



**HAL**  
open science

## Rôle de CD95/CD95L dans les cancers du sein triple négatifs et de l'ovaire

Thibault de La Motte Rouge

► **To cite this version:**

Thibault de La Motte Rouge. Rôle de CD95/CD95L dans les cancers du sein triple négatifs et de l'ovaire. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2021. Français. NNT : 2021REN1B042 . tel-03627697

**HAL Id: tel-03627697**

**<https://theses.hal.science/tel-03627697>**

Submitted on 1 Apr 2022

**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.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605  
*Biologie Santé*  
Spécialité : *Cancérologie*

Par

**Thibault DE LA MOTTE ROUGE**

**Rôle de CD95/CD95L dans les cancers du sein triple négatifs et de l'ovaire.**

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 29 novembre 2021

Unité de recherche : ER 440, COSS Chemistry, Oncogenesis, Stress and Signaling INSERM U1242

## **Rapporteurs avant soutenance :**

Alejandra MARTINEZ PU-PH, Université de Toulouse  
Hélène LE BUANEC CR, Université de Paris, INSERM U976

## **Composition du Jury :**

Président : Nathalie RIOUX-LECLERCQ  
Examineurs : Marie Dominique GALIBERT  
Benoît YOU  
Alejandra MARTINEZ  
Hélène LE BUANEC  
Dir. de thèse : Vincent LAVOUE

PU-PH, Université de Rennes 1  
PU-PH, Université de Rennes 1  
PU-PH, Université de Lyon 1  
PU-PH, Université de Toulouse  
CR, Université de Paris, INSERM U976  
PU-PH, Université de Rennes 1



## Table des matières

Résumé .....	3
Abstract .....	4
Liste des abbreviations .....	5
1. Introduction .....	8
1.1. Cancers du sein triple négatifs et cancers de l'ovaires .....	8
1.1.1. Généralités.....	8
a. Les cancers du sein triple négatifs.....	8
b. Analogie cancers du sein triple négatifs et cancers de l'ovaire .....	12
c. Cancers de l'ovaire .....	13
1.2. Rôle de l'immunité dans le contrôle tumoral .....	17
1.2.1. Généralités.....	17
a. Propriétés des cellules tumorales sur le système immunitaire.....	19
b. Caractéristiques de l'infiltrat immunitaire .....	20
c. Impact du stroma et de la vascularisation sur la réponse immune.....	26
1.2.2. Système immunitaire et cancers du sein triple négatifs .....	28
a. Caractéristiques de la réponse immune.....	28
b. Stratégie thérapeutique ciblant le système immunitaire.....	32
1.2.3. Système immunitaire et cancers de l'ovaire séreux de haut grade .....	35
a. Caractéristiques de la réponse immune.....	35
b. Stratégie thérapeutique ciblant le système immunitaire.....	37
1.3. CD95/CD95L : rôles biologiques .....	40
1.3.1. La famille des ligands et des récepteurs de mort .....	40
a. Généralités .....	40
b. CD95.....	40
c. CD95L.....	41
1.3.2. Signalisation CD95/CD95L pro-apoptotique .....	42
1.3.3. Signalisation non-apoptotique .....	45
a. Régulation des fonctions des cellules immunitaires.....	45
b. Migration cellulaire .....	49
c. adhésion et structure cellulaire .....	50
d. Homéostasie des cellules souches.....	51

e. Conclusion .....	52
1.3.4. CD95/CD95L et cancers .....	53
a. Généralités .....	53
b. Cancers du sein triple négatifs.....	57
c. Cancers de l’ovaire .....	58
2. Hypothèse et objectifs .....	60
3. Résultats.....	62
Article 1 - Le taux sérique de CD95L est corrélé avec l'infiltration immunitaire tumorale et est un marqueur pronostic positif pour le cancer de l'ovaire séreux avancé de haut grade. Mol Cancer Res. 2019 Dec;17(12):2537-2548 (241) .....	62
Article 2 - le cycle congélation-décongélation des cellules de cancers du sein triple négatifs modifie les profils CD24 / CD44 des cellules tumorales et le pourcentage de cellules immunitaires infiltrant la tumeur. BMC Res Notes. 2018 Jun 20;11(1):401 (242).....	78
Article 3 – Maintien du CD95 sur les cellules de cancers du sein triple négatifs pour éviter l'activité anti-tumorale des cellules NK. Submitted. bioRxiv 2021.02.12.431011; doi: <a href="https://doi.org/10.1101/2021.02.12.431011">https://doi.org/10.1101/2021.02.12.431011</a> .....	100
4. Discussion .....	132
5. Perspectives et conclusion .....	133
Bibliographie.....	136
Remerciements .....	156

## Résumé

Les cancers du sein triple négatifs et les cancers de l'ovaire séreux de haut grade sont des pathologies dont le pronostic reste relativement sombre. Récemment, il a été montré que ces 2 cancers partagent des caractéristiques biologiques communes, notamment sur le plan génomique. Par ailleurs, il a été montré que le système immunitaire joue un rôle important dans le contrôle de l'évolution tumorale dans ces 2 maladies. Initialement caractérisée par son rôle dans l'apoptose des cellules immunitaires, la signalisation activée par l'interaction CD95/CD95L et son ligand soluble sCD95L est impliquée dans de nombreux rôles biologiques au-delà de l'apoptose. Cette voie semble notamment jouer un rôle important dans les processus d'oncogénèse. Notre équipe avait montré le rôle pronostic négatif du sCD95L qui favorise l'invasion tumorale et les métastases chez les patientes atteintes de cancers du sein triple négatifs. Ces résultats nous ont conduit à étudier l'impact de cette voie dans les cancers de l'ovaire, et à poursuivre la caractérisation des effets biologiques dans les cancers du sein triple négatifs. Dans les cancers de l'ovaire, nous avons retrouvé un rôle pronostic positif du sCD95L, contrairement aux cancers du sein triple négatifs. Le niveau de sCD95L est corrélé à l'infiltrat immunitaire, soulevant l'hypothèse d'une régulation de cet infiltrat par la signalisation CD95/CD95L. En effet, dans les cancers du sein triple négatifs, nous avons retrouvé un impact de la signalisation CD95 sur la réponse immune anti-tumorale, en particulier sur les lymphocytes NK. Ces travaux montrent qu'une meilleure compréhension des mécanismes biologiques activés par la voie CD95/CD95L dans les cancers de l'ovaire séreux de haut grade et dans les cancers du sein triple négatifs pourrait permettre de mieux sélectionner les patientes pour des traitements modulant la réponse immune. De plus, le ciblage de cette voie pourrait permettre d'améliorer la prise en charge thérapeutiques de ces pathologies de mauvais pronostic.

## Abstract

Triple-negative breast cancer and high-grade serous ovarian cancer have a relatively poor prognosis. Recently, it has been shown that these two cancers share common biological characteristics, notably on the genomic level. Moreover, it has been shown that the immune system plays an important role in the control of tumor progression in these 2 diseases. Initially characterized by its role in immune cell apoptosis, the signaling activated by the CD95/CD95L interaction and its soluble ligand sCD95L is involved in many biological roles beyond apoptosis. This pathway seems to play an important role in oncogenesis processes. Our team had shown the negative prognostic role of sCD95L which promotes tumor invasion and metastasis in patients with triple negative breast cancer. These results led us to study the impact of this pathway in ovarian cancer and to further characterize the biological effects in triple negative breast cancer. In ovarian cancers, we found a positive prognostic role for sCD95L, in contrast to triple negative breast cancers. The level of sCD95L correlates with the immune infiltrate, raising the hypothesis that this infiltrate is regulated by CD95/CD95L signaling. Indeed, in triple-negative breast cancer, we found an impact of CD95 signaling on the anti-tumor immune response, in particular on NK lymphocytes. This work shows that a better understanding of the biological mechanisms activated by the CD95/CD95L pathway in high-grade serous ovarian cancer and in triple-negative breast cancer could allow a better selection of patients for treatments modulating the immune response. In addition, targeting this pathway could improve the therapeutic management of these poor prognosis diseases.

## Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

Ag : Antigène

AID : Activation-Induced Deaminase

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AR : Androgène Récepteur

ARN : Acide Ribonucléique

BL1 : Basal-Like 1

BL2 : Basal-Like 1

BLIA : Basal-Like avec activation immunitaire

BLIS : Basal-Like immune-supprimé

BRCA : gene BReast CAncer

CAF : fibroblastes associés au cancer

CAR-T : Chimeric Antigen Receptor-T

CD95 : Cluster Domain 95, Fas

CD95L : ligand membranaire de CD95

CEO : Carcinome Epithélial de l'Ovaire

CID : calcium-inducing domain

CSTN : Cancers du Sein Triple Négatifs

DC : cellules dendritiques

DD : domaine de mort

DICE : mort induite par l'élimination de CD95 ou CD95L

DISC : complexe induisant la signalisation de mort

FADD : protéine associée au domaine de mort

GZMB : Granzyme B

HR: recombinaison homologue

HRD : déficience de la recombinaison homologue  
ID : désert immunitaire  
IM : immuno-modulé  
iPARP : inhibiteur de poly(ADP-ribose) polymérase  
LAR : sous-type luminal dépendant des récepteurs aux androgènes  
M : sous-type mésenchymal  
MDSC : cellules myéloïdes suppressives  
MES : sous-type mésenchymateux  
MHC : complexe majeur d'histocompatibilité  
MMP : métalloprotéinase  
MMR-D : déficience de la réparation des mésappariements  
MR : sous-type restreint à la marge  
MSI-H : instabilité élevée des microsatellites  
MSL : sous-type mésenchymal stem like  
NK : lymphocytes natural killer  
RO : récepteur aux œstrogènes  
RP : récepteur à la progestérone  
sCD95L : ligand soluble du CD95  
SG : survie globale  
SR : sous-type restreint au stroma  
SSP : survie sans progression  
STIC : carcinome séreux intra-tubaire  
TAA : antigènes associés aux tumeurs  
TAMs : macrophages associés aux tumeurs  
TCGA : atlas des génomes du cancer  
TCM : cellules T mémoires centrales

TEM : cellules T mémoires effectrices

TIL : cellules T infiltrant les tumeurs

TLS : structures lymphoïdes tertiaires

TME : microenvironnement tumoral

TRM : cellules T mémoires résidentes

TSCM : cellules T mémoires souche lymphocytaires

## 1. Introduction

Les cancers du sein triple négatifs et les cancers de l'ovaire séreux de haut grade sont des pathologies rencontrées fréquemment en oncologie. Ils partagent de nombreuses similitudes sur le plan moléculaire et biologique, comme l'ont montré la découverte de gènes de prédisposition communs comme BRCA mais également les analyses génomiques tumorales. Des mécanismes biologiques découverts dans une des tumeurs sont souvent retrouvés dans l'autre, incitant à les étudier de manière conjointe, pour mettre en évidence les analogies mais aussi les différences existantes.

### 1.1. Cancers du sein triple négatifs et cancers de l'ovaires

#### 1.1.1. Généralités

##### a. Les cancers du sein triple négatifs

##### 1. Epidémiologie

Les cancers du sein représentent la première cause de cancer chez la femme dans le monde (1). Les cancers du sein triple négatifs (CSTN) constituent un groupe hétérogène caractérisé par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux aux œstrogènes (RO) et à la progestérone (RP) et l'absence de surexpression du récepteur à « l'Epidermal Growth Factor » (EGF), HER-2. Les données épidémiologiques montrent que les CSTN représentent environ 15% des cancers du sein et surviennent principalement chez les jeunes femmes pré-ménopausées de moins de 40 ans (2). Ce sont le plus souvent des tumeurs agressives, ou de haut grade, avec un risque de rechute élevé (jusqu'à 40% (3)). La majorité sont diagnostiquées à un stade localisé, mais présente des taux de survie plus faibles que les cancers du sein hormono-dépendants (4). Les CSTN métastatiques ont un pronostic sombre, avec une médiane de survie d'environ 15 mois (5).

##### 2. Classification moléculaire des CSTN

Un effort majeur a été consacré au cours de la dernière décennie pour classer les CSTN en sous-types cliniques et moléculaires distincts qui pourraient prédire l'évolution clinique et guider les décisions de traitement. La caractérisation des

altérations génétiques, épigénétiques, transcriptomiques et protéomiques du microenvironnement tumoral ont permis (6) une compréhension accrue des mécanismes biologiques à la fois au niveau des cellules tumorales, mais également de la réponse immunitaire et stromale de l'organisme au développement d'une tumeur, et permet de commencer à envisager un modèle plus intégré des processus conduisant à l'évolution du cancer (figure 1). L'analyse génomique tumorale a permis de distinguer plusieurs sous-types au sein d'un même cancer. Du fait des méthodes utilisées, notamment dans les premières publications, les cellules tumorales et leur environnement étaient analysés conjointement, sans réellement distinguer ces 2 compartiments. Plus récemment, de nouvelles techniques basées sur l'analyse de cellules uniques (single cell, Cytof, ...) ont fait progresser la compréhension des interactions entre les cellules cancéreuses et l'organisme hôte. Il nous manque cependant encore une vision intégrée de la biologie des tumeurs et les classifications basées sur les différentes techniques d'analyses se recoupent encore de manière imparfaite.

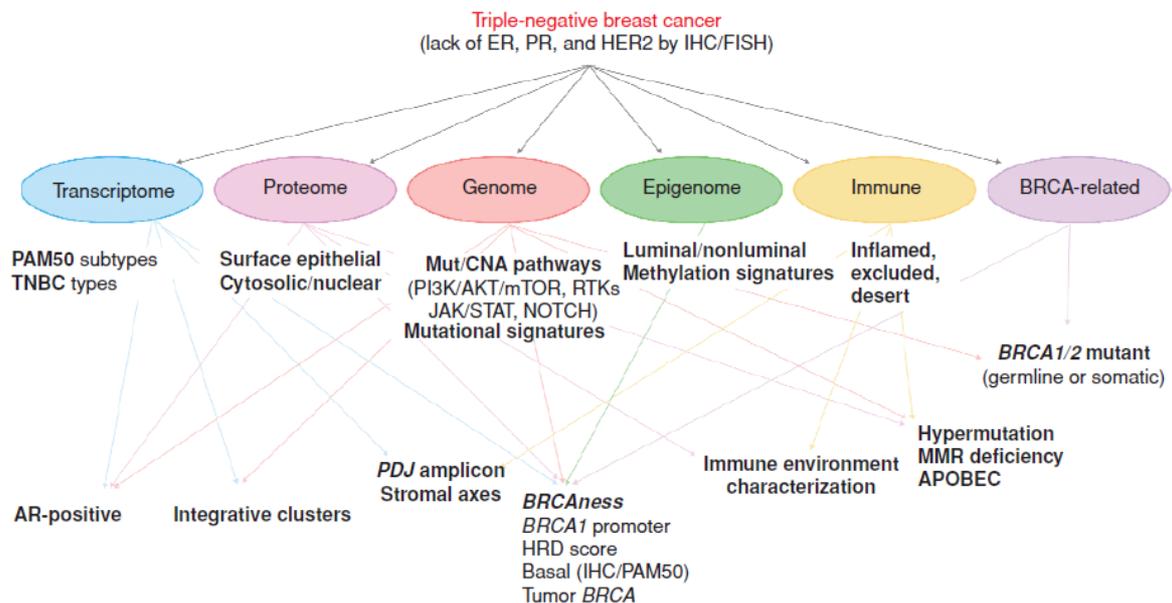


Figure 1 : Vue d'ensemble des interactions complexes entre les classifications moléculaires du CSTN basées sur la caractérisation génomique, transcriptomique, protéomique, épigénomique et immunitaire de la tumeur et de son microenvironnement [d'après Garrido-Castro (6)].

## **Classification génomique des cancers du sein triple négatifs**

L'étude des profils d'expression génique a permis à Lehmann et collaborateurs d'identifier 6 groupes de tumeurs caractérisés par la présence d'altérations moléculaires distinctes, en termes d'expression d'ARN, de mutations somatiques et de variations du nombre de copies de gènes (figure 2) (7) :

- Le sous-type « basal-like 1 » (BL1) : défini par l'altération de gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN et la régulation du cycle cellulaire (taux élevé de mutations TP53 (92%), gain / amplifications élevés de MYC, CDK6 ou CCNE1, et délétions de BRCA2, PTEN, MDM2 et RB1 (8).
- Le sous-type « basal-like 2 » (BL2) : présente l'activation des voies de signalisation des facteurs de croissance et des voies métaboliques. BL1 et BL2 partagent un phénotype hautement prolifératif.
- Le sous-type « immunomodulatory » (IM) présente une forte expression de gènes (comme JAK / STAT, TNF et NFkB) impliqués dans le traitement et la présentation des antigènes, les voies de signalisation des cellules immunitaires et des cytokines
- Les sous-types mésenchymateux « mesenchymal » (M) et « mesenchymal stem-like » (MSL) présentent des profils d'expression similaires liés à la motilité cellulaire, à la différenciation et à la transition épithéliale mésenchymateuse. Par rapport au sous-type M, le sous-type MSL se distingue par des gènes associés à l'angiogenèse et aux cellules souches, et une faible expression de la claudine (« claudin-low »).
- Enfin, le sous-type luminal-AR (LAR) se qualifie par l'expression élevée du récepteur des androgènes (AR).

Cette classification a été revue car il a été montré que l'infiltration tumorale par des cellules stromales (fibroblastes, lymphocytes, cellules mésenchymateuses associées à la tumeur) influençait la définition des sous-types IM et MSL (9). Les données génomiques ont été ré-analysées après microdissection pour sélectionner uniquement les cellules tumorales et au final seul 4 sous-types transcriptionnels stables (BL1, BL2, M et LAR) ont été identifiés après cette révision.

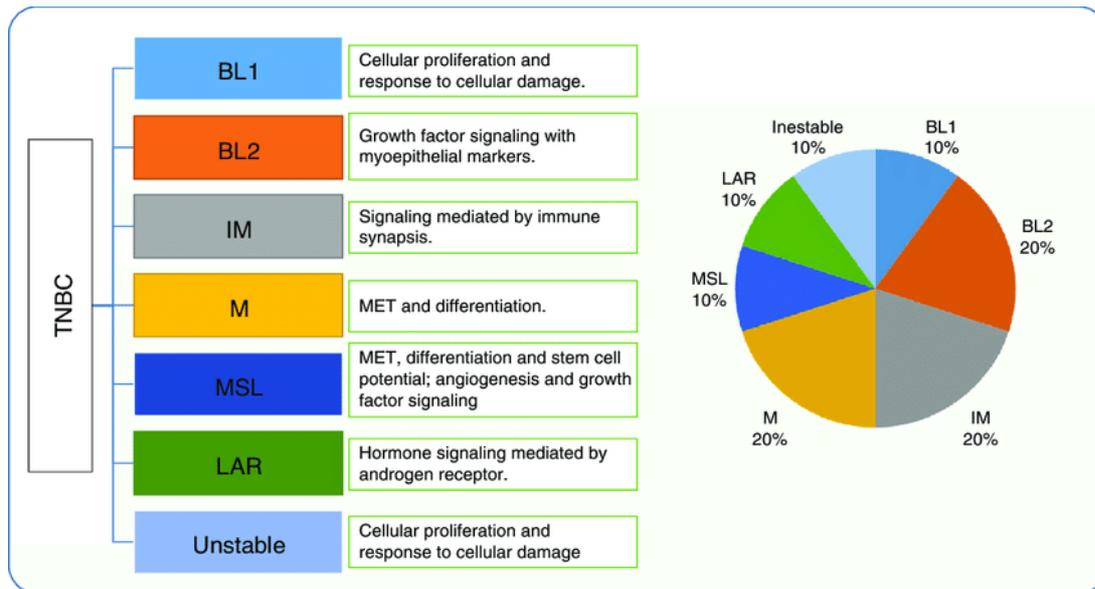


Figure 2 : Classification des cancer du sein triple négatifs selon Lehman [d'après (10)]

Deux autres études ont confirmé en partie ces analyses :

- Classification de Burstein et collègues identifiant 4 sous-types : LAR, mésenchymateux (MES), basal immunodéprimé (BLIS) et basal activé avec activation immunitaire (BLIA) (11).
- Classification FUSCC (12), intégrant l'analyse des longs ARN non codants et identifiant également 4 sous-types différents au sein des CSTN : IM, LAR, MES, and BLIS.

### **Principales altérations génétiques somatiques et voies de signalisations impactées dans les cancers du sein triple négatifs.**

La plupart des mutations somatiques du CSTN se situent dans les gènes suppresseurs de tumeur (par exemple, TP53, RB1 et PTEN). Bien que moins fréquentes, des altérations oncogéniques de la voie PI3K / AKT ont également été décrites dans le cancer du sein de type basal (mutation PIK3CA, 7%; amplification AKT3, 28%; mutation ou perte PTEN (13). Dans le sous-type basal, les mutations TP53 sont retrouvées à une fréquence élevée et les données biologiques sur cette voie suggèrent que la perte de la fonction TP53 se produit dans la plupart, sinon la totalité des cancers de type basal (14). Des amplifications de MYC sont également fréquemment décrites (jusqu'à 40%) dans le sous-type basal.

## **Rôle des mutations BRCA et autres anomalies altérant la réparation par recombinaison homologue.**

Des mutations germinales dans BRCA1 ou BRCA2 (BRCA1 / 2) sont présentes chez environ 10% des patients atteints de CSTN (15). Ces anomalies entraînent une altération de la voie de la réparation de l'ADN par recombinaison homologue. Il est intéressant de noter que des mutations somatiques BRCA sont également retrouvées dans 3 à 5 % des CSTN localisés (16,17) et 6% des CSTN métastatiques (18). Plusieurs signatures moléculaires correspondant à un déficit de la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (HRD) ont été proposées pour identifier les tumeurs présentant ces anomalies.

### **3. Traitements**

Les traitements médicaux du CSTN reposent principalement sur la chimiothérapie par anthracyclines et taxanes. Les sels de platine (carboplatine et cisplatine) semblent efficaces, notamment dans le sous-type basal lorsqu'il est identifié une mutation BRCA ou un phénotype HRD (19,20). Les inhibiteurs de PARP (iPARP) talazoparib et olaparib ont obtenus récemment une AMM pour les patientes présentant un CSTN avec mutation germinale BRCA, ayant déjà reçu une chimiothérapie par anthracyclines et/ou taxanes (21–23). Les iPARP sont également efficace en cas de mutation BRCA somatiques (24). L'immunothérapie montre une efficacité assez limitée et semble reinte à certaines patientes. Cette approche est décrite de manière plus détaillée dans la partie 2.

#### **b. Analogie cancers du sein triple négatifs et cancers de l'ovaire**

Les cancers du sein et de l'ovaire sont tous les 2 des tumeurs très hétérogènes avec des caractéristiques morphologiques, biologiques et cliniques très variables. Cependant, pour certains sous-types, notamment les cancers du sein triple négatifs de sous-type basal et les cancers de l'ovaire séreux de haut grade, les analyses génomiques effectuées dans le cadre du Cancer Genome Atlas (TCGA) ont montré qu'il existe une forte similitude (16). Ces deux types de tumeurs présentent un spectre mutationnel similaire et partagent de nombreux événements oncogéniques (perte TP53, mutation BRCA (germinale et somatiques) et altération de la voie HR, perte RB1, gain c-MYC, etc.). La fréquence très élevée de mutation TP53 est similaire dans

les cancers du sein triple négatifs de type basal et les cancers de l’ovaire séreux de haut grade. Ces sous-types particuliers présentent un génome très instable, avec de nombreuses aberrations du nombre de copies et des défauts dans les voies de réparation de l’ADN. En plus de l’inactivation de TP53, les cancers du sein de type basal et les cancers de l’ovaire séreux de haut grade partagent plusieurs caractéristiques distinctives de «BRCAness» (25) . La présence de mutation BRCA, notamment BRCA1, confère un risque très élevé de cancers du sein triple négatifs et de cancers de l’ovaire de haut grade au cours de la vie (26). Les traitements médicaux utilisés pour ce type de cancers sont similaires, avec une place prépondérante des chimiothérapies à base d’antracyclines, taxanes et platine. Les iPARP sont également utilisés avec une efficacité particulière pour les tumeurs présentant une mutation BRCA ou un déficit HR. Enfin, bien qu’un infiltrat immunitaire soit fréquemment associé à ces 2 types de cancers, il faut souligner le relatif échec actuel avec l’immunothérapie, notamment pour les traitements ciblant PD1/PD-L1.

### c. Cancers de l’ovaire

#### 1. Epidémiologie

Les cancers épithéliaux de l’ovaire (CEO) touchent une femme sur 60 dans les pays industrialisés (27). Leur incidence d’environ 4500 cas / an en France représente le 5ème cancer le plus fréquent chez la femme (données INCa/InVS 2011) et la 4ème cause de mortalité par cancer chez la femme. Jusqu’à récemment, le pronostic du cancer de l’ovaire était sombre avec une survie à 5 ans de 30%. Les trois quarts des patientes atteintes de CEO sont diagnostiqués à un stade avancé avec une carcinose péritonéale. Ces patientes avaient jusqu’à récemment une survie à 5 ans inférieure à 15%, sans réel gain en terme de survie globale depuis plusieurs décennies (27). Cependant, ces données pourraient évoluer car des progrès thérapeutiques notables ont été rapportés ces dernières années, notamment grâce à l’utilisation des iPARP en complément de l’approche chirurgicale et de chimiothérapie.

