases: a comprehensive review of the literature. *Mol Biol Rep* 2020; 47: 6337-6345
- Mizoguchi E, Mizoguchi A, Preffer FI, Bhan AK. Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int Immunol* 2000; 12: 597-605
- Mok T, Camidge D, Gadgeel S et al. Updated overall survival and final progression-free survival data for patients with treatment-naïve advanced ALK-positive NSCLC in the ALEX study. *Ann Oncol* 2020; 11: 39796-9
- Nakayama T, Watanabe Y, Oiso N et al. Eotaxine-3/CC Chemokine ligand 26 is a functional ligand for CX3CR1. *J Immunol* 2010; 185: 6472-6479
- Noy R, Pollard J. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity.* 2014; 41: 49-61
- Ohta M, Tanaka F, Yamaguchi H et al. The high expression of Fractalkine results in a better prognosis for colorectal cancer patient. *Int J Oncol.* 2005; 26: 41-44

- Pardoll D. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 252-264
- Park M, Lee J, Yoon J. High expression of CX3CL1 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor infiltrating CD8+ T cells, and dendritic cells in breast carcinoma. *J Surg Oncol*. 2012; 106: 386-392
- Paterson A, Lovitch S, Sage P, et al. Deletion of CTLA-4 on regulatory T cells during adulthood leads to resistance to autoimmunity. *J Exp Med* 2015; 212: 1603–1621
- Petersen R, Campa M, Sperlazza J et al. Tumor infiltrating FOXP3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer* 2006; 107: 2866-2872
- Prager I, Liesche C, van Ooijen H et al. NK cells switch from granzyme B to death receptor-mediated cytotoxicity during serial killing. *J Exp Med* 2019; 216: 2113-2127
- Remark R, Becker C, Gomez J et al. The non-small cell lung cancer immune contexture. A major determinant of tumor characteristics and patient outcome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015; 191: 377-390
- Ren F, Zhao Q, Huang L et al. The R132H mutation in IDH1 promotes the recruitment of NK cells through CX3CL1/CX3CR1 chemotaxis and is correlated with a better prognosis in gliomas. *J Neuroimmunol* 2010; 224: 39-44
- Roy I, Evans D, Dwinell M. Chemokines and chemokine receptors: update on utility and challenges for the clinician. *Surgery* 2014; 155: 961-973
- Sage P, Francisco L, Carman C, Sharpe A. PD-1 controls lymph node and blood T follicular regulatory cells. *Nat Immunol* 2013; 14: 152–161
- Santini D, Barni S, Intagliata S et al. Natural history of non-small-cell lung cancer with bone metastases. *Sci Rep* 2015; 5: 1870
- Schmall A, Al-Tamari H, Herlod S et al. Macrophage and cancer cell crosstalk via CCR2 and CX3CR1 is a fundamental mechanism driving lung cancer. *Am J Resp Critic Care Med*. 2015; 191: 437-447
- Schmid-Alliana A, Schmid-Antomarchi H, Al-Sahlanee R et al. Understanding the progression of bone metastases to identify novel therapeutic targets. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 148
- Sciumé G, Soriani A, Piccoli M et al. CX3CR1/CX3CL1 axis negatively controls glioma cell invasion and is modulated by transforming growth factor-B1. *Neuro Oncol* 2010; 12: 701-710
- Seidel J, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD1 and anti-CTLA 4 therapies in cancer: mechanism of action, efficacy, and limitations. *Front Oncol* 2018; 8: 86
- Shiels M, Shu X, Chaturvedi A et al. A prospective study of immune and inflammation markers and risk of lung cancer among female never smokers in Shanghai. *Carcinogenesis*. 2017; 38: 1004-1010

- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, et al. Stimulation of CD25+ CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002; 3: 135e42
- Shulby S, Dollof N, Stearns M et al. CX3CR1-Fractalkine expression regulates cellular mechanisms involved in adhesion, migration and survival of human prostate cancer cells. *Cancer Research* 2004; 64: 4693-4698
- Siddiqui J, Partridge N. Physiological bone remodeling: systemic regulation and growth factor involvement. *Physiology* 2016; 31: 233-245
- Simonet W, Lacey D, Dunstan C et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-319
- Singh S, Mishra M, Singh R. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  induces CX3CR1 expression and promotes the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in ovarian cancer cells. *J Ovarian Res* 2019; 12: 42
- Su Y, Chang H, Sun S et al. Differential impact of CX3CL1 on lung cancer prognosis in smokers and non-smokers. *Mol Carcinol*. 2018; 57: 629-639
- Tamminga M, Hitlermann T, Schuurin E et al. Immune microenvironment composition in non-small cell lung cancer and its association with survival. *Clin Transl Immunology*. 2020; 9: e1142
- Tang J, Chen Y, Cui R et al. Upregulation of fractalkine contributes to the proliferative response of prostate cancer cells to hypoxia via promoting the G1/S phase transition. *Mol Med Rep* 2015; 12: 7907-7914
- Tang J, Xiao L, Cui R et al. CX3CL1 increases invasiveness and metastasis by promoting epithelial-to-mesenchymal transition through the TACE/TGF- $\alpha$ /EGFR pathway in hypoxic androgen-independent prostate cancer. *Oncol Rep* 2016; 35: 1153-1162
- Tao H, Mimura Y, Aoe K, et al. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer* 2012; 75: 95–101
- Tardaguila M, Mira E, Garcia-Cabezas M et al. CX3CL1 promotes breast cancer via transactivation of the EGF pathway. *Cancer Res* 2013; 73: 4461-4473
- Terme M, Tanchot C. Système immunitaire et tumeurs. *Annales de pathologie* 2017; 37: 11-17
- Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol*, 2001; 2: 129-134
- Thomas L. Discussion of cellular and humoral aspects of hypersensitive states. In: Lawrence HS editor. New York, Hoeber-Harper. 1959
- Toppets V, Pastoret V, De Behr V et al. Morphologie, croissance et développement du tissu osseux. *Ann Med Vet* 2004; 148: 1-13

- Tsang J, Ni Y, Chan S et al. CX3CL1 expression is associated with poor outcome in breast cancer patients. *Brest Cancer Res Treat* 2013; 140:495-504
- Upham J, Xi Y. Dendritic cells in human lung disease: recent advances. *Chest* 2017; 151: 668-673
- Vitale S, Cambien B, Karimdjee B et al. Tissue-specific differential antitumor effect of molecular forms of fractalkine in a mouse model of metastatic colon cancer. *Gut* 2007; 56: 365-372
- Vokes E, Ready N, Felip E et al. Nivolumab versus docetaxel in previously treated advanced NSCLC: 3-year update and outcomes in patients with liver metastases. *Ann Oncol* 2018; 29: 959-865
- Vugnat P, Champiat S. Immunothérapies anti-checkpoints: aspects fondamentaux. *MCED* 2018; 95: 5-10
- Wang H, Cai J, Shaoxia D et al. Fractalkine/CX3CR1 induces apoptosis resistance and proliferation through the activation of the AKT/NFκB cascade in pancreatic cancer cells. *Cell Biochem Funct.* 2017; 35: 315-326
- Wang M, Xia F, Wei Y, Wei X. Molecular mechanisms and clinical management of cancer bone metastasis. *Bone Res* 2020; 8: 30
- Wei L, Cao S, Yu W et al. Overexpression of CX3CR1 is associated with cellular metastasis, proliferation and survival in gastric cancer. *Oncol Rep* 2015; 33: 615-624
- Welch D, Hurst D. Defining the Hallmarks of metastasis. *Cancer Res* 2019; 79: 3011-3027
- White G, Greaves D. Fractalkine: one chemokine, many functions. *Blood* 2009; 113: 767-768
- Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al. CTLA-4 control over Foxp3 + regulatory T cell function. *Science* 2008; 322: 271-275
- Xiang L, Gilkes M. The contribution of the immune system in bone metastasis pathogenesis. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 999
- Xu X, Wang Y, Chen J et al. High expression of CX3CL1/CX3CR1 axis predicts a poor prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2012; 16: 1493-1498
- Yao X, Qi L, Chen X et al. Expression of CX3CR1 associates with cellular migration, metastasis, and prognosis in human clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2014; 32: 162-170
- Zhou B, Xu H, Kewei N et al. Expression of chemokine XCL2 and CX3CL1 in lung cancer. *Med Sci Monit.* 2016; 22: 1560-1565
- Zhu L, Davoodi M, Srivastava M et al. GITR agonist enhances vaccination responses in lung cancer. *Onco Immunology* 2015; 4: 4, e992237