## 2. Classification des cancers épithéliaux de l'ovaire

### **Classification anatomopathologique**

Les cancers de l'ovaire constituent un groupe hétérogène de lésions, qui diffèrent sur le plan épidémiologique, morphologique, profil moléculaire, et pronostique. Leur classification est basée sur la classification internationale de l'OMS dont la dernière version date de 2014. Ils sont classés en différents sous-types en fonction du type histologique du revêtement qui les compose. Pour chaque cancer de l'ovaire, l'examen histopathologique doit déterminer le type et le grade. Ainsi, les cancers épithéliaux de l'ovaire (CEO) peuvent être classés en quatre histologies : les adénocarcinomes séreux de haut grade (71% des cas) et bas grade (4,1%), endométrioïdes (8,3%), à cellules claires (9,5%) et mucineuses (3,2%) (28). Cependant depuis les séries rapportant l'histologie tubaire des annexectomies prophylactiques chez les patientes mutées, il est proposé une classification dualiste répondant à des voies de cancérogénèse distincte (29).

Les CEO de type I représente 25% des cancers de l'ovaire. Ils présentent une grande stabilité génomique et dans leur cancérogénèse un continuum lésionnel du kyste bénin au frontière ? jusqu'au cancer infiltrant. Ils sont diagnostiqués la plupart du temps à un stade précoce et regroupent des sous-type histologiques présentant des mutations oncogéniques dans des voies de signalisation distinctes :

- les carcinomes séreux de bas grade : mutations de KRAS, BRAF, HER2,
- les carcinomes endométrioïdes de bas grade : mutations de PTEN et PI3KCA,
- les carcinomes mucineux : mutations de KRAS
- les carcinomes à cellules claires : mutations de ARID1a, PI3KCA.

Les CEO de type II représentent 75% des cancers de l'ovaire et sont responsables de 90% des décès. Ils sont diagnostiqués à des stades avancés (carcinose), ont une évolution rapide et correspondent aux CO séreux de haut grade, aux CO endométrioïdes de haut grade, aux carcinosarcomes et aux carcinomes indifférenciés. Ils ont en commun d'avoir une mutation de la P53 dans 96% des cas (13). Les CO de type II présentent une grande instabilité génomique et ont comme précurseur les STIC (Serous Tubal Intra Carcinoma) qui sont des proliférations intra-épithéliales tubaires

dont les aspects sont identiques à un carcinome séro-papillaire de haut grade et présentent les mêmes mutations de la P53.

### **Classification moléculaire des CEO séreux de haut grade**

Des analyses moléculaires ont été menées sur les CO séreux de haut grade, sous-type histologique le plus fréquent. Celle du « cancer genome atlas network » portant sur plusieurs centaines de cancers séreux de haut grade ont permis de définir 4 sous-types de profil d'expression différent. Ces analyses ont ainsi défini le sous-type mésenchymateux qui exprime des gènes de la composante stromale (fibroblaste, péricyte vasculaire...), le sous-type prolifératif qui surexprime des facteurs de transcription et de prolifération, le sous-type différencié qui exprime des marqueurs de la différenciation, et le sous-type immunoréactif qui surexprime les gènes des chémokines des lymphocytes T, des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité I et II et le gène PD-L1 (programmed cell death ligand 1) (30). Cette signature semble pronostique : par ordre du pronostic le moins favorable au plus favorable, on retrouve le sous-type mésenchymateux (19% des cas) avec une survie à 5 ans de 18%, le sous-type prolifératif (25% des cas) avec une survie à 5 ans de 22%, le sous-type différencié (25% des cas) avec une survie à 5 ans de 40% et le sous-type immunoréactif avec une survie à 5 ans de 42%. Le sous-type mésenchymateux est caractérisé par un stroma desmoplasique, une expression élevée des composants de la matrice extracellulaire. Le sous-type prolifératif présente un déficit pour les cellules stromales et immunitaires, et surexprime des gènes associés aux cellules souches. Le sous-type différencié est caractérisé par une expression élevée de CA125 / MUC16, un sous-ensemble de cytokines immunomodulatrices, une infiltration lymphocytaire modeste. Le sous-type immunoréactif est dominé par l'infiltration cellulaire intratumorale CD3+ / CD8+, l'expression de cytokines inflammatoires et des résultats généralement plus favorables. Cependant, ces classifications moléculaires ne sont pas utilisées en routine. En effet, la robustesse et la pertinence clinique de ces sous-types restent controversées, avec des difficultés à reproduire les résultats de manière fiables sur des séries externes (31,32). En effet, l'un des défauts de ces classifications est que les différents sous-types de CEO ne sont pas mutuellement exclusifs : un même cancer peut appartenir à 2 sous-groupes, pour une majorité de patientes.

L'hétérogénéité tumorale importante observée au sein même d'un cancer de l'ovaire pourrait être une explication du manque de fiabilité de la classification moléculaire. Il a également été montré que les CEO de haut grades peuvent aussi être distingués selon les mécanismes biologiques impactés par l'oncogénèse, notamment la réparation par recombinaison homologue (HRR) (13,33). Environ 50% des patientes présentent un déficit de l'HRR, appelé HRD, en majorité lié à des mutations dans les gènes BRCA1 et BRCA2. Ces mutations peuvent être constitutionnelles (75-80% des cas) ou uniquement somatiques tumorales (20-25% des cas). Au-delà des mutations BRCA1/2, d'autres modifications génétiques peuvent également entraîner une HRD (hyperméthylation du promoteur de BRCA1, mutations de RAD51C/D, ATM, ATR, BRIP1, CHEK2, PALB2, FANCA, etc.) (13,33–35) (figure 3).

Dans le sous-groupe ne présentant pas d'HRD, il est observé des dérégulations de la voie de signalisation Rb (notamment des amplifications de CCNE1), de la voie PI3K-RAS et de la voie Notch. Des amplifications de BRD4 ont également été décrites.

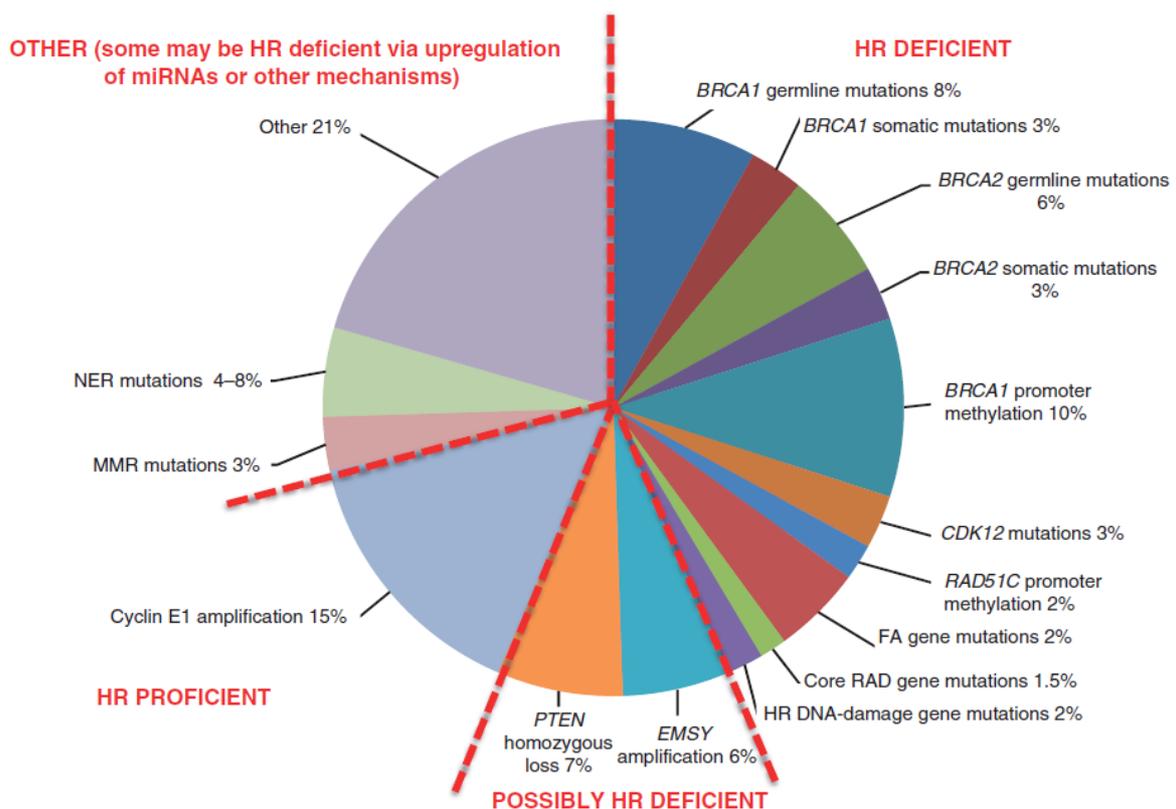


Figure 3 : classification des cancers de l'ovaire séreux de haut grade selon l'altération ou non des mécanismes de la réparation par recombinaison homologue, d'après Konstantinopoulos et al (33).

### 3. Traitements

Les traitements médicaux des cancers de l’ovaire reposent sur la chimiothérapie, principalement les sels de platines (carboplatine) et le paclitaxel. Les anthracyclines sont également efficaces (36). Pour les tumeurs présentant une mutation BRCA ou un déficit HRD, les iPARP sont particulièrement efficaces. Des AMM ont été obtenues pour l’olaparib, le niraparib et le rucaparib suite au bénéfice majeur démontré en maintenance après 1<sup>ère</sup> ligne (37–39) et en rechute sensible au platine (40–42). Les résultats actuellement rapportés avec l’immunothérapie ciblant PD1-PDL1 sont décevants avec une activité modeste de cette approche, et l’absence de confirmation du bénéfice dans les essais de phase III. Nous verrons plus en détails les résultats de cette approche dans la partie 2.

#### 1.2. Rôle de l’immunité dans le contrôle tumoral

##### 1.2.1. Généralités

L’échappement au système immunitaire est une caractéristique intrinsèque des cellules cancéreuses (43). Le système immunitaire est capable de détecter les cellules cancéreuses et de les détruire avant que la tumeur ne se développe. Ce phénomène est appelé l’immunosurveillance antitumorale (44). Au cours de la transformation cellulaire, les cellules cancéreuses peuvent libérer des signaux de danger participant à l’activation des effecteurs de l’immunité innée comme les macrophages, les neutrophiles, les cellules Natural Killer (NK) et les cellules dendritiques (DC). D’autre part, les cellules tumorales présentent une instabilité génétique conduisant à l’expression de protéines mutées qui contiennent des néo-antigènes (Ag) tumoraux (TAA [Tumor-Associated Antigen]) qui après présentation dans le complexe majeur d’histocompatibilité, peuvent être reconnus par les effecteurs de l’immunité adaptative : les lymphocytes T CD3+ (T CD4+ et T CD8+) et les lymphocytes B.

Le système immunitaire, lorsqu’il fonctionne correctement, élimine les cellules tumorales en développement (à des phases précoces de leur transformation), empêchant ainsi la poursuite de la tumorigénèse. Les tumeurs ne progressent vers la phase d’équilibre que si l’immunosurveillance échoue ou est altérée. Les cellules

cancéreuses qui ont réussi à persister en équilibre avec leur microenvironnement sont caractérisées par leur capacité à muter et produire de nouvelles populations tumorales (45). Ces populations acquièrent la capacité à supprimer la réponse immune, échappant ainsi au système immunitaire (phase d'échappement) (45). Ces tumeurs sélectionnées pour leur résistance au système immunitaire induisent activement un microenvironnement immunosuppresseur et deviennent cliniquement détectables.

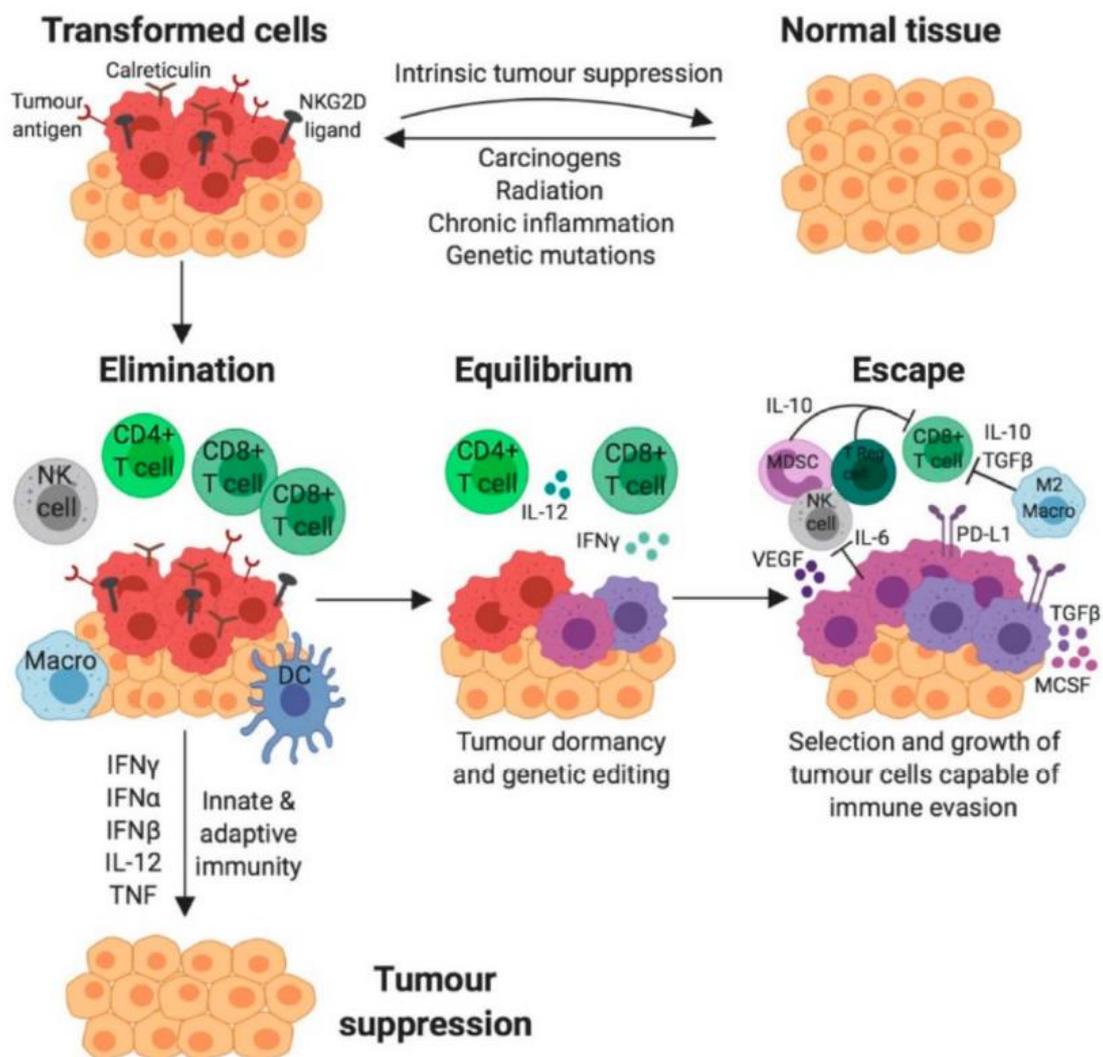


Figure : développement d'une tumeur par échappement au système immunitaire, d'après Towers (46).

#### a. Propriétés des cellules tumorales sur le système immunitaire

Le succès du contrôle tumoral par le système immunitaire dépend en grande partie des cellules tumorales. En effet, leurs caractéristiques vont déterminer leur potentiel intrinsèque à initier une réponse anti-tumorale, leur capacité à établir un microenvironnement tumoral (TME) immunosuppresseur et leur sensibilité aux mécanismes immunitaires visant à les éliminer (47).

La réponse immunitaire adaptative contre les cellules tumorales cible souvent les néo-antigènes tumoraux, qui sont la conséquence de mutations de l'ADN (48). Ainsi, une forte charge mutationnelle prédisant de nombreux néo-antigènes tumoraux est un élément important pour déclencher la réponse immune (49). De même, dans les tumeurs présentant une instabilité des microsatellites (MSI-H) ou des défauts de la réparation des mésappariements (MMR-D) entraînant une accumulation de mutations non-silencieuses, le pronostic du cancer est meilleur (50) probablement en lien avec le contrôle tumoral par le système immunitaire (51). L'altération de la réparation par recombinaison homologue, qui occasionne l'accumulation de mutations, semble par contre moins corrélée à la réponse immunitaire (52,53). Il semble donc que la qualité des néo-antigènes tumoraux (leur dissemblance avec le « moi ») et donc la probabilité d'être reconnue par les cellules T matures semble plus important que la quantité (54). Par ailleurs, les cellules tumorales entraînent une immunosuppression locale et systémique de plusieurs manières. Un des mécanismes les plus étudié et connu est l'expression de molécule de surface (PD-L1 par exemple), qui conduisent les lymphocytes CD8 et les cellules lymphocytaires « natural killers » (NK) à l'exhaustion (55). L'expression du CD73, une protéine de la membrane plasmique qui participe à la conversion de l'AMP extracellulaire en adénosine, semble également impliqué dans l'immunosuppression. En effet, dans le microenvironnement tumoral, l'adénosine supprime l'immunité antitumorale (56).

De plus, il existe une compétition métabolique entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires. Cette compétition métabolique implique le glucose, mais aussi des acides aminés comme la glutamine et l'arginine (57). Les cellules tumorales peuvent également sécréter des cytokines et des métabolites impliqués dans l'immunosuppression comme le l'Il-10, le TGF- $\beta$ 1 ou encore un dérivé métabolique comme le lactate (58–60). A noter cependant que les cytokines immunosuppressives sont principalement produites par les cellules immunitaires et stromales.

Enfin, la sensibilité des cellules tumorales à la réponse immune est essentielle pour le contrôle du cancer. L'altération de la capacité à présenter l'antigène via le MHC semble ainsi être un mécanisme de résistance (61), mais il en existe de nombreux autres comme l'altération de la réponse à l'interféron, la mutation de la caspase 8, la capacité des cellules tumorales à induire une réponse autophagique en présence de cellules lymphocytaires cytotoxiques (47).

### b. Caractéristiques de l'infiltrat immunitaire

Trois aspects de l'infiltrat tumoral sont fondamentaux dans la réponse immune : la composition de cet infiltrat, la localisation et la fonctionnalité des cellules immunitaires (figure 4).

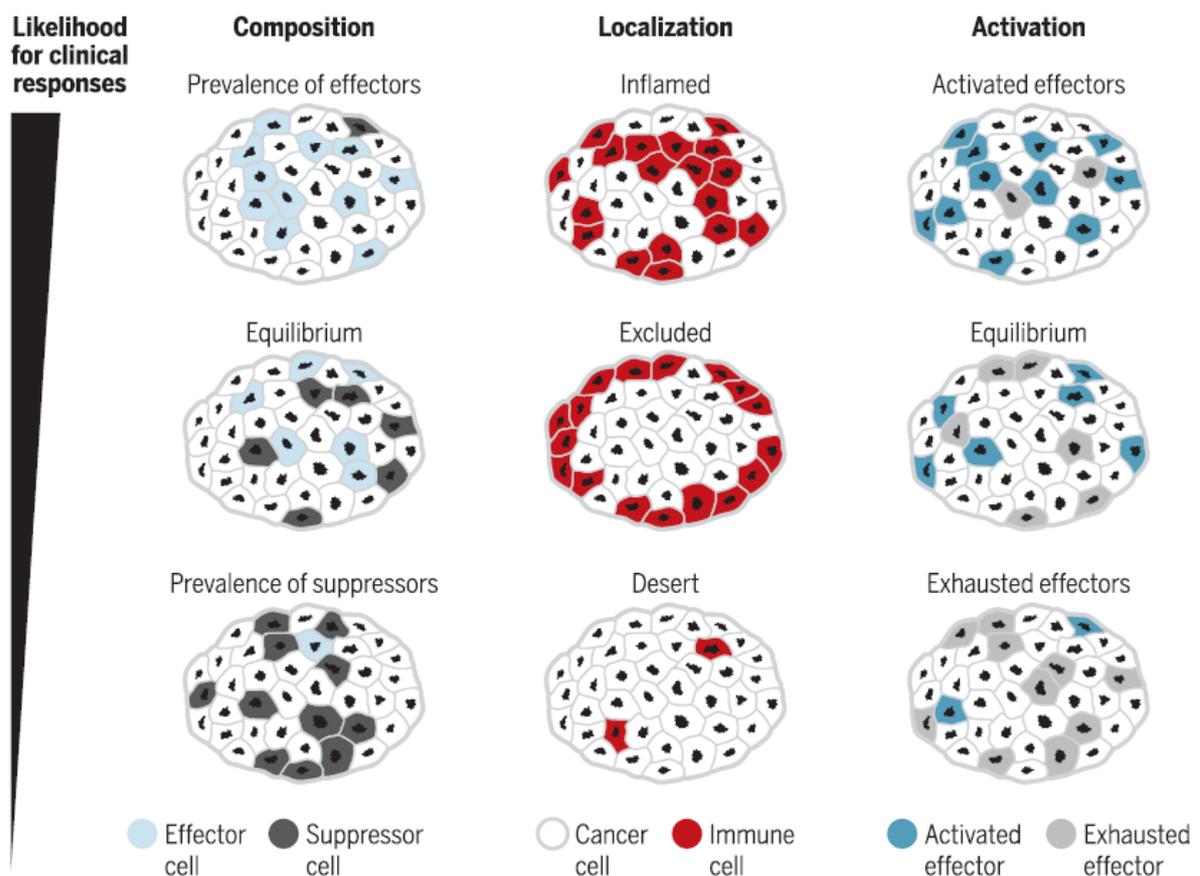


Figure 4 : caractéristiques de l'infiltrat immunitaire et impact sur la réponse clinique, d'après Galluzzi (47)

## 1. Composition de l'infiltrat immunitaire

Les cellules T CD8+ infiltrant les tumeurs, les cellules T helper 1 (TH1) CD4+ et les cellules dendritiques CD103+ sont considérées comme des acteurs majeurs de l'initiation et de l'exécution de la réponse immunitaire adaptative anti-tumorale. Ainsi, des niveaux élevés de ces cellules dans la tumeur sont associés à un meilleur pronostic. À l'inverse, une infiltration tumorale importante par des cellules T régulatrices CD4+CD25+FOXP3+ (Treg) ou des macrophages polarisés M2, qui ont tous deux des effets immunosuppresseurs puissants, est généralement associée à une réponse immune moins efficace et tolérant la présence des cellules tumorales (figure 5) (62).

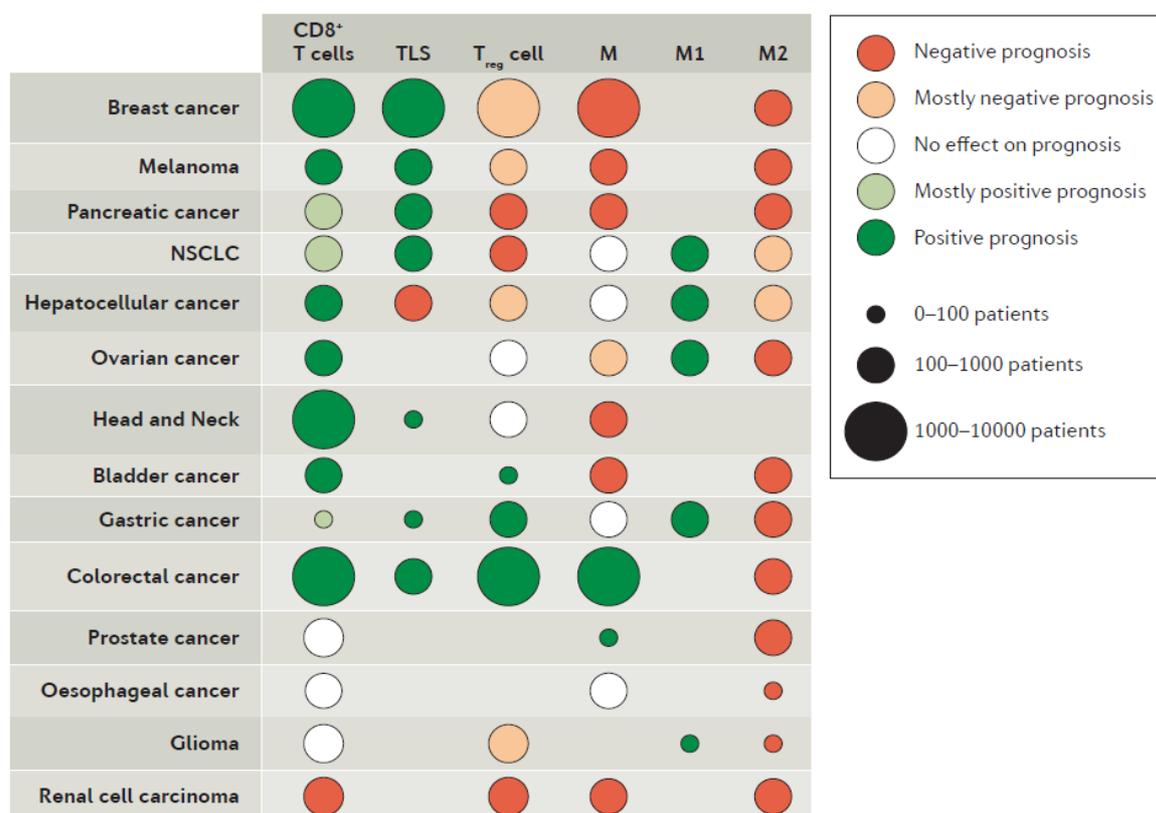


Figure 5 : effet de l'infiltrat immunitaire sur le pronostic des patients atteints de cancer, d'après Fridman (62).

Les lymphocytes NK jouent probablement aussi un rôle important dans la réponse anti-tumorale, mais il est moins bien connu. Ils pourraient notamment recruter les cellules dendritiques pour déclencher l'immunité anti-tumorale adaptative (63).

Le rôle des cellules lymphocytaires B (LB) commence à être mieux compris (figure 6). La présence des LB dans l'infiltrat tumoral est corrélée à un meilleur pronostic dans la majorité des cas (64). Les fonctions immunitaires des LB comprennent la production d'anticorps mais également la production de cytokines, la présentation de l'antigène, la co-stimulation des lymphocytes T et la participation au développement de l'architecture des tissus lymphoïdes. Les cellules B peuvent également jouer des rôles immunosuppresseurs lorsqu'elles sont différenciées en cellules B régulatrices (Breg), régulant négativement la réponse immune. Les LB infiltrant les tumeurs sont aussi impliqués en fabriquant des auto-anticorps spécifiques anti-tumoraux dirigés contre les antigènes associés aux tumeurs (TAA) (65).

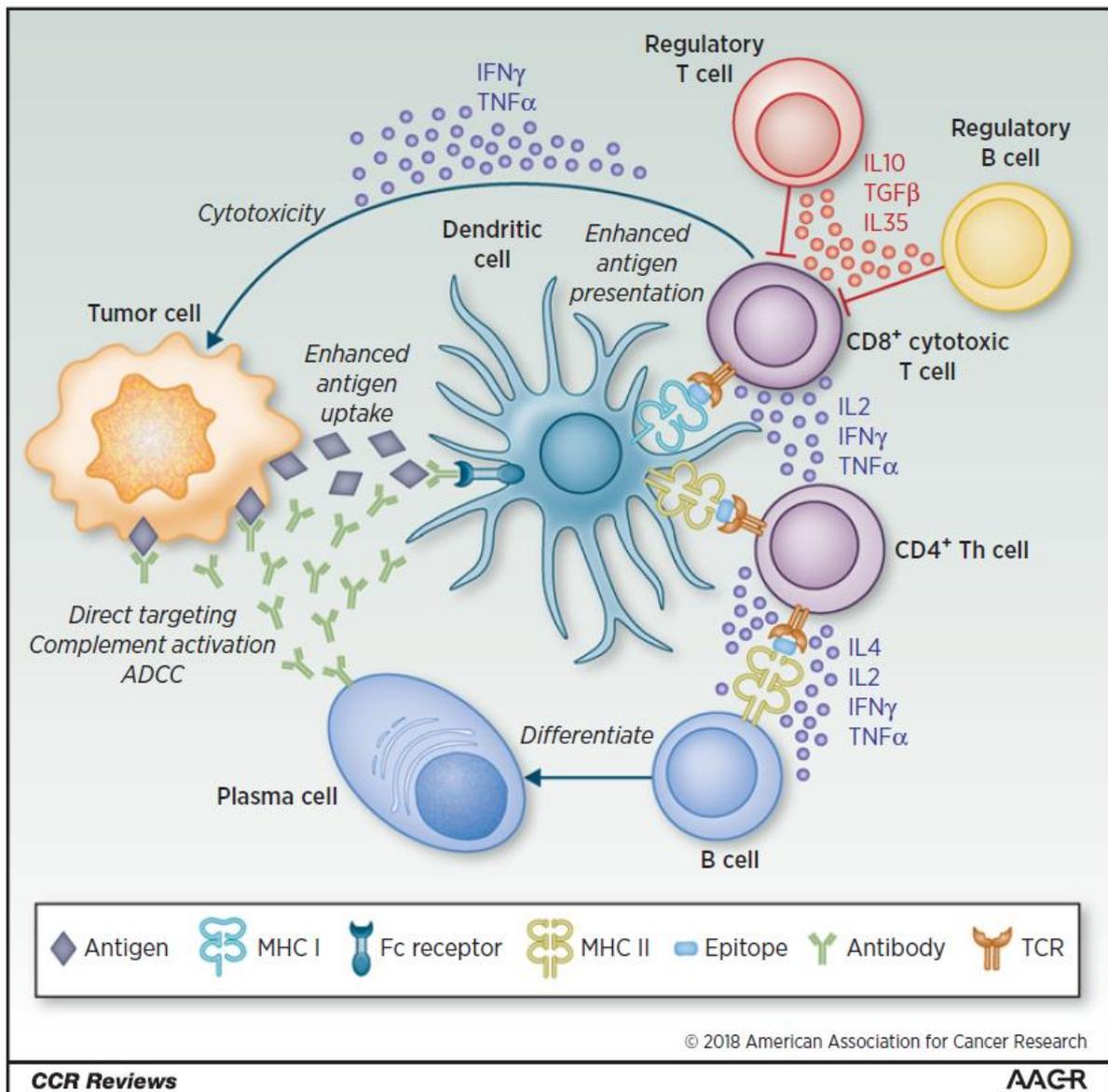


Figure 6. Rôles des cellules B dans l'immunité antitumorale, d'après Wouters (64)

Plus récemment, une analyse immunogénomique approfondie de plus de 10 000 tumeurs comprenant 33 types tumoraux différents collectés dans le cadre du projet TCGA a permis de mettre en évidence plusieurs types de réponses immunitaires. Ainsi, 6 signatures identifiant des sous-types différents ont été caractérisées : C1 (cicatrisation), C2 (lié à l'IFN-g), C3 (inflammatoire), C4 (déplété en lymphocytes), C5 (peu immunologique), et C6 (TGF-β). Ces sous-types sont caractérisés par les différences de signatures pour les macrophages ou les lymphocytes, les rapports cellules Th1 / Th2, l'étendue de l'hétérogénéité intratumorale, l'aneuploïdie, l'importance de la charge en néo-antigènes, la prolifération cellulaire, l'expression de

gènes modulant l'immunité. Ces sous-types sont associés à des pronostics différents, à la génétique des tumeurs et aux altérations modulant le système immunitaire (66).

## 2. Localisation de l'infiltrat immunitaire

Le microenvironnement tumoral est organisé dans l'espace, avec des lymphocytes T et des macrophages situés à la fois au centre et aux marges invasives (67). D'autres composants du système immunitaire cellulaire, tels que les cellules NK, les cellules suppressives d'origine myéloïde (MDSC), les mastocytes et les neutrophiles sont principalement situés au niveau de la marge d'invasion tumorale. Les lymphocytes B et les cellules dendritiques matures peuplent de préférence les îlots lymphoïdes adjacents à la tumeur appelés structures lymphoïdes tertiaire (TLS) (68). La localisation de ces cellules dans le microenvironnement est guidée par les vaisseaux vasculaires et lymphatiques, ainsi que par le support stromal fibroblastique et dépend probablement en partie de la capacité à réaliser une néoangiogénèse.

En plus de l'importance quantitative de l'infiltrat immunitaire, sa localisation semble déterminante dans le contrôle antitumoral. Ainsi, le phénotype dit d'exclusion immunitaire, dans lequel des taux élevés de lymphocytes T et d'autres cellules immunitaires s'accumulent à la marge de la tumeur mais ne peuvent pas envahir les nids de cellules malignes, est généralement lié à un mauvais pronostic de la maladie. Au contraire, le phénotype dit inflammatoire ou « chaud » dans lequel les cellules immunitaires intratumorales sont abondantes et entrent en apposition directe avec les cellules néoplasiques est associé à un meilleur pronostic (69). De même, le phénotype dit de désert immunitaire ou « froid », caractérisé par une pénurie globale de cellules T, est associé à un faible contrôle immunitaire de la tumeur (69).

Les structures lymphoïdes tertiaires (TLS) sont fréquemment retrouvées dans les tumeurs (62). Les TLS comprennent une zone de lymphocytes T avec des cellules dendritiques matures et une zone folliculaire dans laquelle les lymphocytes B prolifèrent et se différencient activement dans des structures mimant les centres germinatifs. La présence de fortes densités de TLS est associée à un pronostic favorable pour la plupart des localisations tumorales. Il semble que les TLS fonctionnent comme des sites d'initiation et de maintien des réponses locales et systémiques des lymphocytes T et B (70). Comme dans les organes lymphoïdes

secondaires, les TLS contiennent des lymphocytes B en prolifération qui expriment l'enzyme activation-induced deaminase (AID), qui joue un rôle central dans les processus de recombinaison de commutation de classe (CSR) et d'hypermutation somatique (SHM) qui conduisent finalement à la production d'anticorps de haute affinité, autres que les IgM (71).

### 3. Fonctionnalité de l'infiltrat immunitaire

Les interactions dynamiques entre les cellules tumorales et leur microenvironnement modifient la réponse immunitaire. La progression du cancer est associée à une expression accrue des marqueurs de l'épuisement des cellules T CD8 + infiltrant, dont beaucoup sont des protéines de point de contrôle immunitaire qui régulent l'expansion des cellules T (telles que PD-1, TIM-3, CTLA-4, LAG -3 et BTLA) (72). Deux de ces points de contrôle, CTLA-4 et PD-1, peuvent être ciblés pour réactiver la réponse immune antitumorale et entraîner une régression du cancer. CTLA-4 est un régulateur négatif des lymphocytes T qui agit en entrant en compétition avec le co-stimulateur de la réponse T, CD28 pour la fixation à CD80 et CD86. Le récepteur de surface cellulaire PD-1 est exprimé par les cellules T lors de leur activation et de leur expansion et se lie à l'un des deux ligands, PD-L1 et PD-L2. De nombreux types de cellules peuvent exprimer PD-L1, y compris les cellules tumorales et les cellules immunitaires alors que PD-L2 est exprimé principalement sur les cellules dendritiques dans les tissus normaux. La liaison de PD-L1 ou PD-L2 à PD-1 génère un signal inhibiteur qui atténue l'activité des cellules T. L'axe PD-L1 / PD-1 s'est avéré être une importante boucle de rétro-contrôle négative qui assure l'homéostasie immunitaire. C'est aussi un axe important pour restreindre l'immunité tumorale (69). L'axe PD-L1 / PD-1 n'est pas le seul impliqué dans la limitation de la réponse immunitaire. Il existe d'autres régulateurs négatifs. Les propriétés intrinsèques tumorales (sécrétion de cytokines, composition génétique) et des facteurs extrinsèques (microbiote intestinal, présence d'une infection, ...) se combinent pour contrôler l'équilibre entre les facteurs qui favorisent ou suppriment l'immunité anticancéreuse.

Dans les études qui évaluaient à la fois les cellules B et les cellules T, les effets pronostiques des deux sous-ensembles de lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL)

étaient largement concordants (64). De plus, l'effet pronostique de TIL CD3 + et / ou CD8 + était généralement plus élevé lorsque des TIL-B étaient présents. Ces résultats sont en accord avec des études ayant évalué la valeur pronostique des TLS, structures similaires aux centres germinatifs des ganglions lymphatiques qui contiennent des cellules dendritiques, des lymphocytes T et B, qui sont associées à de fortes réponses TIL (73). Ces études suggèrent que les cellules de la lignée B collaborent avec les cellules T pour promouvoir l'immunité antitumorale (64).

### c. Impact du stroma et de la vascularisation sur la réponse immune

Le rôle du stroma et du système vasculaire dans la réponse immunitaire antitumorale est moins bien établi que celui de l'infiltrat immunitaire. Toutefois, des données suggèrent que ces deux composants non-tumoraux du microenvironnement peuvent avoir un impact considérable sur le contrôle des cancers. En effet, un infiltrat contenant une forte densité de fibroblastes et de cellules endothéliales (angiogenèse) est corrélé à un mauvais pronostic (74).

### **Le stroma tumoral**

Pour certaines tumeurs solides, il est observé une réaction stromale importante caractérisée par une abondance de fibroblastes associés au cancer (CAF) et un dépôt de matrice extracellulaire (MEC) avec de la fibrose. Cette réaction est appelée stroma desmoplastique (75). Le stroma desmoplastique est généralement considéré comme un obstacle à l'éradication tumorale, que ce soit par le système immunitaire, mais aussi par la chimiothérapie et les agents anticancéreux ciblés (76). Le ciblage thérapeutique du stroma desmoplastique semble restaurer le contrôle antitumoral, notamment immunitaire (77). Un des mécanismes importants pour l'acquisition d'un stroma desmoplastique semble passer par la voie TGF- $\beta$ . En effet, les CAF sont une source importante de TGF- $\beta$ 1 (78). Le TGF- $\beta$  favorise l'établissement du stroma desmoplastique en contribuant à la séquestration des cellules immunitaires dans les zones stromales de la tumeur, riches en CAF et en collagène (79). Les CAF ont également des effets immunosuppresseurs en libérant des métalloprotéases (80). En outre, les CAF peuvent favoriser l'infiltration de la tumeur par des cellules myéloïdes immatures (81) et supprimer les cellules T CD8+ du microenvironnement tumoral (82).

Ce dernier mécanisme semble impliquer la capacité des CAF à acquérir des antigènes dérivés de tumeurs et à les présenter aux cellules T CD8+ pour éliminer ces dernières cellules par un mécanisme dépendant de PD-L2 et du ligand CD95L (82).

### **La vascularisation tumorale**

Par rapport à la vascularisation normale, la vascularisation tumorale est désorganisée, présente une couverture en péricyte limitée et est caractérisée par des jonctions cellulaires interendothéliales lâches (83). Il en résulte non seulement une altération du flux microcirculatoire et une hypoxie conséquente, mais aussi une augmentation de la pression interstitielle, qui constitue une barrière physique à l'infiltration par les cellules immunitaires (83). De plus, les cellules endothéliales des néovaisseaux tumoraux expriment le FASL (84), ce qui a été associé à une diminution de l'infiltrat T CD8+ (qui expriment des niveaux élevés de FAS) et à l'accumulation de cellules Treg FOXP3+ (qui expriment des niveaux de FAS comparativement plus faibles) (85). Dans ce contexte, il a été démontré que les cellules endothéliales expriment le FASL en aval de voies de signalisation prostaglandine E2 (PGE2) et VEGFA, qui entraînent une immunosuppression dépendante de Treg (86). Ainsi, l'inhibition de la (PGE2) ou du VEGFA s'accompagne de la restauration de l'infiltrat T CD8+ dans les lésions malignes (85). De même, l'augmentation de la perméabilité du système vasculaire de la tumeur aux cellules immunitaires par l'inhibition de la cadhérine 5 (CDH5) dans les cellules endothéliales améliore le recrutement des lymphocytes T CD8+ (87). Ainsi, le statut immunologique du microenvironnement tumoral est fortement influencé par le système vasculaire (figure 7).

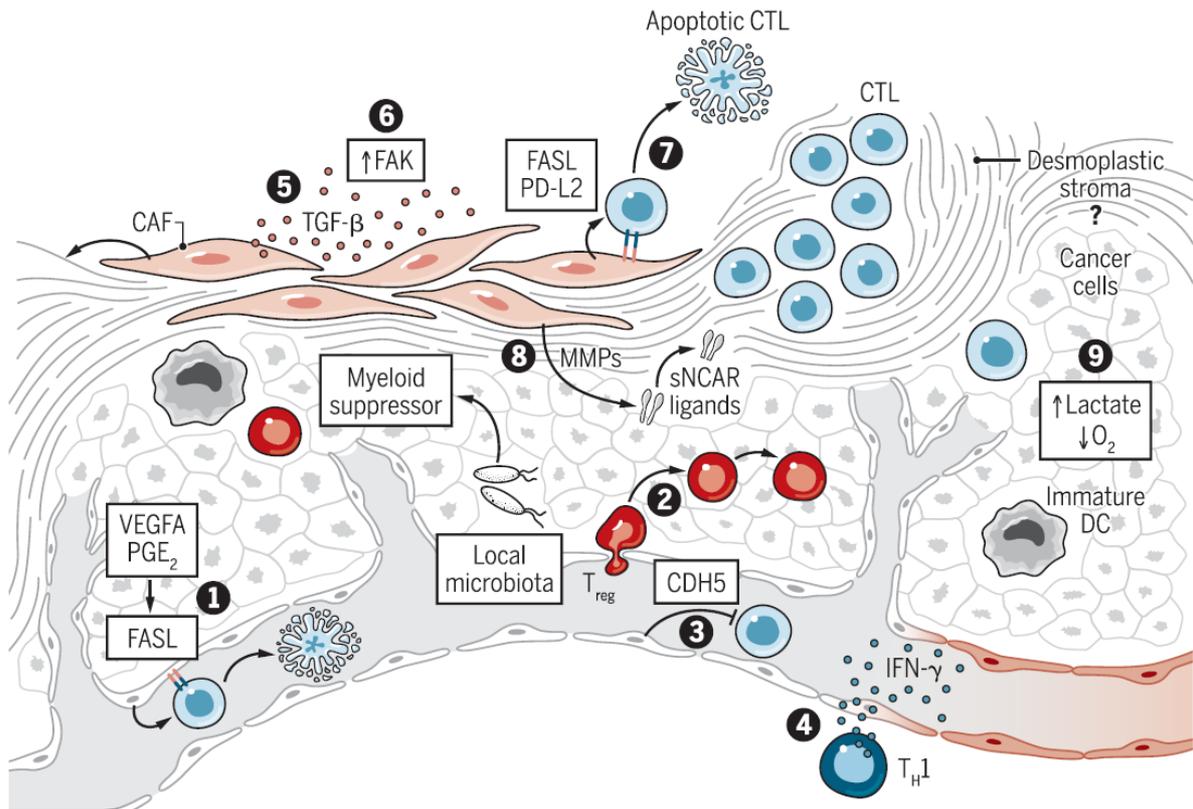


Figure 7: rôle du stroma et du système vasculaire dans la régulation de l'environnement immunitaire, d'après Galluzi (47)

## 1.2.2. Système immunitaire et cancers du sein triple négatifs

### a. Caractéristiques de la réponse immune

Dans les CSTN, de nombreuses données indiquent que l'évolution de la maladie dépend de l'interaction entre les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires. Ces cellules, en particulier les lymphocytes T cytotoxiques, ont été au centre de l'attention en raison de l'essor des traitements permettant le blocage des points de contrôle immunitaires, améliorant ainsi leur potentiel de destruction des cellules cancéreuses. [7-9]. Dans le CSTN, la réponse immunitaire anticancéreuse endogène est corrélée au niveau de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL). Cet indicateur présente une forte valeur pronostique indépendante et il est maintenant recommandé d'évaluer et quantifier le niveau d'infiltration de TIL dans les CSTN à un stade précoce (88,89). Cependant, pour l'instant, l'utilisation des TIL en tant qu'outil pour guider les choix de

traitement systémique n'est pas recommandée (88). Le niveau de TIL après chimiothérapie néoadjuvante chez des patientes atteintes d'un CSTN présentant un résidu tumoral au moment de la chirurgie s'avère aussi un indicateur pronostic important, qui pourrait permettre de stratifier le pronostic de ces patientes.

### **Immunité adaptative**

- Impact des TIL et de leur localisation spatiale.

Dans les CSTN, un nombre élevé de TIL CD8+ et CD4+, est associé à un pronostic favorable (12,90). Il a été récemment identifié 4 sous-types distincts de microenvironnement tumoral (TME) dans les CSTN, en intégrant les signatures d'expression génique aux schémas spatiaux de localisation des cellules T CD8+ (91)

:

- Désert immunologique (« immune-desert », ID)
- Restreint à la marge (« margin-restricted », MR)
- Restreint au stroma (« stroma-restricted », SR)
- Inflammatoire (« fully inflamed », FI).

Les tumeurs MR et ID sont caractérisées par une faible infiltration de CD8+, la première montrant une accumulation de CD8+ mais uniquement sur les marges d'invasion tumorales ; en revanche, les tumeurs FI et SR sont caractérisées par une abondance de cellules T CD8+, les tumeurs SR montrant une infiltration de CD8+ limitée au stroma, et FI montrant une infiltration de cellules T CD8+ dans les compartiments stromaux et épithéliaux. Les signatures définissant les quatre sous-types de TME dans les CSTN se sont avérées pronostiques dans une cohorte de validation indépendante. Ainsi, les patientes ayant une faible infiltration de cellules T CD8+ (sous-type soit MR, soit ID) présentaient le plus mauvais pronostic, tandis que celles ayant une abondance de cellules T CD8+ (sous-type FI et SR), avaient le pronostic le plus favorable.

La population prédominante au sein des TIL est constituée de cellules T CD3+ [12]. Un taux plus élevé de CD3+ était associées à une diminution du rapport CD4/CD8, ainsi qu'à un niveau accru de cellules T CD8+CD103+ présentant des caractéristiques de lymphocyte T mémoire résidant dans les tissus (T tissue-resident memory, TRM).

Il a d'ailleurs été montré que la présence d'une signature TRM en RNA-seq est corrélée à un meilleur pronostic que l'expression CD3, CD8 ou CD103 prises indépendamment. Les TRM sont caractérisés par une activité cytotoxique (via le granzyme B (GZMB) notamment) et une capacité d'élimination des cellules tumorales élevées (92,93). Les TRM pourraient ainsi être l'un des médiateurs clés de l'immunosurveillance antitumorale, et représenter le déterminant crucial du rôle pronostique positif des niveaux élevés de TIL chez les patients atteints de CSTN.

L'obtention d'une réponse complète histologique (pCR) après chimiothérapie néoadjuvante (anthracycline+/taxane) est corrélée à un nombre élevé de TIL CD3+ (94), de CD8+ (94), de CD4+ (95) et à un niveau élevé du rapport CD8/FOXP3 (95). Lorsqu'il persiste de la maladie résiduelle après chimiothérapie néoadjuvante, le rapport CD8/FOXP3 semble aussi pertinent pour identifier les patients présentant un risque plus faible de rechute et/ou de décès. Ainsi, son utilisation en cas de maladie résiduelle post chimiothérapie permettrait de mieux stratifier le pronostic des patientes atteintes de CSTN (96).

Enfin, le nombre de TIL du stroma, le niveau de CD8 et de FOXP3 semblent fortement corrélés entre eux. Cette observation conforte la notion que la quantification globale des TILs reflète l'état d'activation du système immunitaire (97).

- Lymphocytes B

Le nombre de lymphocytes B (LB) est corrélé au niveau de TILs. La présence de LB (CD20+) est associée avec des taux de pCR plus importants après chimiothérapie néoadjuvante (98,99). Il a également été montré que le nombre de LB est un facteur de bon pronostic indépendant dans les CSTN (100).

- Cellules dendritiques

Ce domaine reste encore peu étudié. La présence de cellules dendritiques matures est associée à un bon pronostic, notamment chez les patientes atteintes d'un CSTN localisé présentant une atteinte ganglionnaire (101).

## **Immunité innée**

La plupart des études sur le TME du CSTN n'ont pas caractérisé de manière précise les cellules myéloïdes, malgré leur présence importante dans le tissu et leurs capacités de suppression immunitaire. Une plus grande vulnérabilité des cellules myéloïdes par rapport aux cellules lymphoïdes lors de la préparation des échantillons, entraînant une sous-représentation de ce type de cellules dans la plupart des études, pourrait être une des explications de ce manque d'analyse (102). Il semble que les cellules myéloïdes présentent également une organisation spatiale, comme les cellules lymphoïdes (91).

- Macrophages associés à la tumeur (« Tumor-Associated Macrophages », TAMs)

Les TAMs ont été associés à un mauvais pronostic dans les CSTN (103). Ces résultats restent cependant débattus, car d'autres études n'ont pas retrouvé de lien entre TAM et pronostic (104,105). Les TAMs représentent une population de cellules immunitaires très hétérogène, elles peuvent être communément dichotomisées en deux phénotypes polarisés, M1 et M2, le premier étant traditionnellement associé à des effets antitumoraux, et le second présentant typiquement des caractéristiques protumorigènes. En ce qui concerne les TAM polarisés M2, des résultats semblent confirmer leur rôle pronostique négatif dans les CSTN (106). Les tumeurs inflammatoires FI présentent une augmentation des macrophages pro-inflammatoires par rapport aux tumeurs inflammatoires SR (91).

- Cellules myéloïdes granulocytaires

La présence de neutrophiles et d'éosinophiles a été retrouvée par les études single-cell dans les CSTN (107,108). Leur fonction reste encore largement inconnue. De manière intéressante, l'analyse de l'expression génique et en immunofluorescence a permis de détecter un enrichissement en cellules productrices d'IL-17 et en neutrophiles dans les CSTN inflammatoire SR (91).

- Cellules NK

Les cellules NK représentent un médiateur crucial de l'immunosurveillance et de l'élimination des cellules tumorales. Cependant, leur rôle dans l'influence du pronostic et/ou de la réponse au traitement du CSTN n'a été que peu étudié. Leur activation

semble nécessaire cependant à la bonne fonction du système immunitaire. En effet, une étude utilisant des analyses in silico avec la méthode CIBERSORT a montré qu'une fraction plus élevée de cellules NK au repos chez des patientes atteintes d'un cancer du sein CSTN était associée à une détérioration de la survie sans maladie et de la survie globale (105).

#### b. Stratégie thérapeutique ciblant le système immunitaire

##### **Axe PD1/PDL1**

Dans un premier temps, les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (Immune Check-Point Inhibitors, ICIs) ont été évalués en monothérapie dans les CSTN métastatiques. Des taux de réponses relativement modestes ont été observés dans la population non sélectionnée, avec une efficacité plus notable chez les patientes n'ayant jamais reçu de traitement et chez celles dont les tumeurs contenaient un nombre élevé de TIL et/ou une expression de PD-L1. Par la suite, plusieurs études ont rapporté les résultats de l'association de la chimiothérapie et de l'immunothérapie dans le traitement du CSTN au stade métastatique et au stade localisé.

- **Stade métastatique**

L'essai IMpassion130 a évalué le nab-paclitaxel associé à l'atezolizumab ou à un placebo chez des patients atteints d'un cancer du sein en 1<sup>ère</sup> ligne métastatique. Les co-critères d'évaluation primaires étaient la survie sans progression (SSP) et la survie globale (SG) dans la population en intention de traiter (ITT) ainsi que dans le sous-groupe PD-L1 positif, si les résultats de la population ITT s'avéraient statistiquement significatifs. L'essai est positif pour la SSP dans la population ITT : 7,2 mois contre 5,5 mois [hazard ratio (HR) 0,80 ; intervalle de confiance à 95% (CI) 0,69-0,92] et dans la population PD-L1 positive : 7,5 mois contre 5,0 mois (HR 0,62 ; 95% CI 0,49-0,78). Un bénéfice cliniquement significatif de la SG a été suggéré pour les patients avec des tumeurs PD-L1 positives recevant de l'atezolizumab : 25,0 contre 18,0 mois (HR 0,71 ; 95% CI 0,54-0,94). Sur la base de ces résultats, l'association nab-paclitaxel et atezolizumab a été approuvée en première ligne pour les CSTN métastatiques surexprimant PD-L1. Les résultats finaux de la SG après 3 ans de suivi ont également

mis en évidence un bénéfice, limité aux patients présentant une maladie PD-L1 positive (109).

L'essai de phase III Keynote355 a quant à lui évalué l'efficacité du pembrolizumab par rapport au placebo en association avec différentes chimiothérapies (paclitaxel, nabpaclitaxel, ou gemcitabine plus carboplatine). L'ajout du pembrolizumab à la chimiothérapie de 1<sup>ère</sup> ligne permet également une amélioration significative de la SSP, uniquement pour les patientes PDL-1 positive (110).

En revanche, l'essai de phase III IMpassion131 évaluant l'atezolizumab en association avec le paclitaxel, n'a pas montré un bénéfice en termes de SSP dans le traitement de première ligne du CSTN métastatique, indépendamment de l'expression de PD-L1. D'autres analyses sont en cours pour mieux comprendre ces résultats négatifs.

Globalement, l'approche ciblant la voie PD1/PD-L1 offre donc une amélioration relativement modeste. Il semble qu'une faible minorité de patientes bénéficie de cette approche, même dans une population sélectionnée sur un biomarqueur (PD-L1) dont sa valeur prédictive reste limitée. En France, l'accès à un traitement ciblant la voie PD1/PDL1 n'est actuellement pas possible, les autorités de santé ayant jugé que le rapport cout/bénéfice/toxicité n'était pas suffisant pour rembourser la prise en charge de cette approche thérapeutique.

- Stade précoce.

L'essai KEYNOTE-522 a évalué une chimiothérapie néoadjuvante à base de platine associée au pembrolizumab chez des patientes atteintes de CSTN à un stade localisé (111). Les patientes recevaient une chimiothérapie séquentielle associant paclitaxel et carboplatine au pembrolizumab ou à un placebo, suivi d'anthracyclines. Une chirurgie était ensuite proposée, avec la poursuite en adjuvant du pembrolizumab ou du placebo.<sup>38</sup> Un avantage significatif a été démontré avec le pembrolizumab sur l'obtention d'une pCR, critère principal avec 64,8% contre 51,2% ;  $P < 0,001$ . L'avantage en termes de pCR était indépendant du statut PD-L1 et le bénéfice était plus important pour les patientes avec une atteinte ganglionnaire positive : 20,6 % contre 6,3 % (111). Après 18 mois de suivi, une tendance pour une survie sans

événement supérieure dans le groupe pembrolizumab a également été observée : 91,3 % contre 85,3 % ; HR: 0,63; 95% CI 0.43-0.93).

L'essai IMpassion031, évaluant l'atezolizumab en association avec la chimiothérapie dans le cadre d'une thérapie néoadjuvante (nab-paclitaxel, suivi de doxorubicine et de cyclophosphamide) est également positif sur le critère d'évaluation principal, avec une amélioration statistiquement significative de la pCR dans le groupe atezolizumab par rapport au placebo (58 % contre 41 % ; P = 0,004), indépendamment de l'expression de PD-L1 (112). Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'immunothérapie ciblant le microenvironnement tumoral semble plus efficace à un stade localisé.

### **Autres approches utilisant la réponse immunitaire à visée antitumorale**

D'autres approches sont en cours de développement. Il est possible de citer par exemple le développement d'anticorps bispécifiques, ciblant à la fois un antigène tumoral et induisant l'activation des cellules T, leur localisation au niveau de la tumeur et leur prolifération polyclonale par une interaction simultanée avec le CD3 des cellules T. Le développement de lymphocytes T présentant un récepteur chimérique aux antigènes tumoraux (Chimeric Antigen Receptor-T, CAR-T ) est une autre approche intéressante pour engager le système immunitaire de manière artificielle dans la réponse antitumorale et des premiers essais cliniques de phase I ont été réalisés pour évaluer la faisabilité de cette approche dans les CSTN. Enfin, la modulation d'autres points de contrôle du système immunitaire avec des anticorps spécifiques ciblant TIM-3 (T cell immunoglobulin and mucin domain containing protein 3), LAG-3 (lymphocyte-activation protein 3), et TIGIT (T cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains protein). Il est possible que ces approches puissent avoir seules une activité limitée : leur utilisation en combinaison pourrait s'avérer nécessaire pour obtenir le contrôle tumoral.

### **Conclusion**

Le système immunitaire joue un rôle très important dans les CSTN, dès la phase précoce de la maladie, pour contrôler l'évolution de la maladie. Cependant, contrairement à d'autres pathologies tumorales, le ciblage PD1/PD-L1 présente une activité relativement décevante, avec une minorité de patientes semblant bénéficier de cette approche et pour l'instant sans biomarqueur spécifique permettant de

sélectionner celles pour lesquelles ce traitement devrait être proposé. L'amélioration de la compréhension globale est nécessaire pour renforcer l'efficacité des traitements modulant la réponse immunitaire.

### 1.2.3. Système immunitaire et cancers de l'ovaire séreux de haut grade

#### a. Caractéristiques de la réponse immune

La plupart des études ayant évalué l'impact du système immunitaire ne distingue pas les données selon les sous-types histologiques. Il semble cependant que la plupart des données retrouvées dans les CEO s'appliquent au cancer séreux de haut grade de l'ovaire (113) qui représente la majorité de CEO.

- Impact des TIL

Il a été montré en 2004 que la présence de lymphocytes T CD3+ était corrélée à une meilleure survie globale (114). Le bénéfice semble principalement lié au TIL CD8+ et la localisation de ces cellules au sein de la tumeur (intraépithéliale) semble importante, car les patientes présentant un nombre élevé de cellules T CD8+ intraépithéliales, par opposition à celles dont les TIL se trouvent principalement dans le stroma, ont un pronostic favorable, ce qui suggère que les TIL CD8 en contact direct avec les cellules tumorales sont importantes pour la médiation de la réponse immunitaire antitumorale (115). Une méta-analyse de dix études portant sur 1815 patientes atteintes de cancer de l'ovaire a confirmé la valeur pronostique des TIL CD8+ intraépithéliaux dans les spécimens de CEO, indépendamment du grade de la tumeur, du stade ou du sous-type histologique étudié (116). Ces données ont été confirmées spécifiquement pour CEO de haut grade séreux (117).

- Lymphocytes T régulateurs

La présence de lymphocytes T régulateurs FOXP3 positifs est plutôt associée à un mauvais pronostic, mais il semble surtout qu'il s'agisse du ratio CD8+/FOXP3+ qui soit important (115).

- Lymphocytes B

Des lymphocytes B stromaux ou intra-épithéliaux sont retrouvés dans les cancers de l'ovaire (118). Ils semblent associés à un bon pronostic. La présence de cellules B et de TIL CD8+ est corrélée à une augmentation de la survie des patients par rapport aux TIL CD8+ seuls (119). Ces données ont été retrouvées dans les CEO séreux de haut grade pour lesquels il a été rapporté que la présence de LB à dans les sites métastatiques est associée à un bon pronostic (120). Très récemment, ces données ont été confirmées dans une cohorte de 534 patientes atteintes de CEO de haut grade, pour lesquelles les infiltrats de LB étaient corrélés à la survie globale. De plus, il semble que la valeur pronostique positive des TILs intra-épithéliales ne soit retrouvée que lorsque les cellules B co-infiltrant les îlots tumoraux (121). La production d'IgA par les LB semble contribuer à contrecarrer la progression tumorale à la fois par la reconnaissance des antigènes tumoraux et par la transcytose non spécifique à travers les cellules tumorales qui augmente la destruction cytotoxique médiée par les cellules T (121).

- Lymphocytes NK

Leur rôle reste mal connu, avec des résultats contradictoires de leur présence sur la survie des patientes. Certaines études retrouvent ainsi un rôle positif, notamment dans les CEO séreux de haut grade (122) alors que pour d'autres, une infiltration par les lymphocytes NK pourrait être péjorative (123).

- Macrophages (TAM) et cellules myéloïdes (MDSC)

Les TAM et les MDSC constituent jusqu'à 20 % du microenvironnement tumoral des CEO et jouent un rôle important pour maintenir et promouvoir une réponse immunosuppressive (124). Les TAMs sont considérées comme les cellules immunitaires infiltrantes les plus abondantes dans les tissus et les ascites des CEO (125,126). Elles possèdent un phénotype M2 immunosuppresseur et leur présence est corrélée à la progression de la tumeur [140,167]. Par ailleurs, les CEO sont capables d'induire un phénotype M2 (127). Un ratio de TAM M1/M2 plus élevé dans les tumeurs a été associé à une meilleure survie globale (128). Les MDSC jouent un rôle négatif

important dans la promotion tumorale, notamment en contribuant à augmenter le nombre de cellules souches tumorales (129).

#### b. Stratégie thérapeutique ciblant le système immunitaire

##### **Chimiothérapie**

Dans les CEO, notamment séreux de haut grade, la chimiothérapie repose sur une association carboplatine et paclitaxel. Ces traitements peuvent modifier le microenvironnement immunitaire par exemple en induisant une mort cellulaire immunogène (130) ou en altérant les cellules supprimant la réponse immunitaire (131). La lyse cellulaire tumorale induite par la chimiothérapie conduit au relargage d'antigènes tumoraux qui sont ensuite traités par des cellules dendritiques ou d'autres cellules présentatrices des antigènes.

Dans les modèles murins, il a été montré que le paclitaxel induit l'activation des cellules dendritiques, des lymphocytes NK et des lymphocytes T cytotoxiques (132). De plus, les taxanes diminuent les lymphocytes FOXP3 régulateurs et les MDSC tout en polarisant les macrophages vers un phénotype M1 (133–135). Par ailleurs, l'association carboplatine et paclitaxel semble être synergique pour augmenter la cytotoxicité des lymphocytes T CD8+.

En clinique, il a été démontré que la chimiothérapie a un impact sur l'environnement immunitaire tumoral par des études ayant analysé les tumeurs avant et après chimiothérapie. Ainsi, la chimiothérapie augmente l'infiltrat des TIL et l'expression des PDL1 (136), mais également modifie l'équilibre entre les lymphocytes T régulateurs et les macrophages en faveur d'un meilleur contrôle immunitaire (137). Il a d'ailleurs été montré que l'équilibre immunitaire en faveur de la réponse antitumorale après chimiothérapie est un facteur pronostic. Ces données montrent que la chimiothérapie, au-delà de son effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses, a également un impact en modifiant la réponse antitumorale du système immunitaire.

##### **Immunothérapie**

- Inhibiteurs de check-point immunitaire

Les premiers essais avec les anticorps anti-PD1/PDL1 ont été réalisés chez des patientes atteintes de cancer de l'ovaire en rechute. Les résultats ont été assez décevant, avec des taux de réponse relativement faible autour de 10% (138–140). L'essai KEYNOTE-100, ayant inclus 376 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire en rechute qui avaient reçu en 2ème ligne ou au-delà un traitement par pembrolizumab, rapporte un taux de RO de 8,5 % (critère principal). Les médianes de SSP et de SG étaient de 2,1 mois et de 18 mois respectivement avec un taux de SG à 1 an de 66 %. L'expression de PDL1 a une très faible valeur pour prédire l'efficacité du traitement et il n'a pas été retrouvé d'autres facteurs permettant de prédire l'efficacité d'un traitement ciblant PD1/PDL1 (141). Les données des essais de phase III ont confirmé l'absence d'efficacité chez des patientes en rechute résistantes aux sels de platine (142) . En première ligne de traitement, les résultats sont également décevant : un essai de phase III menée en double aveugle contre placebo a recherché si l'ajout d'un inhibiteur de PD-L1, l'atézolizumab, pouvait améliorer l'efficacité de l'association chimiothérapie (sel de platine-taxane) - bévacizumab, mais les résultats sont négatifs (143). Là encore, il n'a pas été identifié pour le moment de biomarqueurs permettant de prédire le bénéfice d'une immunothérapie ciblant PD1/PDL1.

A noter que les pistes actuellement étudiées pour améliorer ces résultats se dirigent vers des associations entre immunothérapie, notamment anti-PD1 et anti-CTLA-4. Une étude multicentrique de phase II, NRG GY003, a comparé chez 100 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire en rechute, après 1 à 3 lignes de traitement antérieur et un intervalle libre sans sel de platine inférieur à 12 mois, les effets de l'association nivolumab (anti-PD1) plus ipilimumab (anti-CTLA-4) au nivolumab seul. L'association présente une efficacité significativement supérieure à une monothérapie anti-PD1 (144). Cependant, ces données doivent être confirmées dans un essai de phase III.

- Thérapie cellulaire adoptive.

Des traitements par thérapie cellulaires adoptives avec injections de TILs ont été étudiés dans le cadre d'essais clinique. Cependant, il n'a pas été observé d'effets antitumoral significatifs (145). Les traitements par CAR-T n'ont pas encore été évalués chez les patientes. En plus des cibles classiquement exprimés par les tumeurs (NY-ESO-1 et autres antigènes associés aux cancers testiculaires), des cibles spécifiques ont été identifiées car fréquemment exprimées par les cellules tumorales des CEO. Il

est possible notamment de citer MUC16, TAG72, la mésothéline, le récepteur  $\alpha$  aux folates qui pourraient servir de cibles (146).

- Vaccins

Des stratégies vaccinales thérapeutiques ont été étudiées dans les CEO, avec pour but d'induire une immunité à médiation cellulaire dans laquelle les cellules immunitaires sont activées pour reconnaître et détruire leurs cibles cellulaires dans les tissus affectés. Plusieurs approches ont été proposées pour les vaccins thérapeutiques anticancéreux :

- Vaccins à base de cellules tumorales entières, basés sur l'administration de lysats de cellules cancéreuses
- Vaccins à base de peptides, basés sur l'administration directe de protéines recombinantes ou d'épitopes dérivés de TAA en combinaison avec des adjuvants immunologiques
- Vaccins à base de cellules dendritiques (DC), le plus souvent basés sur l'isolement de DC dérivées de patients, maturées ex vivo en présence de TAA puis réinjectées aux patients ;
- Vaccins à base d'ARN, basés sur l'administration directe de molécules d'ARN extraites de cellules malignes ou codant spécifiquement pour un seul TAA
- Vaccins à base d'ADN, basés sur l'administration de plasmides nus ou de plasmides vecteurs codant pour un TAA

Dans les CEO, les essais menés jusqu'à maintenant ont principalement ciblé l'antigène NY-ESO-1. Il n'a pas été montré d'efficacité notable de cette approche (146). Récemment, un essai clinique utilisant un vaccin à base d'une combinaison d'épitope ciblant 5 antigènes tumoraux fréquemment exprimés (ACE, p53, HER-2, MAGE2, MAGE3) a été lancé dans les cancers de l'ovaire en rechute en réponse après traitement par chimiothérapie (EudraCT N° 2020-004364-25). Les patientes seront randomisées entre observation, vaccin et vaccin plus pembrolizumab (anti-PD1).

### 1.3. CD95/CD95L : rôles biologiques

#### 1.3.1. La famille des ligands et des récepteurs de mort

##### a. Généralités

Certains membres de la superfamille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (« Tumor Necrosis Factor » ; TNF) jouent un rôle important dans l'activation d'un signal de mort cellulaire appelé apoptose. C'est le cas des récepteurs contenant un domaine de mort (DD) comme CD95, TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor (TRAILR)1/2, TNFR1, DR3, DR6, nerve growth factor receptor (NGFR), et ectodysplasin receptor (EDAR). Ces récepteurs sont caractérisés par la présence d'un DD intracellulaire, requis pour induire l'apoptose (147). Certains d'entre eux, notamment CD95, forment des multimères non seulement en présence, mais également en l'absence de leur ligand trimérique connu (148,149), rendant complexe l'étude du lien entre leur agrégation et l'induction de la signalisation cellulaire.

CD95 est le prototype des récepteurs de mort. Depuis l'identification d'un anticorps monoclonal anti-APO-1 efficace pour éliminer des cellules tumorales, la plupart des études menées sur ce récepteur se focalisent sur son rôle apoptotique. Cependant quinze ans après sa découverte, l'équipe de Marcus Peter a révélé que ce récepteur pouvait promouvoir la motilité et le caractère invasif des cellules tumorales résistantes à l'apoptose (150) indiquant une plus grande complexité dans la signalisation de ce récepteur. Le ligand de CD95, CD95L est un ligand membranaire qui après clivage par métalloprotéases génère une forme soluble (sCD95L) qui semble impliqué dans l'oncogenèse des cancers du sein et de l'ovaire (figure 8).

##### b. CD95

CD95 est aussi nommé Fas, TNFRSF6 (Tumor necrosis family receptor superfamily member 6), ou APO-1 (apoptosis antigen 1), car sa fonction a été observée par différentes équipes (151,152), avant d'être cloné par l'équipe de Nagata en 1991(153). Le gène Fas (gène nommé APT1) codant pour CD95 est situé sur le bras long du chromosome 10 humain (10q24.1). Il est composé de 9 exons dont le 6e code pour la région transmembranaire du récepteur.

La protéine entière codée à partir du gène APT1 est une glycoprotéine transmembranaire. Son expression est ubiquitaire. En terme de structure, la région extracellulaire du récepteur est composée de trois domaines riches en cystéines (CRD): CRD1, CRD2 et CRD3. La région intracellulaire du récepteur contient un domaine intracellulaire, appelé domaine de mort (DD), il est nécessaire à l'induction de l'apoptose (154,155). Récemment, un nouveau domaine appelé calcium-inducing domain (CID), en amont du DD et proche de la membrane a été identifié par notre groupe et a été impliqué dans la signalisation non-apoptotique induite par CD95 (156,157).

### c. CD95L

Le CD95L (FasL ou encore CD178) est le ligand associé à CD95, il appartient à la famille du TNF. Il est codé par le gène *FASLG* localisé sur le bras long du chromosome 1 humain (1q23).

Le CD95L est une protéine transmembranaire de type II de 40 kDa exprimée sous forme homotrimérique au niveau de la membrane cytoplasmique (158,159). Un domaine de reconnaissance et de liaison avec le CD95 est présent dans la région extracellulaire.

Contrairement au récepteur CD95, le CD95L n'est pas exprimé de manière ubiquitaire. Il est principalement détecté à la surface des lymphocytes T activés (158) et des cellules *Natural Killer* (NK) (160), participant à l'élimination des cellules infectées ou transformées, puis à la contraction de la réponse immune. On retrouve également ce ligand au niveau de sites dits "immuno-privilegiés", c'est-à-dire à la surface des neurones (161), de l'épithélium cornéen (162), des cellules de Sertoli (163) mais aussi au niveau des cellules déciduales du placenta (164). A ces endroits, il semble prévenir l'infiltration de cellules immunitaires et limite l'étendue de l'inflammation dans les organes concernés.

Le CD95L peut être clivé par des métalloprotéases (165,166) (MMP3 (167), MMP7 (168), MMP9 (169) et ADAM-10 (170,171) et libérer le sCD95L. Après sa libération dans la circulation sanguine, le sCD95L qui se présente sous forme homotrimérique (172,173) a longtemps été considéré comme un facteur n'ayant pour fonction qu'un rôle d'inhibiteur compétitif du mCD95L pour la liaison au récepteur. Ainsi, l'action du

sCD95L était uniquement observée au travers du blocage du signal apoptotique (166,174). Ce ligand soluble semble cependant être capable d'initier des signaux non-apoptotiques suite à sa fixation au récepteur CD95, comme le montrent des études réalisées depuis quelques années dans notre équipe (84,175,176).

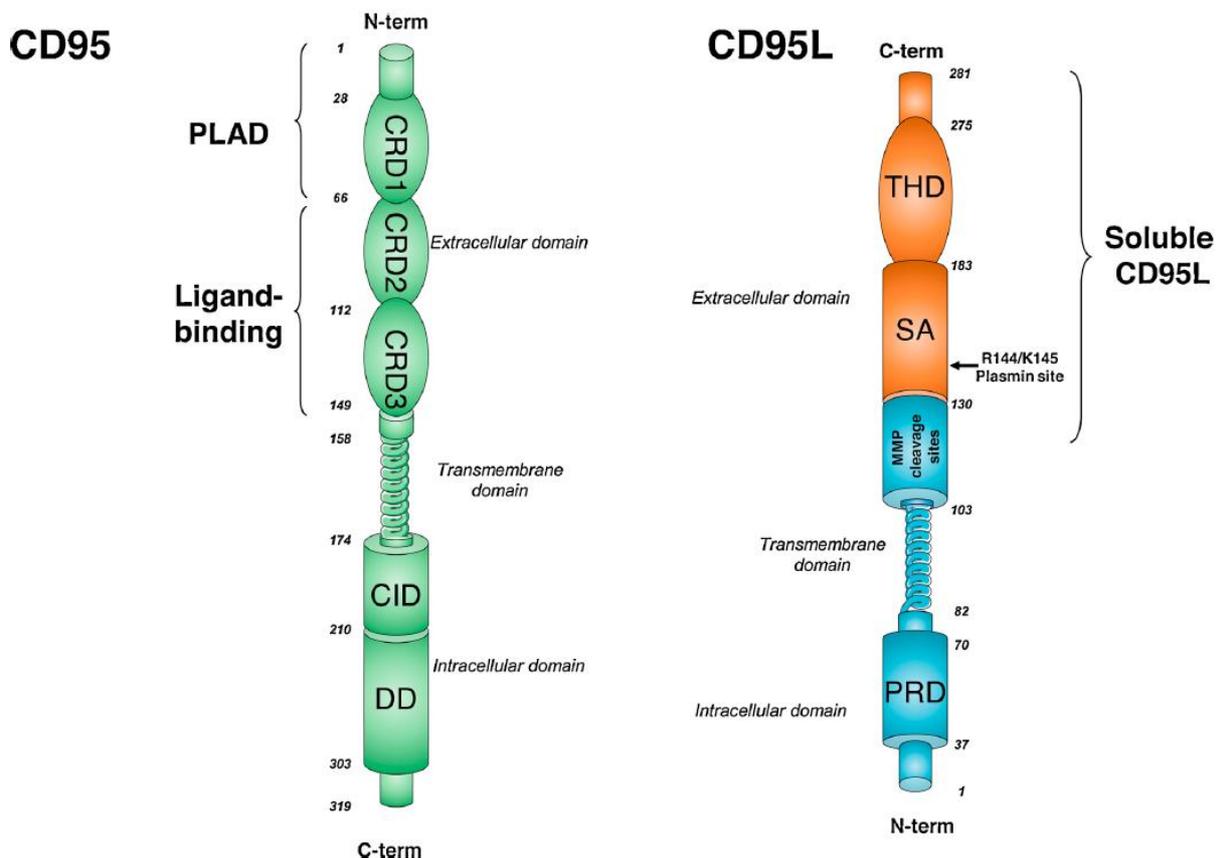


Figure 8 : structure CD95 et CD95L, d'après Guegan (177)

### 1.3.2. Signalisation CD95/CD95L pro-apoptotique

L'apoptose peut être déclenchée dans les cellules via 2 voies de signalisation : la voie extrinsèque, qui met en jeu l'interaction des récepteurs de morts et leurs ligands, et la voie intrinsèque, activée également par l'accumulation d'anomalies intracellulaires comme des dommages à l'ADN, une surexpression d'oncogène, une dérégulation de

la fonction mitochondriale, un stress du réticulum endoplasmique et / ou infection virale.

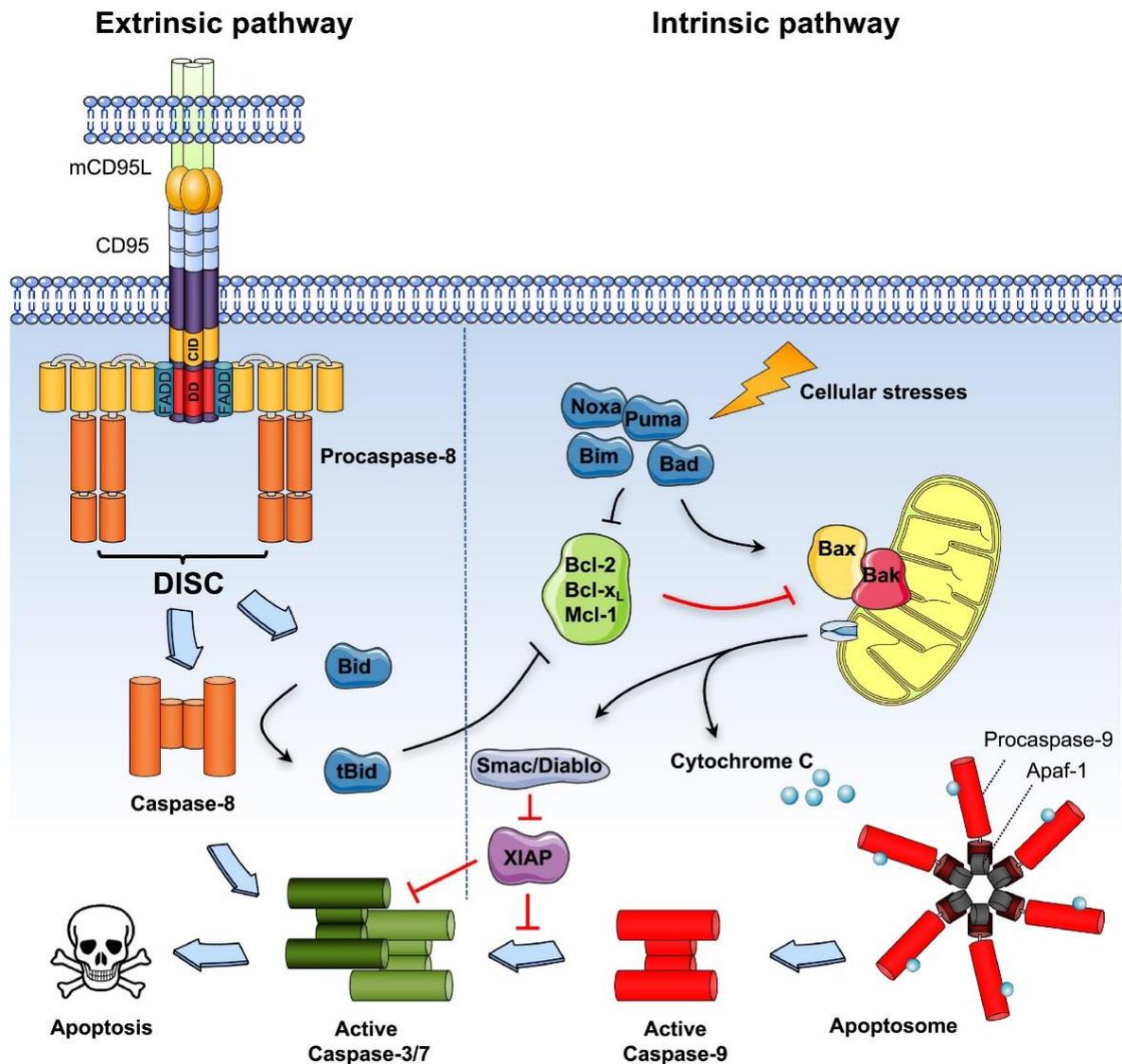


Figure 9 : voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose pouvant être mise en œuvre par la signalisation CD95/CD95L, d'après Guegan (178)

La signalisation apoptotique médiée par CD95 peut être déclenchée selon ces 2 voies de signalisation (figure 9).

L'activation de la voie extrinsèque est consécutive à la liaison du CD95L membranaire (agrégat d'homotrimères) au récepteur CD95, entraînant une multimérisation de ce dernier au niveau de la membrane plasmique et formant ainsi une plateforme de

signalisation. La première conséquence de ce changement de conformation est le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (*Fas Associating protein with a Death Domain*) par le domaine de mort de CD95. La protéine FADD est composée d'un domaine effecteur de mort, DED (*Death Effector Domain*), qui permet de recruter la procaspase 8 (179). Le complexe CD95/FADD/caspase 8 est appelé DISC pour « *Death-inducing signaling complex* » (180). La procaspase 8 est activée au niveau du DISC par auto-clivage, puis est libérée dans le cytoplasme où elle va cliver et activer les caspases 3 et 7. Ces caspases clivent différentes protéines conduisant à la mort cellulaire par apoptose de la cellule.

La voie intrinsèque s'active de manière secondaire lors du relargage de cytochrome c et de SMAC/DIABLO provenant de la mitochondrie, ce qui respectivement favorise la formation de l'apoptosome avec le facteur d'activation des protéines de l'apoptose cytosolique APAF-1, entraînant l'agrégation et l'activation de la caspase-9, qui à son tour clive la caspase-3 et la libération des facteurs inhibiteurs du clivage des caspases comme l'inhibiteur de l'apoptose lié à l'X (XIAP).

En se basant sur l'efficacité de la formation du DISC et l'expression de l'inhibiteur de l'apoptose lié à l'X (XIAP), les cellules peuvent être classées comme cellules de type I ou II (181). Dans les cellules de type I, la formation du DISC se produit rapidement et efficacement, générant de grandes quantités de molécules caspase-8 qui peuvent activer directement l'effecteur caspases -3 et -7. Les cellules de type II présentent une formation retardée et réduite du complexe DISC (181). Par rapport aux cellules de type I, les cellules de type II sont plus dépendantes de la voie passant par la mitochondrie pour induire un signal apoptotique et des facteurs bloquant cette voie comme Bcl2 sont donc plus efficace pour inhiber la mort cellulaire dans ces cellules (181–183). La surexpression XIAP dans les cellules de type 2 nécessite la libération de Diablo/SMAC par la mitochondrie pour libérer l'activité de la caspase-3 et donc explique la dépendance accrue à la voie intrinsèque pour le déclenchement de l'apoptose dans ces cellules (178). Par ailleurs, une activité PI3K élevée ou une diminution de son régulateur PTEN a été observée dans les cellules de type 2, alors que ce signal est réduit dans les cellules de type I (184,185). La voie PI3k diminue l'agrégation de CD95. Elle modifie aussi l'interaction de certaines protéines avec FADD et ainsi inhibe la fonction du DISC.

L'efficacité de l'apoptose induite par la voie CD95/CD95L est donc régulée différemment suivant les types cellulaires.

### 1.3.3. Signalisation non-apoptotique

#### a. Régulation des fonctions des cellules immunitaires

##### Chimio-attraction par le CD95L

L'expression ectopique du CD95L induit une réponse inflammatoire (186) impliquant les granulocytes neutrophiles, des cellules Th1 et des lymphocytes T CD8 + cytotoxiques (187).

##### *Rôle de sCD95L dans l'attraction des cellules inflammatoires*

Le clivage du CD95L transmembranaire par des métalloprotéases permet le relargage du ligand soluble sCD95L. Le sCD95L a longtemps été considéré comme une molécule inerte pouvant uniquement bloquer le signal de mort médié par le CD95L par inhibition compétitive du site CD95 (165,166). Cependant, des travaux récents ont démontré que le sCD95L joue un rôle important dans l'inflammation et l'auto-immunité chez les patients atteints de lupus érythémateux systémique, via l'activation des voies de signalisation NF- $\kappa$ B et PI3K (174,176). Dans cette pathologie inflammatoire chronique, notre équipe a montré que le sCD95L était capable de promouvoir le trafic des cellules Th17 dans les organes inflammés en augmentant l'expression du ligand de la P-sélectine (PSGL-1); et de stimuler l'extravasation des cellules T inflammatoires en induisant la sécrétion de sphingosine-1-phosphate (S1P) et l'expression de son récepteur S1PR3 (156).

Le sCD95L soluble peut également entraîner la migration de cellules immunitaires telles que les neutrophiles (188).

##### *Rôle d'un signal « find me » par activation de la voie CD95*

L'attraction des neutrophiles pourrait aussi être associée à la libération de chimio-attracteurs solubles par la mort des cellules hôtes. Des données récentes ont montré que parallèlement au signal apoptotique, CD95L déclenche une voie de signalisation dépendante de c-IAP1/2 dans les cellules tumorales mourantes, qui favorise la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'interleukine (IL)-6, IL-8, CXCL1,

la protéine chimio-attractrice monocytaire (MCP)-1, et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes/macrophages (GM-CSF). La production de ces cytokines non seulement favorise la chimiotaxie des phagocytes mais stimule également leur capacité à phagocyter et à éliminer les cellules apoptotiques, nécessaire à la mise en place d'une réponse immunitaire. La caspase-8 joue un rôle important dans cette fonction, en plus de son rôle pro-apoptotique (178).

#### Effet sur les cellules dendritiques

L'activation du CD95 sur des cellules dendritiques immatures induit leur maturation et la sécrétion de molécules pro-inflammatoires, notamment IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  (189). D'autre part, l'expression de CD95 sur les cellules dendritiques matures entraîne leur élimination par des lymphocytes T exprimant le CD95L (190). Le CD95 est donc impliqué dans le recrutement et l'activation des cellules présentant l'antigène (APCs) lors d'inflammation tissulaire, et ensuite dans l'élimination des cellules dendritiques. Par conséquent, le CD95 contribue au développement d'une réponse immune efficace et transitoire, permettant ainsi un rôle de défense tout en évitant une activation auto-immune.

#### Activation, différenciation et mort des cellules T et B sous le contrôle du CD95 (figure 10)

Le CD95 peut également jouer un rôle dans la prolifération des cellules T, notamment après agrégation avec le CD3 (191). De plus, l'activation du CD95/TCR semble nécessaire pour promouvoir la prolifération des cellules T grâce à la production d'IL-2 par un mécanisme dépendant de la caspase 8 (192).

Le CD95L n'est pas retrouvé à la surface des cellules T naïves, mais est rapidement exprimé après l'activation du TCR (193). Il va jouer un rôle dans la fin de la réponse immune, permettant la contraction immune par apoptose des cellules activées (activation-induced cell death, AICD), principalement pour les cellules T reconnaissant des antigènes de basse affinité (194).

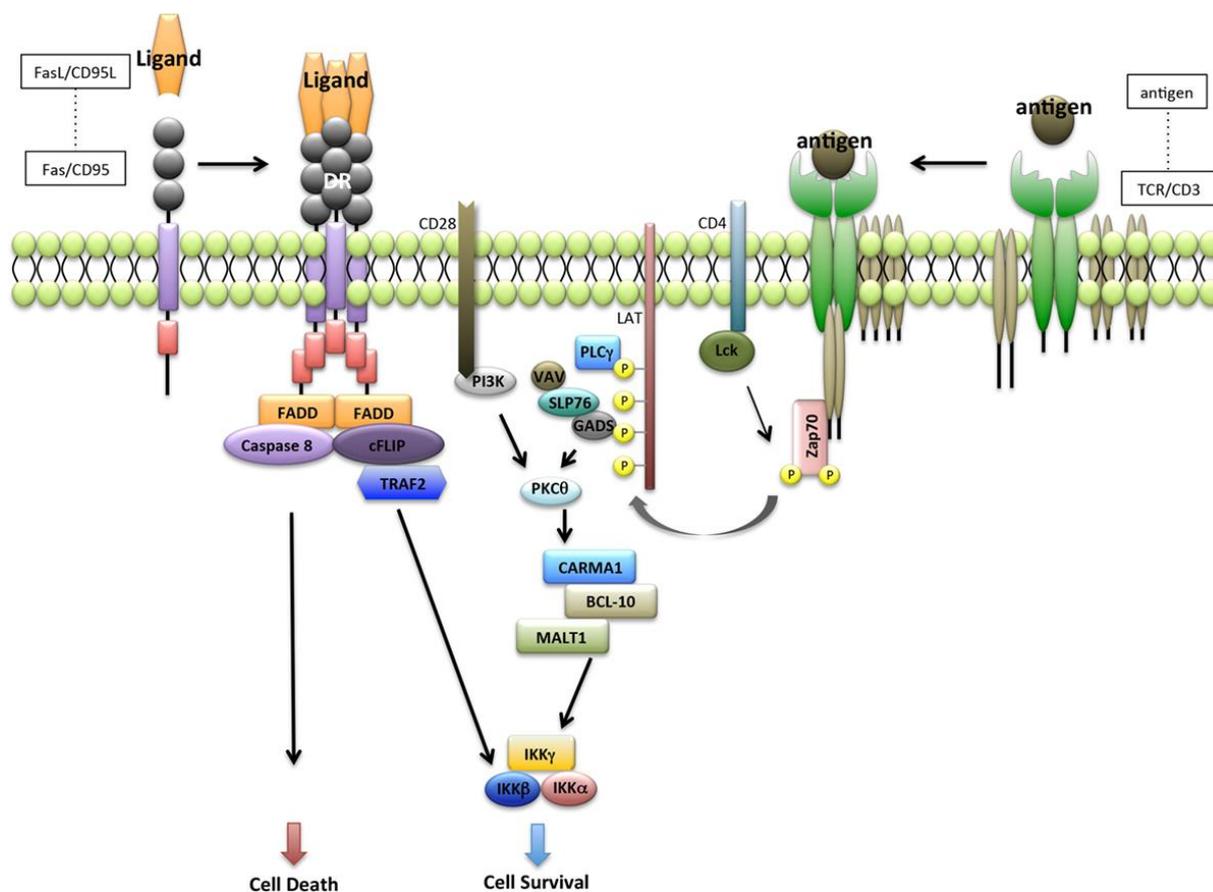


Figure 10 : rôle de l'interaction CD95/CD95L dans les lymphocytes T, d'après Yamada (195)

Au niveau des cellules B, le CD95 contribue à l'élimination des cellules auto-immunes au niveau des centres germinatifs et donc à la sélection des lymphocytes B avec une affinité augmentée pour les antigènes (196). La signalisation CD95/CD95L semble également contrôler la fabrication d'IgE et d'auto-anticorps (197).

#### Effet de l'expression du CD95L par les cellules T mémoires

Les cellules T mémoires ont une longue durée de vie. Elles jouent un rôle important dans l'efficacité de la réponse immunitaire adaptative aux agents pathogènes et aux tumeurs. Le compartiment des cellules T mémoires a été divisé en 2 sous-groupes : les cellules T mémoires conventionnelles centrales (« central memory T cells » ; TCM) retrouvées dans les organes lymphoïdes et les cellules T mémoires effectrices (« effector memory T cells », TEM) retrouvées dans les tissus périphériques. Les

cellules TCM sont des populations à longue durée de vie alors que les TEM sont des cellules subissant une différenciation terminale après un nombre limité de divisions. Les cellules T mémoires souche lymphocytaires (TSCM) sont présentes dans le sous-groupe TCM et expriment un niveau augmenté de CD95. Elles sont multipotentes et présentent une capacité importante d'auto-renouvellement par rapport aux TEM. Le rôle du signal CD95L/CD95 dans l'activation et la maturation des cellules T a récemment été mis en évidence en élucidant l'effet délétère des cellules T mémoires dans la réponse antitumorale induite par la thérapie cellulaire adoptive. Ainsi, dans des populations de cellules T mixtes, les cellules T mémoires exprimant CD95L accélèrent la maturation des cellules T naives en TCM, grâce à une induction de la voie de signalisation PI3K sous le contrôle de la voie CD95L/CD95 (198). Cette réponse non apoptotique CD95L dépendante accélérant le processus de différenciation et de maturation diminue l'efficacité de la réponse anti-tumorale associée à la thérapie cellulaire adoptive. Ce processus immunitaire a été appelé « différenciation précoce » et s'observe à la fois pour les cellules T naives CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (198). Les cellules T actives qui rentrent en différenciation précoce ne génèrent pas de populations de TSCM ou TCM, mais plutôt des TEM avec une capacité de prolifération et d'activité anti-tumorale réduite. Cette capacité des cellules T mémoire pourrait être un mécanisme pour synchroniser la réponse immunitaire et l'éteindre une fois que la réponse anti-tumorale ou infectieuse est terminée.

#### CD95 et différenciation Th17

Les cellules Th17 organisent la réponse inflammatoire aux agents pathogènes extracellulaires (199). En plus de stimuler la transmigration des cellules Th17, l'expression du CD95 joue un rôle majeur dans la différenciation Th17 en séquestrant STAT1, permettant une activation de la voie de signalisation STAT3 (200).

## b. Migration cellulaire

L'engagement de CD95 conduit à une augmentation rapide, localisée et transitoire de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans le cytosol (201,202), qui contrôle négativement la signalisation apoptotique de CD95 (203) et favorise la migration cellulaire (176) et les métastases (84) via un signal c-yes / PLC $\gamma$ 1 / IP $_3$  / SOC / Ca $^{2+}$  + / PI3K (figure 11).

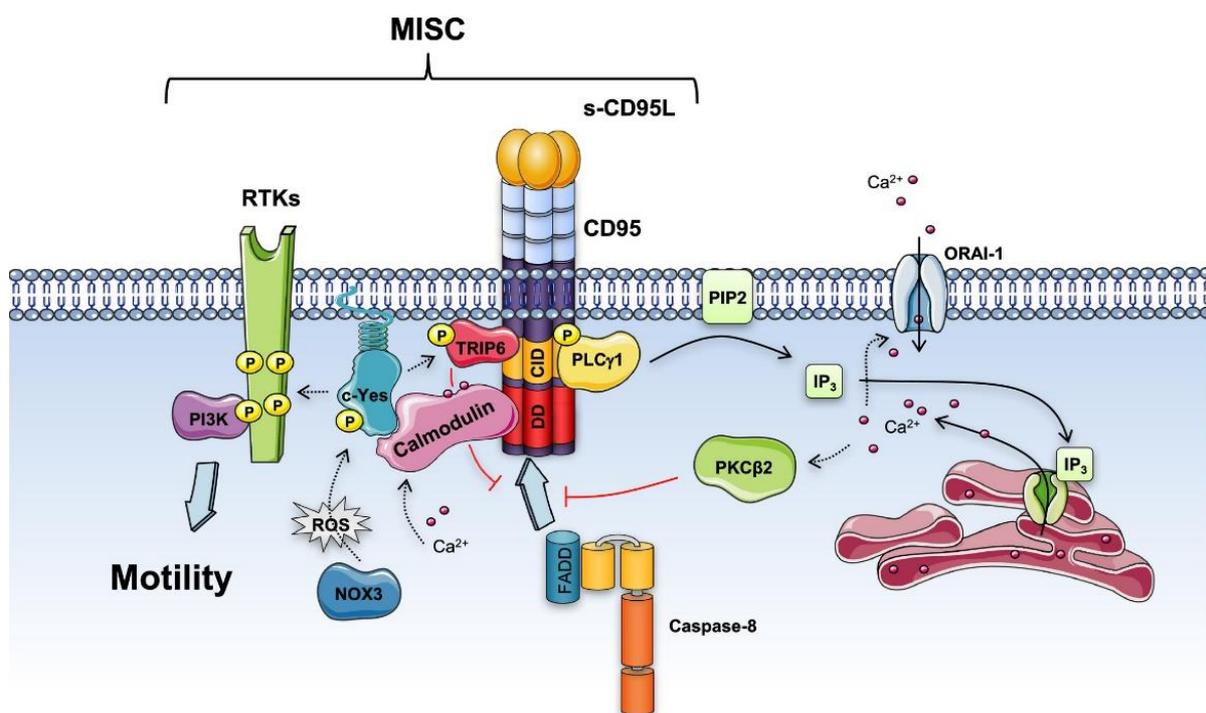


Figure 11 : voie de signalisation induite sous l'effet de la liaison de sCD95L au CD95, permettant de libérer un signal calcique et d'induire la mobilité cellulaire, d'après Guegan (178).

### Régulation de la migration à travers l'endothélium et de l'angiogénèse

La découverte de l'expression ectopique de CD95L par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins irrigant les tissus inflammatoires des patients atteints de lupus (156) et les tissus tumoraux (84,85) suggère que le CD95L pourrait servir de barrière pour certaines populations lymphocytaires T (85), de chimioattracteur après la libération de sCD95L par les métalloprotéases (156,157), ou de molécule d'adhésion pour la fixation, l'activation et le recrutement des neutrophiles (204).

Motz et ses collègues rapportent que l'expression de CD95L par les cellules endothéliales dans les tissus tumoraux représente une barrière physique, tuant les cellules T CD8+ tout en épargnant les cellules T régulatrices (Treg), dont l'accumulation dans la tumeur pourrait provoquer un environnement immunosuppresseur (85). Néanmoins, le CD95L transmembranaire à la surface des cellules endothéliales a également des fonctions non-apoptotiques, car il favorise la liaison et le recrutement des cellules myéloïdes en induisant des processus d'adhésion et de transmigration (204). Après clivage du CD95L par des métalloprotéases, la génération d'un gradient sCD95L favoriserait le recrutement de cellules Th17 pro-inflammatoires dans les tissus inflammatoires des patients atteints de lupus, contribuant ainsi à aggraver leurs symptômes cliniques (156). Ce gradient sCD95L chez les patientes atteintes de cancers du sein triple négatifs favorise de l'autre côté des vaisseaux, l'attraction et la migration des cellules cancéreuses et augmente le risque de métastases (84).

L'expression de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (« plasminogen activator inhibitor 1 » ; PAI-1) par les cellules endothéliales est un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du sein (205). L'expression de CD95L par les cellules endothéliales contrôle la néo-angiogénèse tumorale par un mécanisme dépendant de PAI-1 (206). PAI-1 est l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA), qui convertit le plasminogène en sa forme active, la plasmine. La plasmine peut à son tour cliver CD95L dans son domaine de trimérisation, libérant un ligand cytotoxique qui élimine les cellules endothéliales et abroge la néo-angiogénèse (206). La surexpression de PAI-1 inhibe ce processus et favorise la formation de néo-vaisseaux dans les cancers.

Dans l'ensemble, ces études soulèvent la question du rôle biologique exact de CD95L exprimé dans les cellules endothéliales.

### c. adhésion et structure cellulaire

#### Jonctions épithéliales

L'altération des jonctions adhérentes dans les épithéliums est associée à la perte de contacts entre les cellules, une étape initiale de la transition épithélio-

mésenchymateuse et à la dissémination métastatique des cellules cancéreuses. La perte de ces contacts génère un programme de mort cellulaire qui dépend du CD95 (207). De plus, le domaine C-terminal de CD95 est important pour la distribution du récepteur dans les jonctions adhérentes des cellules épithéliales (207). Cette région de CD95 interagit avec la molécule de polarité Dlg1, empêchant ainsi la formation de DISC. La dissociation du CD95 - Dlg1 pourrait représenter un mécanisme de contrôle pour éliminer les cellules anormales dans les tissus épithéliaux, empêchant ainsi l'étape initiale de dissémination métastatique.

### Cytosquelette cellulaire

Le lien entre CD95 et le cytosquelette pourrait refléter différents stades de développement de la tumeur. Peter et al. ont montré que les lignées cellulaires cancéreuses avec une signature moléculaire mésenchymateuse ont un lien fort entre CD95 et le cytosquelette d'actine et que le signal apoptotique est sensible aux perturbateurs de l'actine (c'est-à-dire la cytochalasine D) dans ces cellules. Les cellules épithéliales présentent une sensibilité plus forte aux composés perturbateurs des microtubules (182). La plupart des études sur le cytosquelette et le CD95 se concentrent sur le résultat apoptotique et négligent d'évaluer l'effet évident sur la migration et l'invasion des cellules.

#### d. Homéostasie des cellules souches

Les signaux CD95/CD95L jouent un rôle dans les cellules souches (208,209). Il a été montré que la stimulation de CD95 dans des cellules souches neuronales n'entraînent pas la mort cellulaire, mais au contraire améliore la survie de ces cellules, grâce à l'activation d'une voie de signalisation Src/PI3K/AKT/mTOR. Au contraire, la suppression de CD95 diminue la neurogénèse (210). Comme les cellules souches normales sont souvent à l'origine des cellules souches tumorales, ces données suggèrent que CD95 pourrait aussi avoir des fonctions non apoptotiques dans les cellules souches tumorales (211).

### e. Conclusion

La signalisation activée par CD95 est impliquée dans de nombreux rôles biologiques. La différence de cinétique de l'agrégation de CD95, son internalisation ou sa distribution à la membrane pourrait jouer dans l'activation de ces différentes fonctions. Elle est contrôlée et activée notamment par le sCD95L et le CD95L. Au final, le choix entre une réponse apoptotique et non-apoptotique pourrait être sous le contrôle de la forme de CD95L se fixant au récepteur (figure 12). Le ligand soluble ne déclenche pas la mort cellulaire (165,166) mais implémente au contraire des voies de signalisation non apoptotiques (84,176). Le site de clivage et des modifications post traductionnelles du sCD95L pourraient aussi modifier les voies de signalisation activées (212). Alors que la plupart des études sur le sCD95L indiquent qu'il possède une stoechiométrie homotrimérique (166), le CD95L membranaire présente un degré d'agrégation plus élevé (213). Des différences dans leur stoechiométrie avec pour conséquence possible un effet différent sur leur conformation lors de la liaison avec le CD95 pourrait expliquer l'activation de voies de signalisation différentes dans les cellules (159,183).

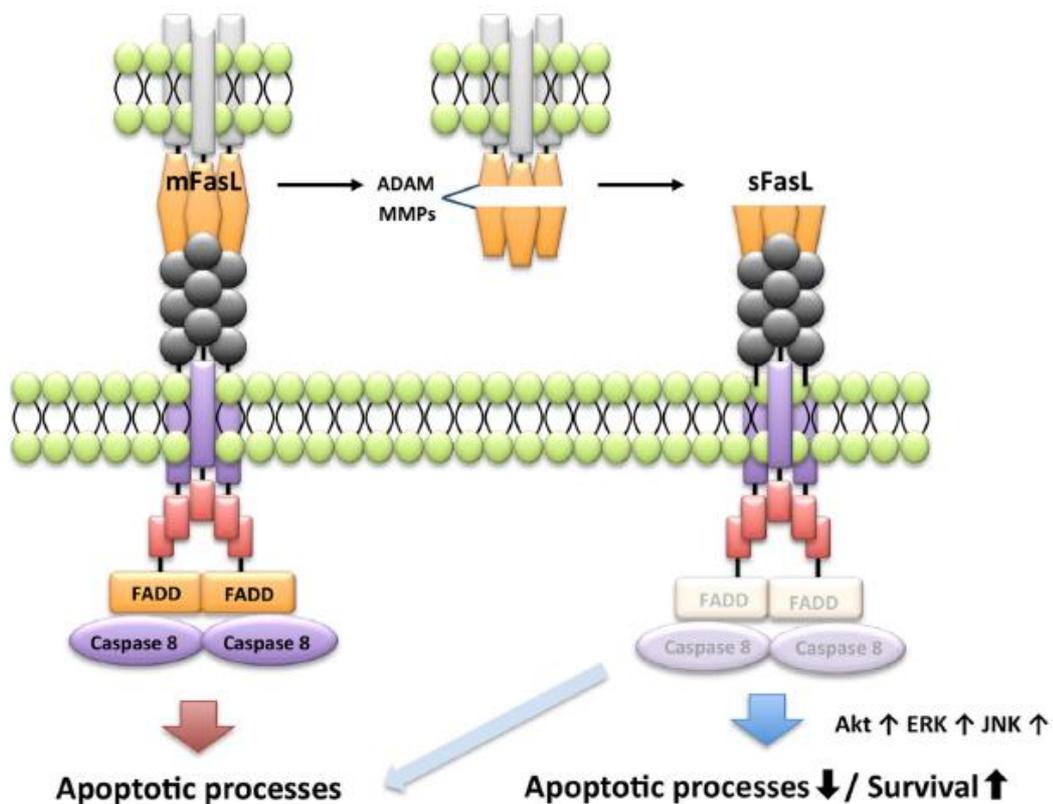


Figure 12 : activation de l'apoptose ou des processus non apoptotiques selon la liaison CD95L et sCD95L ; d'après Yamada (195).

Dans l'ensemble, ces résultats soulignent l'importance de caractériser finement la stoechiométrie du sCD95L chez les patients atteints de cancers ou de troubles inflammatoires chroniques/actifs pour prédire son rôle biologique (c'est-à-dire apoptotique par rapport à non apoptotique).

#### 1.3.4. CD95/CD95L et cancers

##### a. Généralités

La signalisation pro-apoptotique médiée par CD95 est probablement utilisée pour contrôler la prolifération tumorale, au moins pendant la phase d'immuno-surveillance. Cependant, lorsque la tumeur résiste au système immunitaire, l'expression de CD95 par les cellules tumorales implique une résistance au signal apoptotique. De multiples mécanismes, comme la diminution du niveau d'expression du récepteur ou de la dérégulation des membres du DISC comme FADD, caspases 8 et 10 peuvent expliquer cette résistance (211).

L'activation des fonctions non-apoptotiques pourrait également participer à cette résistance (211).

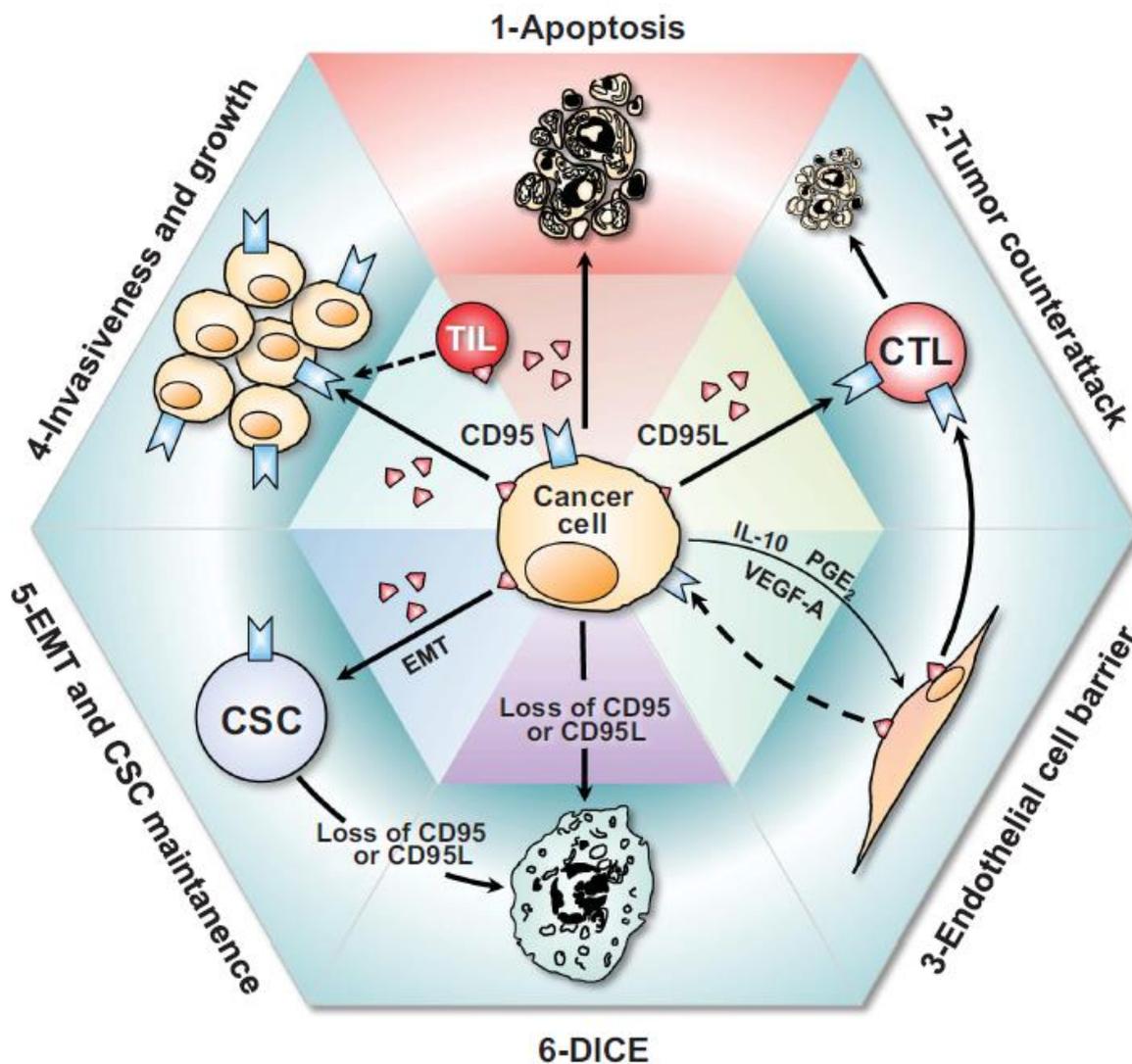


Figure 13 : rôles putatifs de la voie CD95/CD95L dans les cancers, d'après Peter (211)

### CD95L et la controverse de la contre-attaque tumorale

Initialement, il a été observé à plusieurs reprises l'expression de CD95L par des cellules tumorales, soulevant l'hypothèse d'une " contre-attaque " par la tumeur, qui éliminerait par ce mécanisme les cellules immunitaires antitumorales, telles que les lymphocyte T cytotoxiques (214,215) (Figure 13-2, contre-attaque tumorale). Cependant l'existence de cette contre-attaque reste très controversée (216) et cela car les outils utilisés pour analyser la présence de CD95L dans les tissus humains se sont révélés, dans les études ultérieures, non-spécifiques (217). Nos données confirment que les cellules tumorales dans les cancers de l'ovaire de haut grade ou dans les tumeurs du sein triple-négatives n'expriment pas de CD95L. L'augmentation

de la concentration rapportée de sCD95L dans le sérum de patients atteints de cancer a souvent été interprétée dans le contexte de la théorie de la contre-attaque CD95L. Une régulation à la hausse de CD95L dans le sérum des patients suggérerait un rôle immunosuppresseur possible pour cette molécule.

### Barrière endothéliale

Récemment, le concept de contre-attaque tumorale a été redécouvert sous une forme différente. Il a été rapporté que le CD95L n'était pas exprimé par l'épithélium tumoral de divers cancers solides humains, mais par les cellules endothéliales recouvrant les néo-vaisseaux sanguins alimentant la tumeur (84,85). Dans l'étude de Coukos et ses collègues, le mCD95L exprimé par les cellules endothéliales semble induire l'apoptose que des cellules T CD8+ effectrices, mais pas des cellules T régulatrices, qui se sont avérées protégées par l'expression d'un certain nombre de protéines anti-apoptotiques, comme cFLIP, Bcl-2 et Bcl-xL. Ces Treg s'accumulent ainsi dans la tumeur créant un environnement immunosuppresseur. L'expression de CD95L au niveau endothélial jouerait ainsi un rôle de barrière immunitaire sélective.

### Promotion des activités tumorales

Dans les cellules tumorales résistantes au signal apoptotique, la stimulation du CD95 augmente *in vitro* la motilité cellulaire et le caractère invasif (150). L'invasion médiée par CD95 dans ces cellules tumorales nécessite l'activation des voies de signalisation NFκB et ERK (218).

Le CD95 active de multiples voies de signalisation potentiellement cancérogènes. C'est le cas notamment de la voie NFκB (219), de voies activant l'invasion à travers la signalisation Src/PI3K/GSK3β/MMP (176,220) ou la cofilin (221). Il a également été montré que l'activation Sck/Shc2 sous le contrôle du CD95 est indispensable à la progression du cycle cellulaire (222).

Par ailleurs, l'extinction de CD95 et CD95L par siRNA ou ShRNA diminue très fortement la croissance des cellules tumorales, permettant de conclure à un rôle important de cette voie pour la survie et la prolifération cellulaire (223).

### Maintenance des cellules souches tumorales

Dans des cancers digestifs, il a été montré que le CD95 est capable d'activer le programme de transition épithélio-mésenchymateux (224), qui est un des traits caractéristiques des cellules souches tumorales (225). L'équipe de Peter a ensuite montré que CD95 est nécessaire à la survie des cellules souches tumorales et permet l'émergence de nouvelles cellules souches (226). La stimulation de CD95 sur les cellules tumorales induit une conversion des cellules différenciées en cellules souches. Cette activité de reprogrammation du CD95 semble indépendante de sa fonction d'induction d'apoptose et dépendante de la voie STAT1 (227). La stimulation de CD95 non seulement augmente le nombre de cellules cancéreuses avec des caractéristiques de cellules souches, mais a également empêché la différenciation des cellules souches tumorales, ce qui suggère que l'expression de CD95 sur les cellules cancéreuses maintient le pool de cellules souches tumorales (226).

#### Mort induite par la suppression du CD95 ou du CD95L

L'expression du récepteur semble également jouer un rôle dans la signalisation cellulaire. Ainsi, l'équipe de Peter a rapporté que l'élimination de CD95 ou de son ligand CD95L induit la mort des cellules tumorales (in vitro et in vivo), par un processus appelé DICE (death induced by CD95 or CD95L elimination) (228). Cette activité de CD95 comme facteur de survie semble s'observer quasi exclusivement dans les cellules tumorales : au cours du développement embryonnaire de souris pour lesquelles CD95 ou CD95L a été supprimé, aucun des tissus normaux ne présentent de défaut de croissance ou de signes de morts cellulaires (229). Par ailleurs, lorsque le CD95 ou le CD95L est éteint dans des lignées de cellules cancéreuses (~40 lignées testées), la plupart des cellules meurent par DICE. Le même type d'observation est fait in vivo dans des modèles de cancérogénèse : l'extinction CD95 fait complètement disparaître l'appartenance de tumeur dans un modèle animal de cancer ovarien (228).

Les caractéristiques du DICE sont les suivantes : il s'agit d'une mort par une catastrophe mitotique avec des signes d'apoptose, d'autophagie et de sénescence, qui n'entraînerait pas d'inflammation. Un test de 1200 substances pharmacologiques différentes et un screening shRNA n'a pas permis de l'inhiber, ce qui suggère qu'il s'agit d'un mécanisme robuste de mort cellulaire (228). Il est probable que le DICE soit un mécanisme de sécurité dont le but est d'empêcher la survie des cellules cancéreuses démunies de CD95, et qui ne peuvent donc pas être éliminées par le

système immunitaire grâce à l'apoptose médiée par CD95/CD95L (230). Le DICE serait donc un mécanisme de défense naturel antitumoral. Le fait que des données montrent qu'aucune cellule cancéreuse ne présente une délétion des 2 allèles de CD95 est cohérent avec cette hypothèse (228). A noter que l'étude des cellules souches tumorales apporte également des arguments pour ce rôle, en montrant que les 2 mécanismes de mort DICE et apoptose par la voie canonique CD95 ont des rôles opposés pour éliminer les cellules souches tumorales par rapport aux cellules tumorales non souches. La conversion des cellules tumorales non souches en cellules tumorales souches induit une perte de sensibilité à l'apoptose induite par CD95 et en parallèle une augmentation de la sensibilité au DICE (226). L'induction de DICE dans des cellules tumorales entraîne une déplétion en cellules souches tumorales et la perte de caractéristiques de cellules souches (marqueurs de surface, moindre formation de sphère, ...). Cependant le DICE serait en fait une conclusion du DISE (Death Induced by Survival gene Elimination). En effet, le groupe du Dr Marcus Peter a mis en évidence que des séquences dans les ARN messagers de CD95 et CD95L et utilisées pour générer des ARN interférant possédaient un effet off-target en ciblant des gènes de survie cellulaire. Ainsi, l'utilisation d'ARN interférant pour diminuer CD95 ou CD95L, entraînait également la diminution de l'expression de ces gènes responsables de l'effet toxique observé dans les cellules tumorales (231).

#### b. Cancers du sein triple négatifs

Il n'existe que peu de données sur le rôle CD95/CD95L dans les cancers du sein triple négatifs.

Des études anciennes, qui n'avaient pas classé les tumeurs du sein selon leur sous-type moléculaire, ont montré que CD95 était fréquemment surexprimé et serait un facteur de bon pronostic (232). L'expression de CD95L ou de son ARNm est corrélée à un stade plus avancé (taille et atteinte ganglionnaire) et à un moins bon pronostic (232–234). A noter qu'il semblerait que le ratio CD95L/CD95 pourrait être un marqueur pronostic (233).

Une étude plus récente sur 667 patientes atteintes de cancer du sein, dont 16% atteintes de cancers triple négatifs, a montré que CD95 est plus fréquemment exprimé dans les cancers du sein triple négatifs que dans les sous-types hormono-dépendants

(235). L'expression de CD95 était corrélée à un grade 3 tumoral. Dans la cohorte entière, l'expression de CD95 est associée à un risque de rechute diminué et à une meilleure survie. Par contre, dans l'analyse en fonction du sous-groupe moléculaire, l'effet est retrouvé pour la survie sans rechute mais pas pour la survie globale pour les tumeurs RE négatives. Cependant ces analyses ne définissent pas si le CD95 vient du système immunitaire infiltrant ou des cellules tumorales. En effet, l'analyse des TIL CD8+ dans les cancers du sein ne montre pas d'impact pronostic sur la survie des cancers RE+ mais est un facteur pronostic dans le sous-groupe RE - (CSTN). De manière intéressante, il est retrouvé que les TILs CD8+ sont associés à une meilleure survie uniquement pour les tumeurs RE négatives présentant un niveau élevé de CD95, tandis que les tumeurs exprimant faiblement CD95, ou dans les tumeurs RE+, il n'est pas retrouvé d'impact de l'infiltrat CD8 (235).

Notre équipe a aussi montré le rôle pronostic négatif du sCD95L chez les patientes atteintes de cancers du sein triple négatifs (84). Ce rôle négatif semble s'exercer principalement en favorisant l'invasion tumorale et les métastases. A noter une autre étude, chez des patientes atteintes de cancers du sein métastatiques, qui retrouve un rôle pronostic défavorable pour sCD95L (236).

### c. Cancers de l'ovaire

Les données de l'impact de la signalisation CD95/CD95L pour les cancers de l'ovaire sont également très limitées. Il a été retrouvé dans l'ascite de patientes atteintes de cancer la sécrétion de microvésicules contenant CD95L. Il semblerait que ces microvésicules puissent provenir des cellules tumorales (237). Les données de l'impact de la signalisation CD95/CD95L pour les cancers de l'ovaire sont également très limitées.

Une autre étude a retrouvé l'expression de CD95 (principalement au niveau cytoplasmique) et CD95L dans des cancers de l'ovaire (238). Il semble que la présence de CD95L soit associée à un pronostic défavorable.

Il a également été retrouvé l'expression de CD95L, mais aussi de MMP-2 et MMP-9 sur des fragments circulant de membranes dérivées de tumeurs de l'ovaire. Des niveaux élevés de CD95L, MMP-2 et MMP-9 étaient associés de manière significative à un stade avancé (239).

Enfin, une étude s'est intéressée au sCD95L chez 35 patientes atteintes de cancer de l'ovaire. Dans cette étude, il n'a pas été retrouvé de corrélation statistique entre le niveau de sCD95L et la survie sans progression (240). A noter que tous les stades étaient mélangés et qu'il n'y avait pas d'information sur le type histologique. Des dosages séquentiels de sCD95 avant puis après chirurgie et en cours de chimiothérapie étaient effectués. Le niveau de sCD95L pendant la chimiothérapie semble augmenté par rapport au niveau postopératoire (240). Par ailleurs, l'expression de mCD95L sur les cellules endothéliales des vaisseaux associés à des modèles de cancers de l'ovaire pourrait réguler la capacité des cellules immunitaires à jouer leur rôle antitumoral (85). Enfin, une étude s'est intéressée au sCD95L présent dans des microvésicules circulantes chez 35 patientes atteintes de cancer de l'ovaire.

L'ensemble de ces travaux nous ont poussé à investiguer le rôle du sCD95L dans les cancers de l'ovaire et plus particulièrement dans les cancers séreux de haut grade montrant un rôle du système immunitaire dans le pronostic.

## 2. Hypothèse et objectifs

Des travaux réalisés au sein du laboratoire avaient montré l'impact pronostic négatif d'un taux sérique élevé de sCD95L, soulignant le rôle potentiellement très important de la signalisation CD95/CD95L dans le développement et la rechute des cancers du sein triple négatifs (84), en facilitant la dissémination métastatique. Etant donné les similitudes moléculaires importantes entre les cancers du sein triple négatifs et les cancers de l'ovaire séreux de haut grade, nous avons souhaité investiguer le rôle du sCD95L dans les cancers de l'ovaire, en faisant l'hypothèse que des résultats similaires en termes de pronostic et de rôle biologique pourraient être observés.

En parallèle, un travail prospectif de collection et d'analyse de cancers du sein triple négatifs localisés opérés d'emblée a été mis en place au sein du laboratoire avec la collaboration des cliniciens (chirurgiens, oncologue, anatomo-pathologistes). Ce travail avait pour but d'étudier de manière beaucoup plus fine le rôle du système CD95/CD95L sur des prélèvements frais, dissociés et non fixés en paraffine. Une analyse des tumeurs, notamment des sous-populations tumorales (cellules souches tumorales, cellules différenciées...) conjointement avec les cellules du système immunitaire était proposé. En effet, les différents travaux du laboratoire, notamment ceux menés sur les modèles lupiques, ont mis en évidence l'importance de la voie CD95/CD95L sur la régulation du système immunitaire (156).

Ces données nous ont conduit à proposer plusieurs objectifs pour nos travaux :

- Dans les cancers de l'ovaire :
  - Investiguer le rôle potentiel du sCD95L, pour vérifier si les résultats retrouvés dans les cancers du sein triple négatifs étaient similaires dans les cancers de l'ovaire
  - Evaluer l'impact de la signalisation CD95/CD95L sur des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire, pour notamment déterminer une fonction possible sur les cellules souches tumorales et sur l'activation de signaux pro-métastatiques
  - Evaluer l'impact de la signalisation CD95/CD95L sur les cellules immunitaires de l'environnement tumoral dans les cancers de l'ovaire.
- Dans les cancers du sein triple négatifs :

- Collaborer à la mise en place de la méthodologie de recueil et d'analyse des échantillons tumoraux frais pour étudier plus en détails le rôle de la signalisation CD95/CD95L.
- Vérifier l'impact potentiel de la congélation/décongélation sur les prélèvements frais réalisés
- Contribuer aux travaux de recherche évaluant l'impact de la signalisation CD95/CD95L sur les cellules tumorales de cancers du sein triple négatifs et sur le micro-environnement immunitaire.

### 3. Résultats

**Article 1 - Le taux sérique de CD95L est corrélé avec l'infiltration immunitaire tumorale et est un marqueur pronostic positif pour le cancer de l'ovaire séreux avancé de haut grade. Mol Cancer Res. 2019 Dec;17(12):2537-2548 (241)**

#### Introduction

Dans les cancers du sein triple négatifs, il a été montré qu'un niveau élevé de sCD95L est corrélé à la dissémination métastatique. Le sCD95L dans le contexte des cancers du sein triple négatifs semble promouvoir un signal conduisant la migration des cellules tumorales via l'activation de la voie PI3K après activation du récepteur EGF (EGFR) via un mécanisme indépendant de l'EGF.

Comme nous l'avons décrit, Il existe une proximité importante au niveau moléculaire entre les cancers du sein triple négatifs et des cancers de l'ovaire (notamment séreux de haut grade). Nous nous sommes posés la question de l'impact que pourrait avoir le sCD95L dans les cancers de l'ovaire. Pour cela, nous avons étudiés l'impact du dosage sCD95L chez 51 patientes atteintes de cancers de l'ovaire avancé dont nous avons collecté prospectivement des échantillons sanguins et tumoraux au moment du diagnostic, avant chimiothérapie. Nous avons ensuite examiné les conséquences sur les tumeurs de l'ovaire et leur environnement immunitaire du sCD95L.

#### Résultats et conclusion

Contrairement aux cancers du sein triple négatifs, nous avons observé qu'un niveau élevé de sCD95L était associé à un meilleur pronostic dans les cancers de l'ovaire, et plus précisément pour le sous-type séreux de haut grade. Le taux de sCD95L est également associé à un risque de rechute plus élevé (mais pas de décès) dans le modèle multivarié. Les facteurs pronostics cliniques habituels (résidu tumoral après chirurgie, atteinte ganglionnaire), mais également biologiques (infiltrat immunitaire) étaient retrouvés dans notre cohorte.

Les expériences que nous avons menées sur plusieurs lignées cellulaires de cancer de l'ovaire ont permis d'établir que le sCD95L n'avait pas d'impact sur la prolifération et la mort cellulaire, que ce soit seul ou en combinaison avec la chimiothérapie. Nous

avons ensuite évalué si le sCD95L pouvait affecter les cellules souches tumorales. Aucun effet du sCD95L n'ayant été mis en évidence, nous avons conclu à l'absence d'effet sur les cellules souches tumorales.

En l'absence d'effet du sCD95L sur les cellules tumorales, comment expliquer l'effet positif observé d'un haut niveau de sCD95L chez les patientes ? Nous avons formulé l'hypothèse que chez les patientes atteintes de cancer séreux de haut grade, le sCD95L pourrait affecter le microenvironnement tumoral, et notamment l'infiltrat des cellules immunitaires. Nous observons une augmentation significative de FoxP3 et du granzyme B chez les patientes présentant un marquage positif pour CD95L en immunohistochimie (IHC). Cette donnée montre qu'il existe une corrélation entre la présence de mCD95L et l'infiltrat immunitaire. L'activité granzyme B observée suggère une activité cytotoxique antitumorale, ce qui va à l'encontre de l'hypothèse soulevée du rôle modulateur de la réponse immunitaire par l'expression mCD95L sur les cellules endothéliales (85). Enfin, nous avons évalué la relation entre le sCD95L et l'infiltrat immunitaire. Nous avons observé que la concentration de sCD95L était corrélée avec le nombre de cellules T CD3+ et CD4+ infiltrant la tumeur, mais aussi avec le nombre de cellules Treg infiltrant la tumeur (FoxP3 +). Pour les LT CD8, le résultat est à la limite de la significativité mais il semble également y avoir une corrélation positive entre le dosage sCD95L et l'infiltrat CD8+. Le nombre de cellules B était aussi associé de manière significative à la concentration de sCD95L.

Pour conclure, les taux de sCD95L sont corrélés à l'infiltrat immunitaire dans les cancers de l'ovaire séreux de haut grade. Ces résultats suggèrent que le sCD95L pourrait être utilisé comme biomarqueur de l'infiltration immunitaire tumorale. Cette donnée pourrait avoir un impact thérapeutique, notamment pour guider les indications d'immunothérapie. L'impact potentiel sur l'effet d'une immunothérapie reste à déterminer et dépend probablement du type d'approche utilisée. Ainsi, un dosage élevé sCD95L pourrait permettre de sélectionner des patientes présentant des tumeurs ayant déjà un infiltrat immunitaire (tumeurs « chaude ») mais dont les cellules ne sont plus fonctionnelles (exhausted) et candidates à une approche type anti-PD1/PDL1. Au contraire, un dosage sCD95L bas pourrait permettre de sélectionner des patientes présentant des tumeurs sans infiltrat immunitaire (tumeurs « froides »)

pour lesquelles le but du traitement serait d'activer l'infiltration immunitaire intratumorale.

#### Contribution

L'auteur de la thèse a contribué à cette publication en participant à la conception, la réalisation et l'analyse des expériences et à la rédaction de l'article.

## Serum CD95L Level Correlates with Tumor Immune Infiltration and Is a Positive Prognostic Marker for Advanced High-Grade Serous Ovarian Cancer



Thibault De La Motte Rouge<sup>1,2</sup>, Julien Corné<sup>1,2</sup>, Aurélie Cauchois<sup>3</sup>, Marie Le Boulch<sup>2</sup>, Clotilde Poupon<sup>2,4</sup>, Sébastien Henno<sup>2</sup>, Nathalie Rioux-Leclercq<sup>2</sup>, Estelle Le Pabic<sup>5</sup>, Bruno Laviolle<sup>5</sup>, Véronique Catros<sup>6</sup>, Jean Levêque<sup>2,4</sup>, Alain Fautrel<sup>7</sup>, Matthieu Le Gallo<sup>1,2</sup>, Patrick Legembre<sup>1,2</sup>, and Vincent Lavoué<sup>2,4</sup>

### Abstract

Soluble CD95L (s-CD95L) is a chemoattractant for certain lymphocyte subpopulations. We examined whether this ligand is a prognostic marker for high-grade serous ovarian cancer (HGSOC) and whether it is associated with accumulation of immune cells in the tumor. Serum s-CD95L levels in 51 patients with advanced ovarian cancer were tested by ELISA. IHC staining of CD3, CD4, CD8, CD20, CD163, CD31, FoxP3, CCR6, IL-17, Granzyme B, PD-L1, and membrane CD95L was used to assess tumor-infiltrating immune cells. Although the intensity of CD3, CD8, CD4, CD20, and CD163 in tumor tissues remained constant regardless of membrane CD95L expression, tumors in patients with HGSOC with s-CD95L levels  $\geq 516$  pg/mL showed increased infiltration by CD3<sup>+</sup> T cells ( $P = 0.001$ ), comprising both cytotoxic CD8<sup>+</sup> ( $P = 0.01$ ) and CD4<sup>+</sup> ( $P = 0.0062$ ) cells including FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells ( $P = 0.0044$ ). Also, the number of tumor-infiltrating CD20<sup>+</sup> B cells ( $P = 0.0094$ ) increased in these

patients. Multivariate analyses revealed that low s-CD95L concentrations [ $< 516$  pg/mL, HR, 3.54; 95% confidence interval (CI), 1.13–11.11], and  $< 1,200$  activated CD8<sup>+</sup> (Granzyme B<sup>+</sup>) cells (HR, 2.63; 95% CI, 1.16–5.95) were independent poor prognostic factors for recurrence, whereas  $> 6,000$  CD3<sup>+</sup> cells (HR, 0.34; 95% CI, 0.15–0.79) was a good prognostic factor. Thus, low levels of s-CD95L ( $< 516$  pg/mL) are correlated with lower numbers of tumor-infiltrating lymphocytes (CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>, and also CD4 and FoxP3 T cells) in advanced HGSOC and are a poor prognostic marker.

**Implications:** Serum s-CD95L is correlated with a number of tumor-infiltrating immune cells in HGSOC and could be used as a noninvasive marker of tumor immune infiltration to select patients referred for immunotherapy trials that evaluate checkpoint inhibitor treatment.

### Introduction

Ovarian carcinoma is the seventh most common cancer in women and the eight most common cause of cancer-related death worldwide (1). At the time of diagnosis, the majority of patients

with epithelial ovarian cancer (EOC) present with advanced disease, which is characterized by a high and widespread tumor load in the peritoneal cavity, often accompanied by malignant ascites. Thus, the prognosis of women with ovarian cancer remains poor, with a 5-year overall survival (OS) rate estimated at  $< 45\%$  for all cancer stages, and only 20% to 30% for patients with Federation of Gynecologists and Obstetricians (FIGO) stage III or IV disease (1, 2).

Patients with EOC and other cancers who exhibit a robust immune response show increased survival rates (3). Recent studies show that number of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), which are lymphocytes that extravasate from blood vessels to access the tumor, may be a positive predictive factor for melanoma (4), colorectal cancer (5), esophageal carcinomas (6), breast cancer (7, 8), or endometrial cancer (9). The presence of TILs affects the outcome of ovarian cancer; high numbers of CD8<sup>+</sup> T cells in the immune infiltrate are associated with improved OS (10–15), particularly in patients with high grade serous ovarian carcinoma (HGSOC; refs. 16–18). In contrast, clinical outcome of ovarian cancers infiltrated by regulatory FoxP3<sup>+</sup> T cells (Tregs) remains unclear; studies suggest either decreased OS (19–21) or improved clinical outcomes (22–24). Furthermore, some works establish that ovarian cancer is often

<sup>1</sup>Centre Eugène Marquis, Rennes, France. <sup>2</sup>INSERM, UMR1242, COSS - Chemistry Oncogenesis Stress and Signaling, Rennes, France. <sup>3</sup>Department of Pathology, University Hospital of Rennes, Rennes, France. <sup>4</sup>Department of Gynecology, University Hospital of Rennes, Rennes, France. <sup>5</sup>Department of Biostatistics, University Hospital of Rennes, Rennes, France. <sup>6</sup>Centre de Ressources Biologiques, CHU de Rennes, Rennes, France. <sup>7</sup>Pathological Facility Platform, University of Rennes, Rennes, France.

**Note:** Supplementary data for this article are available at Molecular Cancer Research Online (<http://mcr.aacrjournals.org/>).

P. Legembre and V. Lavoué contributed equally to this article.

**Corresponding Author:** Vincent Lavoué, University of Rennes 1, Rennes 35000, France. Phone: 336-6398-8740; Fax: 332-9928-9766; E-mail: Vincent.lavoue@gmail.com

Mol Cancer Res 2019;17:2537–48

doi: 10.1158/1541-7786.MCR-19-0449

©2019 American Association for Cancer Research.

De La Motte Rouge et al.

accompanied by systemic immunosuppression (25, 26), which correlates with a poor prognosis (27, 28). New treatment strategies based on neutralizing antibodies that target checkpoint inhibitors represent a revolution in the fight against cancer; indeed, such treatments have shown survival benefits in patients with melanoma (29) or lung cancer (30). Therapeutic antibodies that block the PD1/PD-L1 checkpoint (such as nivolumab or pembrolizumab) or the CTLA4 checkpoint (such as ipilimumab) show therapeutic responses linked to tumor immune infiltration (31, 32). Phase II studies of anti-PD1/PD-L1 therapy in ovarian cancer suggest that it triggers antitumor responses (33–35); and, several phases III studies are underway. In such cases, a serum theranostic biomarker would be useful for selecting patients that are eligible for immunotherapy trials.

CD95L (also called FasL), which belongs to the TNF family, binds to the receptor CD95 (also known as Fas). Whereas CD95 is ubiquitously expressed, CD95L shows a more restricted expression pattern; it is expressed mainly on the membrane of lymphocytes, where it plays a pivotal role in eliminating infected and transformed cells (36). Binding of membrane bound CD95L to CD95 recruits the adaptor protein Fas Associated Death Domain (FADD; ref. 37), which in turn aggregates caspase-8 and caspase-10 to induce apoptosis (38). CD95L is also expressed by endothelial cells lining the blood vessels of patients with tumors and chronic inflammatory disorders (39–41). These CD95L-expressing endothelial cells seem to behave as a selective immune barrier, killing CD8 T cells while being permissive for Treg cells (41). CD95L can be cleaved by metalloproteases, thereby releasing soluble CD95L (s-CD95L) into the bloodstream. Binding of s-CD95L to CD95 fails to trigger cell death but rather induces a nonapoptotic signaling pathway that promotes the migration of T cells (42). Here, we wondered whether s-CD95L plays a role in ovarian cancer and examined its impact on the immune landscape in patients with HGSOV.

## Materials and Methods

### Cell lines and culture conditions

IGROV-1, OVCAR-3, OVCAR-8, and SKOV-3 cell lines were obtained from ATCC (LGC Standards) and were authenticated by short tandem repeat. Each month, routine testing was conducted on all cultured cells using the sensor-cell approach Plasmotest - Mycoplasma Detection Kit (InvivoGen). O170, O370, O386, and O829 cell lines were established in-house from primary solid tumor or carcinomatous samples cut into small pieces (<1 mm<sup>3</sup>) with a scalpel and then subjected to enzymatic digestion with collagenase (0.23 Wünsch units/ml; Liberase Research Grade; Roche). These in-house cell lines had more than 20 passages. All cell lines were cultured in DMEM complete medium supplemented with L-glutamine and 8% FBS. Cells were used within 6 months after resuscitation of frozen aliquots.

### Spheroid formation assays

Cells (1,000/well) were seeded in 96-well ultra-low attachment plates (Corning) and cultured for 7 days in serum-free culture medium (MammoCult Human Medium Kit, Stemcell Technologies) supplemented with heparin (Stemcell Technologies) and hydrocortisone (Stemcell Technologies). At day 7, the number of spheres per well was counted manually by taking five large field pictures of each well using a 4 × objective lens.

### Generation of cleaved CD95L

HEK/293T cells cultured in 1% FCS containing medium were transfected with 3 µg of empty plasmid or a wild-type CD95L-containing vector using the calcium/phosphate precipitation method. Medium containing s-CD95L and exosome-bound full-length CD95L was harvested 5 days after transfection. Dead cells and debris were removed by centrifugation (2 × 4,500 rpm/15 minutes). Exosomes were pelleted by ultracentrifugation at 100,000 × g for 2 hours. Finally, debris- and exosome-free supernatants were concentrated (Centricon; 10 kDa cutoff) and dialyzed against PBS.

### Western blot analysis

Cells were lysed for 30 minutes at 4°C in lysis buffer (25 mmol/L HEPES pH 7.4, 1% v/v Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EGTA supplemented with a mix of protease inhibitors; Sigma-Aldrich). Protein concentration was determined using the Bicinchoninic Acid Method (Pierce). Proteins were separated on an 8% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare). The membrane was blocked for 30 minutes with TBST (50 mmol/L Tris, 160 mmol/L NaCl, 0.05% v/v Tween 20, pH 7.8) containing 5% w/v dried skimmed milk or BSA and incubated overnight at 4°C with primary antibodies (mouse anti-E-Cadherin, clone 36, BD Pharmingen; mouse anti-Vimentin, clone V9, DAKO; and mouse anti-α-actin, clone AC-74, Sigma) diluted in the same buffer used for saturation (milk for anti-E-cadherin and anti-α-actin antibodies and BSA for anti-vimentin antibodies). The membrane was washed with TBST, followed by incubation for 1 hour with a peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (SouthernBiotech). Proteins were visualized using the enhanced Chemiluminescence Substrate Kit (GE Healthcare).

### Flow cytometry analysis

Cells were stained for 30 minutes at 4°C with anti-CD24 (clone ML5, BD Pharmingen), CD44 (clone G44-26, BD Pharmingen), and anti-CD95 (clone DX2, BD Pharmingen) mAbs. Isotype-matched murine fluorochrome-conjugated immunoglobulins (PE mouse IgG2a, APC mouse IgG2b, and PE mouse IgG1, respectively; BD Pharmingen) were used as negative controls.

### qRT-PCR

Total RNA was extracted from the cells using the NucleoSpin RNA Isolation Kit (Macherey-Nagel) and cDNA was generated from 1 µg of total RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quality and quantity of total RNA and cDNA was measured using a DS-11 Spectrophotometer (DeNovix). Expression of mRNA was measured using the TaqMan Gene Expression Assay Kit (Applied Biosystems), which contains primers and TaqMan MGB probes specific for the following genes: FAP1 (assay no: Hs00196632\_m1), ZEB1 (Hs00611018\_m1), ZEB2 (Hs00207691\_m1), CDH1 (Hs00170423\_m1), SNAIL (Hs00195591\_m1), TWIST1 (Hs01675818\_s1), and human GAPDH (Hs99999905\_m1; endogenous control). The probes targeting SLUG (ENST0000020945.3|ENSG0000019549.9) were designed using the Universal Probe Library's Assay Design Center Tool (Roche), and the forward (TGGTTGCTTCAAGGACACAT) and reverse (GCAAATGCTCTGTCAGTG) primers were purchased from Eurogentec. Expression of SLUG mRNA was measured using PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), with

human GAPDH used as an endogenous control. cDNA (50 ng) was used for each qPCR reaction. All qPCR experiments were performed in a QuantStudio5 Machine (Applied Biosystems) and the data were analyzed using Thermo Fisher Connect Software (Thermo Fisher Scientific). Relative expression of each gene was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method and expressed as a fold change.

#### Cell death assay

Cell viability was measured in an MTT assay. Briefly,  $4 \times 10^4$  cells were cultured for 24 hours in flat-bottom, 96-well plates along with the indicated concentrations of apoptosis inducer (final volume, 100  $\mu$ L). Next, 15  $\mu$ L MTT (5 mg/mL in PBS) solution was added and incubated at 37°C for 4 hours. Absorbance was measured using the Infinite F200 Pro (Tecan) at a wavelength of 570 nm.

#### Cell migration assay

To determine whether s-CD95L contributed to T-cell migration, T cells were exposed to s-CD95L or control medium in Boyden chambers. This migration assay was described previously (43). Briefly, to measure trans-endothelial migration of activated T cells, a 3- $\mu$ m sized porous membrane of a Boyden chamber was used. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were plated to form a monolayer mimicking endothelial barrier. Membranes were first hydrated in sterile PBS, then, CD3/CD28-activated peripheral blood lymphocytes (PBL) isolated from healthy donors ( $3 \times 10^5$  cells/300  $\mu$ L) were added to the top chamber covered with a monolayer of HUVEC in a low serum (1%) -containing RPMI. Bottom chamber contained 500  $\mu$ L of RPMI 1% FBS in presence or absence of s-CD95L (100 ng/mL). Cells were cultured in a CO<sub>2</sub> incubator at the same conditions as adherent cells for 24 hours. Transmigrated cells were then counted in the lower reservoir.

#### Patients

All clinical investigations were conducted in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Blood samples were collected from patients diagnosed with ovarian cancer after written informed consent was obtained. The study was approved by the local institutional review board (CEROG 2016-GYN-1003). Samples collected prospectively from patients diagnosed with ovarian cancer between January 2010 and December 2013 were reviewed retrospectively. All samples were obtained at the time of diagnosis and before chemotherapy treatment. A total of 51 patients with advanced stage ovarian cancer were analyzed: 37 with HGSOE, 6 with endometrioid subtype, 4 with mucinous subtype, 2 with clear cell subtype, and 2 with low grade serous ovarian cancer. Thirty-six patients received neoadjuvant chemotherapy after tumor sample plus interval debulking surgery, and 15 underwent primary debulking surgery followed by adjuvant chemotherapy. The surgical specimens were evaluated histologically at the Department of Pathology. All patients were staged according to the FIGO staging system (44). After surgery, all patients received standard chemotherapy comprising carboplatin plus paclitaxel. For this study, the main inclusion criterion was ovarian cancer with FIGO stage IIC and IV (i.e., carcinomatous stage or higher) and a serum sample in which the s-CD95L level before chemotherapy could be measured. Progression-free survival (PFS) was defined as the time from diagnosis of ovarian cancer to the time of recurrence or

death. OS was defined as the time from diagnosis of ovarian cancer to the time of death. Observation time was defined as the interval between diagnosis and time of last contact (death or last follow-up). Data were censored at death or at the last follow-up for patients without recurrence.

#### Measurement of s-CD95L by ELISA

S-CD95L concentrations in the serum of patients with HGSOE and healthy donors were measured by ELISA (Diaclone). All blood samples were harvested at the time of diagnosis.

#### Tissue specimens and IHC staining

Surgical specimens were fixed in 4% formalin, embedded in paraffin, and stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES). Sections from each histologic specimen were reviewed by two experienced pathologists (University Hospital, Rennes, France) to confirm the diagnosis and grade according to the method of Silverberg or Malpica (35). For each patient, a representative HES slide and the corresponding paraffin block were selected. The selected slide had to contain both tumor and adjacent stroma. The formalin-fixed, paraffin-embedded blocks were cut into 5- $\mu$ m slices and mounted on SuperFrost Plus Microscope Slides (Menzel-Gläser). Expression of CD3 (clone SP7; Thermo Fisher Scientific), CD4 (clone SP35; Cell Marque), CD8 (clone C8/144B; Dako) CD20 (clone L26; Dako), CD163 (clone 10D6; Leica), CD31 (clone JC70A; Dako), Podoplanin (clone D2-40; Invitrogen), FoxP3 (clone SP97; Eurobio Scientific), Granzyme B (clone GrB-7; Millipore), IL17 (clone bs-2140R; Bioss antibodies), and PD-L1 (clone E1L3N; Cell Signaling Technology) was assessed by IHC (Ventana Discovery XT automaton, Ventana Roche). CD95L (clone C247-4, BD Pharmingen) was immunostained manually. After deparaffinization with toluene and rehydration with ethanol, sections were incubated at 95°C and bathed in Tris-EDTA at pH 8 prior to staining for CD4, CD8, FoxP3, CD20, CD3, CD31, CD163, CCR6, and Granzyme B. For CD95L, sections were deparaffinized and rehydrated, incubated at 95°C, and immersed in EDTA (pH 9). For all preparations, endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 0.3% hydrogen peroxide. The reactivity of all antibodies, except CD95L, was revealed with a horseradish peroxidase (HRP)-labeled polymer-conjugated secondary antibody followed by diaminobenzidine (DAB; OmniMap DAB Roche). CD95L was revealed with an anti-mouse HRP-labeled polymer-conjugated secondary antibody followed by DAB (DAB Dako).

#### TIL count

According to the breast cancer guidelines (45) TILs can be subdivided according to their location within the tumor: (i) stromal TILs when located in the peritumoral space and (ii) intraepithelial TILs, when they have penetrated the tumor islets. These recommendations are for breast cancer, and yet, there is no standardized approach to evaluate TILs in EOC. Thus, to avoid a biased evaluation, we decided to perform a representative HES slide, which had to contain both tumor and adjacent stroma, to evaluate overall immune cells whatever their localization in tumor. Each immunostained slide was scanned with a NanoZoomer (Hamamatsu). For each patient, five large field pictures were taken using a 5 $\times$  objective lens and Hamamatsu's Software (NDPview). All fields were analyzed using NIS-Elements Software (Nikon) and positively stained cells were counted; for analysis, a specific threshold was applied for each antibody.

De La Motte Rouge et al.

**Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using SAS, v.9.4 (SAS Institute) and R logical Version 3.4.1 software programs. Quantitative results were expressed as the statistical mean  $\pm$  SD and qualitative results as percentages (%). The Mann-Whitney-Wilcoxon test was used to compare the distribution of quantitative variables between two groups (abnormal statistical distributions). The  $\chi^2$  or Fisher exact test was used to compare the distribution of qualitative variables between two groups with theoretical headcounts  $<5$ . The method of Contal and O'Quigley was used to determine cut-off values for the continuous variables used to examine prognosis (46). The correlation between TILs and levels of cleaved CD95L was assessed using Spearman correlation. The Kaplan-Meier method was used to compare survival curves between groups. All tests were two-sided and a  $P < 0.05$  was deemed significant.

**Ethical statement**

This study was agreed to by local institutional review board and French laws. All patients consented to participate.

**Results****Serum CD95L is a prognostic marker for HGSOc**

The clinical data and outcomes of our current HGSOc cohort match those of previously described cohorts (47, 48), indicating that, although the number of patients was relatively small the cohort is likely to be representative of larger HGSOc cohorts (Supplementary Table S1). In agreement with known clinical prognostic factors (2, 48, 49), univariate analysis identified involved lymph nodes (HR, 4.87; 95% CI, 1.67–14.16) and residual disease after surgery (HR, 5.74; 95% CI, 2.40–13.74) as clinical parameters significantly associated with disease-free survival (DFS) and OS (Table 3). Multivariate analysis revealed that residual disease after surgery (HR, 6.16; 95% CI, 2.27–16.67) correlated with recurrence rate (Table 4). Because we showed that serum CD95L is a poor prognosis marker in triple-negative breast cancer (INBC) women (26), we next investigated whether the concentration of serum CD95L in women with advanced ovarian cancer was associated with clinical outcome. Serum CD95L concentrations in patients with ovarian cancer showed a more heterogeneous distribution than in healthy donors (Fig. 1A), and there was no statistically significant difference between serum CD95L concentrations in patients with ovarian cancer and healthy subjects ( $234.6 \pm 28.1$  pg/mL vs.  $359 \pm 73.8$  pg/mL, respectively).

The Contal and O'Quigley method (46) revealed that a serum CD95L concentration of 516 pg/mL showed the strongest prognostic value for patients with HGSOc (Fig. 1C and E). We found that this cutoff failed to discriminate patients with long-term DFS from the whole population of patients with ovarian cancer (Fig. 1B). Nonetheless, for patients with HGSOc, this concentration discriminated poor responders from long-term survival patients (Fig. 1C). In agreement with this, the median concentration of s-CD95L in patients with DFS  $< 12$  months was significantly lower than that in patients with a DFS  $> 12$  months [236 (0–480) vs. 317 (0–738), respectively;  $P = 0.039$ ; Fig. 1D], and the OS of patients with serum CD95L concentrations  $> 516$  pg/mL was significantly longer than that of patients with a lower concentration (Fig. 1E). Furthermore, univariate analysis pointed out that s-CD95L concentrations

below 516 pg/mL were significantly correlated with node involvement (28% vs. 46%, respectively;  $P = 0.0409$ ; Table 1) and node involvement is strongly associated with tumor relapse (Table 3).

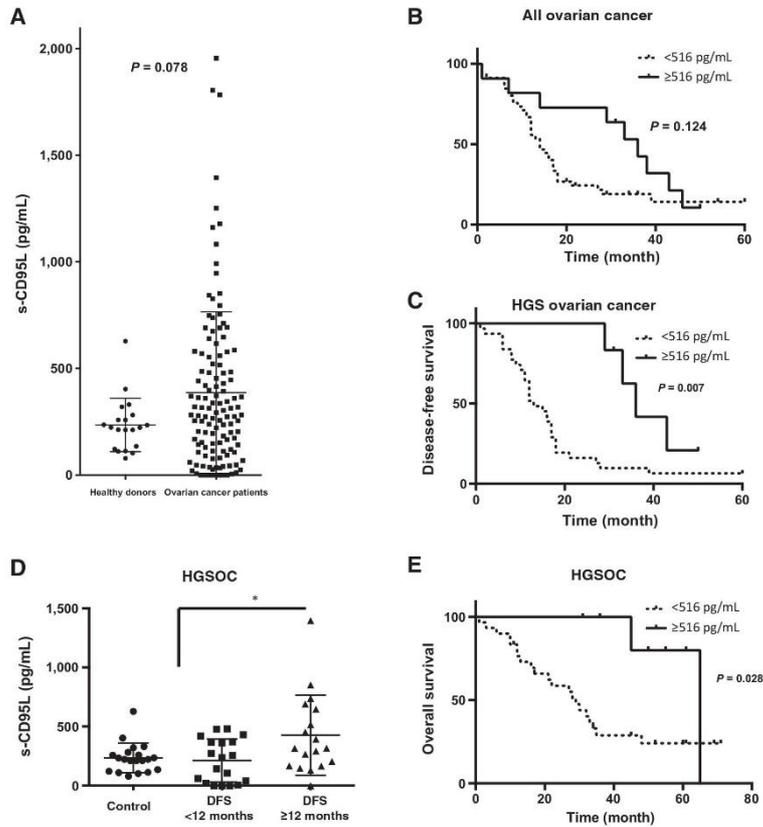
**s-CD95L does not affect survival or proliferation of tumor cells or their sensitivity to chemotherapy**

Because high concentrations of s-CD95L in patients with HGSOc were associated with a better clinical outcome, we asked whether this ligand had a direct effect on death, proliferation, and/or differentiation of ovarian cancer cells. CD95 can induce cell death upon binding to membrane-bound CD95L (m-CD95L; ref. 38). Therefore, we examined whether CD95L could kill ovarian cancer cells. All tested ovarian cancer cell lines (OVCAR-3, OVCAR-8, SKOV-3, and IGROV-1) and cells established from patients with HGSOc (O170, O370, O386, and O829) expressed CD95 (Supplementary Fig. S1A). These cells were classified as epithelial (OVCAR3, O370, O170, and O386) or mesenchymal (O829, IGROV1, SKOV-3, and OVCAR-8) cells based on the vimentin/cadherin ratio (Supplementary Fig. S1B). Using a high s-CD95L concentration (i.e., 100 ng/mL), we did not observe any cytotoxic effect of s-CD95L alone or in combination with doxorubicin and carboplatin chemotherapy drugs (Supplementary Fig. S2A and S2B).

Tumor heterogeneity is explained mainly by the hierarchical organization of tumor tissues, in which several subpopulations of self-renewing cancer stem cells (CSC) sustain the long-term oligoclonality of the neoplasm (50). Moreover, CSCs are thought to be the seeds required to establish distant metastasis, which is responsible for poor clinical outcome (51). Addition of s-CD95L, with or without chemotherapy agents, did not affect the number of ovarian CSCs, defined as CD24<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>+</sup> (Fig. 2A and C; Supplementary Fig. S2C). Moreover, neither the epithelial profile of OVCAR-3 nor the mesenchymal profile of OVCAR-8 varied in the presence of s-CD95L (Fig. 2B). Finally, in all tested ovarian cancer cells, the rate of proliferation did not change in the presence of s-CD95L (Supplementary Fig. S1D–S1F). Overall, these findings indicated that soluble CD95L has no effect on cell death, proliferation, or differentiation of ovarian cancer cells and does not enhance the antitumor effects of chemotherapeutic drugs. This leads to the hypothesis that s-CD95L may affect the tumor microenvironment, specifically the number/composition of immune tumor-infiltrating cells, in patients with HGSOc.

**m-CD95L is expressed on endothelial cells lining the blood vessels of HGSOc tumors**

CD95L is expressed by endothelial cells lining the vessels of some ovarian cancers (41). Therefore, we wondered whether this was also the case for HGSOcs. IHC analysis of tumor sections identified mCD95L in 29 (79.2%) patients, but not in 8 (20.8%). Using serial tumor slices, we validated that mCD95L was expressed by CD31-expressing endothelial cells (Fig. 3A), but not lymphatic endothelium (D2-40+). Interestingly, the intensity of m-CD95L expression in endothelial cells was correlated with the quantity of s-CD95L dosed in serum of these patients (Supplementary Fig. S3A and S3B). Of note (and unlike s-CD95L), we found no significant correlation between the intensity of staining for m-CD95L in tumor tissue and PFS or OS (Table 3), suggesting that metalloprotease-mediated release of s-CD95L in ovarian cancers could exert an important biological function that impacts prognosis.



**Figure 1.** Serum cleaved CD95L is increased in patients with HGSOC with better prognosis. **A**, Serum s-CD95L level in all ovarian cancer cohort compared with healthy donor. **B**, Kaplan-Meier analysis of patients with recurrence ovarian cancer with s-CD95L higher (thick line) or lower (dotted line) than 516 pg/mL. **C**, Kaplan-Meier analysis of recurrence in patients with HGSOC with cleaved CD95L higher (thick line) or lower (dotted line) than 516 pg/mL. **D**, Serum s-CD95L level according to DFS (< or >12 months) in patients with HGSOC; \*,  $P < 0.05$ . **E**, Kaplan-Meier analysis of OS in patients with HGSOC with cleaved CD95L higher (thick line) or lower (dotted line) than 516 pg/mL.

**m-CD95L and the immune landscape in HGSOC**

Next, because tumor-infiltrating immune cells (10, 11, 18) are associated with a good clinical outcome in HGSOC, we examined tissues for the presence of tumor-infiltrating T cells (CD3/CD4/CD8/Th17), B cells (CD20), and macrophages (CD163). The cytolytic activity of CD8<sup>+</sup> T cells was monitored by staining for Granzyme B. Checkpoint inhibitors are promising therapeutic regimens for patients with HGSOC; therefore, we also stained tissues for PD-L1. Although the intensity of CD3, CD8, CD4, CD20, and CD163 markers did not change regarding the staining of membrane CD95L in tumor tissues, transmembrane CD95L

expression was significantly associated with the number of tumor-infiltrating FoxP3 T cells (Table 2). This finding is in agreement with results published by Coukos and colleagues (41), who suggested that m-CD95L is a selective immune barrier; it killed CD8<sup>+</sup> cells but spared FoxP3-T cells. Nonetheless, we found no significant correlation between the intensity of m-CD95L staining and PFS or OS, indicating that unlike metalloprotease-cleaved s-CD95L, its membrane bound counterpart is not a prognostic marker for patients with HGSOC and that a yet unidentified metalloprotease plays a pivotal role in the disease progression. Because s-CD95L promotes T-cell trafficking in patients with

De La Motte Rouge et al.

**Table 1.** Clinical characteristics of patients with HGSOc according to a serum s-CD95L threshold of 516 pg/mL.

Variable(s) <sup>a</sup>	s-CD95L ≥516 pg/mL n = 7	s-CD95L <516 pg/mL n = 30	P
Age (years; mean ±SD)	65.1 ± 11.6	63.3 ± 11.0	0.6002
Menopause			
No	1 (14.3%)	1 (3.8%)	0.3845
Yes	6 (89.7%)	25 (96.2%)	
Missing data	0 (0%)	4 (7.7%)	
Ca125 level (U/ml; mean ± SD)	1,032 ± 1,036	4,155 ± 9,370	0.6399
FIGO stage			
IIc	7 (100.0%)	22 (73.3%)	0.4400
IV	0 (0%)	8 (26.7%)	
Nodes Involved			
Yes	2 (28.6%)	14 (46.7%)	0.0409
No	5 (71.4%)	7 (23.3%)	
Not removed	5 (20.8%)	9 (30.0%)	
BRCA gene mutation carrier			
No	2 (28.5%)	9 (30.0%)	0.4231
Yes	1 (14.2%)	1 (3.3%)	
Not known	4 (57.1%)	20 (66.6%)	
Neoadjuvant chemotherapy			
No	1 (14.2%)	9 (30.0%)	0.6471
Yes	6 (85.7%)	21 (70.0%)	
Residual disease after surgery			
No	7 (100.0%)	22 (73.3%)	0.3079
Yes	0 (0.8%)	8 (26.7%)	

NOTE: <sup>a</sup>, P < 0.05 in bold.  
Abbreviation: BRCA, breast cancer gene.

lupus (ref. 52; Supplementary Fig. S4C) and expression of matrix-metalloproteinase-7 (MMP7) is higher in these patients (53), MMP7 might be a good candidate for the metalloprotease involved in CD95L cleavage in HGSOc. Although the number of tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells did not correlate with the expression of m-CD95L, we found that the number of activated (GZB<sup>+</sup>) CD8<sup>+</sup> T cells was higher in tumor tissues with greater expression of m-CD95L (Supplementary Fig. S3C). Because m-CD95L levels were not associated with a good prognosis, but activated (GZB<sup>+</sup>) CD8<sup>+</sup> T cells were, this observation suggests immunosuppressive activity even in tumors showing high endothelial expression of m-CD95L.

#### S-CD95L and the immune landscape in HGSOc

Because high levels of serum s-CD95L are associated with a good prognosis in patients with HGSOc, we next investigated whether the concentration of s-CD95L was associated with the number of TILs. We observed that the concentration of s-CD95L was correlated with the number of tumor-infiltrating CD3<sup>+</sup> and CD4-expressing T cells (CD3:  $r = 0.4373$ ,  $P = 0.0068$ ; CD4:  $r = 0.3284$ ,  $P = 0.0472$ ; Supplementary Fig. S4A). Counterintuitively, the number of tumor-infiltrating Treg cells (FoxP3<sup>+</sup>) in patients with HGSOc also correlated with s-CD95L expression ( $r = 0.4584$ ,  $P = 0.0043$ ); in contrast, the number of infiltrating IL17-producing Th17 cells did not (Fig. 3B; Supplementary Fig. S4A). The number of B cells was associated significantly with the concentration of s-CD95L (Fig. 3B; Supplementary Fig. S4A). Finally, we found no correlation between s-CD95L levels and the number of tumor-infiltrating macrophages (CD163<sup>+</sup> cells; Fig. 3B; Supplementary Fig. S4A). Also, there was no correlation between s-CD95L and Granzyme B (a marker of CD8<sup>+</sup> T-cell activation) or PD-L1 (Fig. 3B; Supplementary Fig. S4A), suggesting that s-CD95L is not involved in tumor recruitment/activation of

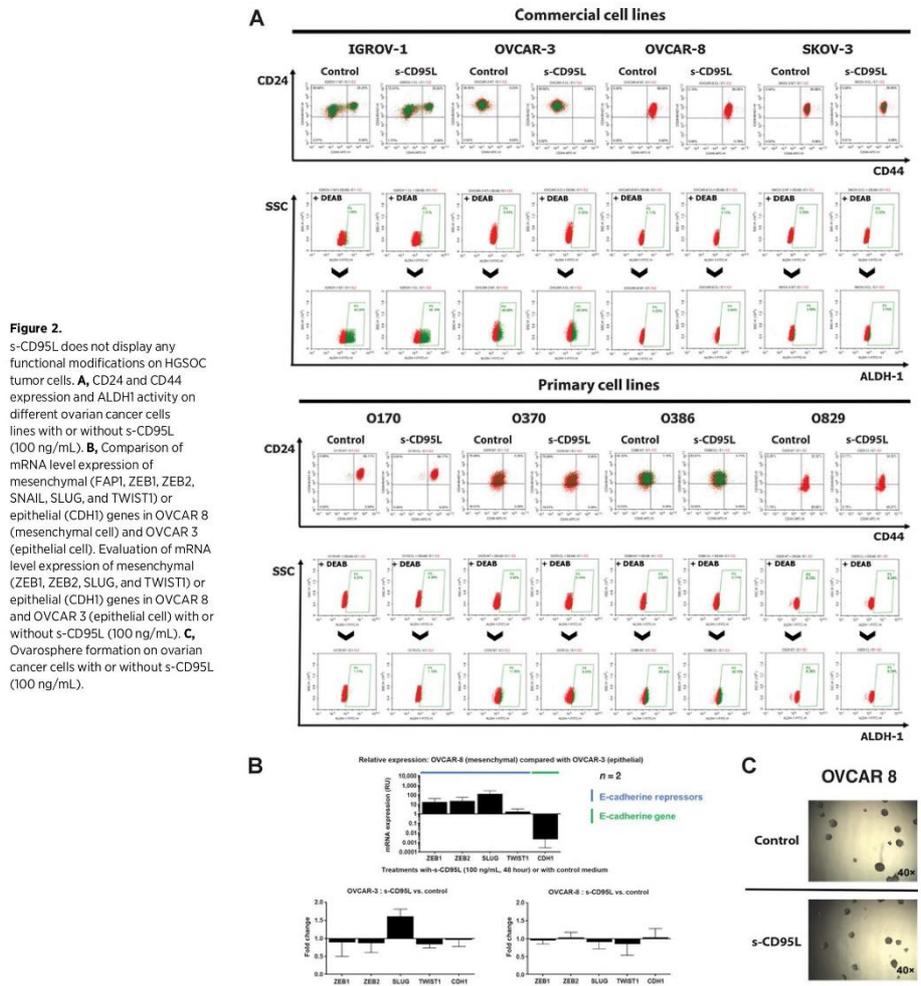
cytolytic CD8<sup>+</sup> T cells (GZB) or expression of PD-L1, which contributes to exhaustion of CD3<sup>+</sup> T cells.

Overall, these findings suggested that the chemoattractant s-CD95L increases recruitment of CD8<sup>+</sup> T cells and Treg cells, among the CD4<sup>+</sup> T cells, to HGSOc tumors, leading to an improved clinical outcome. Of note, we did not find any correlation between serum s-CD95L level and CD3<sup>+</sup> T-cell count in blood sample of patients with HGSOc (Supplementary Fig. S4B). To confirm that s-CD95L was able to promote cell motility of activated PBLs, we incubated CD3/CD28-activated PBLs in the presence or absence of s-CD95L and evaluated cell migration using Boyden chambers. As shown in Supplementary Fig. S4C, s-CD95L enhanced the migration of activated T cells.

High levels of serum CD95L (s-CD95L) is correlated with the number of tumor-infiltrating immune cells in high-grade serous ovarian cancer (HGSOc). These findings suggest that s-CD95L might be used as a noninvasive marker of tumor immune infiltration. This would avoid tumor biopsy, which is difficult when a patient has relapsed. Immune checkpoint inhibitors such as PD-1/PD-L1 or CTLA4 antibodies are more effective in tumors with immune infiltration. In future a personalized approach could be envisaged: after initial treatment, patients with HGSOc are tailored according to immune factors. Thus, s-CD95L as a surrogate of tumor immune infiltration could be used to select patients with HGSOc referred for immunotherapy trials. Patients with low s-CD95L levels may be more appropriately directed to clinical trials using molecular therapies.

## Discussion

Here, we show that patients with HGSOc with high levels of s-CD95L have a better prognosis than those with low levels. In addition, high s-CD95L levels correlate with increased numbers of tumor-infiltrating immune cells, including T cells (CD8<sup>+</sup> lymphocytes and Tregs) and B lymphocytes. These findings suggest that s-CD95L plays a role in regulating tumor immune responses in women with HGSOc and could therefore be a noninvasive marker of tumor immune infiltration. Such a marker would avoid the need for tumor biopsy, which is difficult when a patient has relapsed. Immune checkpoint modulators such as PD-1/PD-L1 or CTLA4 antibodies do not recruit lymphocytes, but break immunosuppression, which lead to restore cytotoxic T-cell activity. Indeed, PD-1/PD-L1 blockade is more effective in tumors with immune infiltration. PD-1/PD-L1 antibodies trigger objective tumor responses in only 20%–30% of patients with recurrent ovarian cancer (34, 35). So far, no biomarkers are associated strongly with high response rates, although PD-L1 expression on both tumor and immune cells can be used to select patients that are more likely to respond to PD1/PD-L1 treatment (34). However, a pathology sample is needed to assess these biomarkers. Moreover, due to the heterogeneous nature of cancer, such a sample may not reflect the disease. In future, a personalized approach could be envisaged: after initial treatment, patients with HGSOc are tailored according to expression of immune factors. Thus, s-CD95L, as a surrogate marker of tumor immune infiltration, could be proposed to select patients with HGSOc for immunotherapy trials: indeed, patients with high s-CD95L expression could be offered check point inhibitor treatment as a maintenance therapy, and patients with low s-CD95L expression may be more appropriately referred to clinical trials of chemotherapies. Nevertheless, a stronger efficiency of PD1/PD-



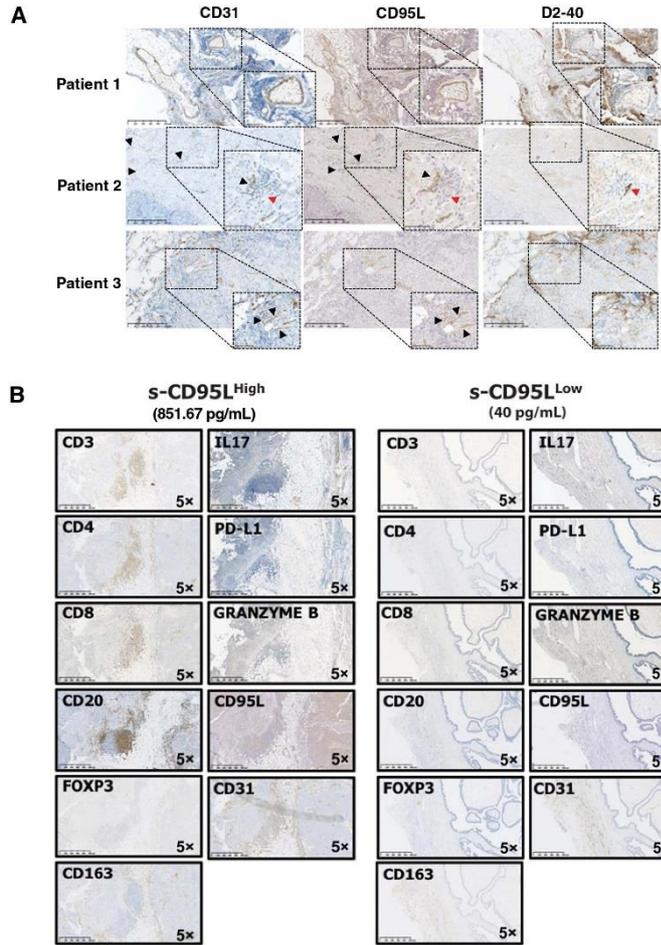
**Figure 2.** s-CD95L does not display any functional modifications on HGSOc tumor cells. **A**, CD24 and CD44 expression and ALDH1 activity on different ovarian cancer cell lines with or without s-CD95L (100 ng/mL). **B**, Comparison of mRNA level expression of mesenchymal (FAP1, ZEB1, ZEB2, SNAIL, SLUG, and TWIST1) or epithelial (CDH1) genes in OVCAR 8 (mesenchymal cell) and OVCAR 3 (epithelial cell). Evaluation of mRNA level expression of mesenchymal (ZEB1, ZEB2, SLUG, and TWIST1) or epithelial (CDH1) genes in OVCAR 8 and OVCAR 3 (epithelial cell) with or without s-CD95L (100 ng/mL). **C**, Ovariosphere formation on ovarian cancer cells with or without s-CD95L (100 ng/mL).

L1 checkpoint inhibitor has still to be demonstrated for patients with ovarian cancer with high infiltrate of immune cells as compared with women showing a low immune response. By now, the results of immunotherapy trials in ovarian cancer remain disappointing. Mesnage and colleagues showed that neoadjuvant chemotherapy increases tumor immune infiltration in some patients with HGSOc (49); thus s-CD95L as a marker of tumor immune infiltration may allow us to monitor immune responses during neoadjuvant chemotherapy, and to select patients for

immunotherapy when a strong tumor immune infiltrate is observed after neoadjuvant chemotherapy.

Although our data required an external validation with an independent cohort, one strength of this study is that we selected only patients with HGSOc and FIGO III and IV stage (i.e., carcinomatosis stage or tumor peritoneal spread), which avoids confusion with other subtypes of ovarian cancer harboring different molecular mutations (e.g., mucinous, endometrioid, or clear cell ovarian cancer) and showing different immune

De La Motte Rouge et al.



**Figure 3.** Concentrations of serum s-CD95L are associated with increased tumor-infiltrating immune cells. **A**, IHC staining analysis of consecutive sections of high grade serous ovarian cancer tissues stained with markers of blood (CD31<sup>+</sup>), or lymphatic endothelium (D2-40<sup>+</sup>) and CD95L. Black arrowheads depict a blood vessel (CD31 staining and CD95L staining) and red arrowheads depict immune cells near vessels (picture from 3 patients; data representative of 37 analyzed patients). **B**, IHC of immune cells in tumor sample of patient with HGSOC with high level of s-CD95L (851.57 pg/mL) and low level of s-CD95L (40 pg/mL).

responses (54, 55). Indeed, we observed no correlation between survival and s-CD95L levels in patients with HGSOC, mucinous, or endometrioid cancer. Furthermore, IHC experiments identified several types of immune cell in tumor tissue from these highly selected patients: Tregs (FoxP3 T cells), CD8 T cells, B cells (CD20 cells), and macrophages (CD163 cells). Zhang and colleagues showed a correlation between TIL numbers and OS and PFS (11), as did Tomsova and colleagues (13), Sato and colleagues (10), and others (56, 57). Nevertheless, these studies suffer from lack of immune cell markers and heterogeneity. A counter-intuitive result is the better prognosis in patients with higher rate of tumor-infiltrating Tregs (FoxP3 T cells). The magnitude of the immune

reaction including tumor-infiltrating CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and FosP3<sup>+</sup> T cells is associated with a better prognosis. Of note, in multivariate analysis, CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells remain independent parameters associated with a better survival, while FoxP3 T cells are not (Tables 4 and 5). It is also noteworthy that our IHC analysis fails to discriminate the different subsets of Tregs. Indeed, recent data showed that Tregs are heterogeneous, with five major structurally and genetically distinct cell subsets, each representing a stage of maturation with distinct functional capacities, which could be proinflammation or tolerance (58).

In other tumor models such as breast cancer, TILs can be subdivided according to their location within the tumor: stromal

**Table 2.** Tumor-infiltrating cell count in patients with HGSOc based on IHC analysis of CD95L expression

Variable(s)	Endothelial membrane CD95L expression (n = 29)	No membrane CD95L expression (n = 8)	P
s-CD95L serum level	358.20 ± 350.12	226.04 ± 205.28	0.4485
CD3	9,022.7 ± 7,832.4	9,945.1 ± 13,658	0.4277
CD4	3,841.0 ± 4,760.1	1,161.1 ± 935.65	0.1555
CD8	4,262.3 ± 5,955.5	4,187.9 ± 6,739.0	0.4719
CD20	2,766.7 ± 3,933.3	1,411.6 ± 2,610.8	0.1006
<b>FoxP3</b>	<b>717.62 ± 750.59</b>	<b>276.25 ± 353.65</b>	<b>0.0528</b>
CD163	8,809.8 ± 5,430.0	9,270.6 ± 7,968.3	0.5927
IL17	789.03 ± 937.34	545.25 ± 669.34	0.3660
PD-L1	904.41 ± 1360.1	527.63 ± 563.54	0.5927
<b>GRANZYMEB</b>	<b>1,722.6 ± 1,332.2</b>	<b>762.88 ± 794.99</b>	<b>0.0173</b>

NOTE: P &lt; 0.05 in bold.

TILs when located in the peritumoral space and intraepithelial TILs, when they have penetrated the tumor islets. This classification was widely used in breast cancer and is now recommended in clinical routine (45). Although these recommendations exist in breast cancer, there is no standardized approach to evaluate TILs in ovarian cancer. In this study, we decided to perform a representative HES slide, which had to contain both tumor and adjacent stroma, to evaluate overall immune cells whatever their localization in tumor. Nonetheless, it would be interesting to perform, in the future, additional studies to address whether a correlation exists between TIL distribution and m-CD95L expression or s-CD95L serum level. Because evaluation of tumor immune infiltration is difficult, the International Immunology Biomarkers Working Group advocates evaluating intra-tumor lymphocytes in ovarian carcinoma using standard staining methods such as HES. They suggest a semiquantitative evaluation of the area occupied by inflammatory mononuclear cells (lymphocytes and plasma cells, excluding polymorphonuclear cells; ref. 45). These recent recommendations suggest the need for a more reliable method of evaluating tumor immune infiltration and accordingly, we examined TILs in the recommended way using IHC. The serum concentration of s-CD95L may be a reproducible and simple tool for evaluating tumor immune

responses in patients with HGSOc. Furthermore, we found that s-CD95L is an independent prognostic factor of PFS in HGSOc (P = 0.0063). Patients with HGSOc with high level of s-CD95L show a good prognosis, which is opposite to that found for those with TNBC (59). This discrepancy may be due to differences in tumor load, disease history (metastasis for TNBC and carcinomatosis for HGSOc), and different roles played by s-CD95L. In TNBC, s-CD95L triggers a promotile signal in tumor cells, whereas in HGSOc it seems to contribute to the immune landscape through molecular mechanisms that remain to be elucidated.

Although we observed a correlation between expression of m-CD95L (assessed by IHC) in the tumor and serum s-CD95L levels in patients with HGSOc, the 8 patients lacking m-CD95L in the tumor still express s-CD95L in serum. This discrepancy could be due to intratumor heterogeneity; further studies are required to assess m-CD95L expression in a cohort from whom multiple biopsies are obtained from anatomically distinct sites. Another hypothesis could be that the membrane-bound ligand would already have been stripped from the endothelial cell surface.

Motz and colleagues showed that m-CD95L on endothelial cells in ovarian cancer selectively killed cytotoxic CD8 T

**Table 3.** Univariate analysis of risk of recurrence or death

Data	Risk of recurrence HR (95% CI)	P	Risk of death HR (95% CI)	P
Age > 65 years	1.03 (0.52–2.06)	0.9332	1.09 (0.52–2.06)	0.8419
Serum Ca125 level (U/ml) <1,200	0.89 (0.42–1.86)	0.7519	0.85 (0.35–2.56)	0.7321
Stage FIGO IV (vs. IIIc)	1.50 (0.63–3.56)	0.3583	1.97 (0.77–5.05)	0.2645
Involved nodes				
No	1	<b>0.0209</b>	1	<b>0.0072</b>
Yes	2.08 (0.90–4.82)		2.85 (0.90–9.00)	
Not removed	3.80 (1.48–9.75)		7.03 (2.05–24.12)	
Residual disease after surgery	5.74 (2.40–13.74)	<b>&lt;0.0001</b>	6.31 (2.40–13.74)	<b>0.0002</b>
Neoadjuvant chemotherapy	1.29 (0.60–3.74)	0.2937	2.69 (0.90–8.04)	0.0762
s-CD95L < 516 pg/mL	<b>3.44 (1.29–9.15)</b>	<b>0.0135</b>	<b>4.45 (1.03–19.10)</b>	<b>0.0449</b>
CD3 > 6,000	<b>0.32 (0.15–3.76)</b>	<b>0.0040</b>	0.28 (0.11–0.70)	<b>0.0061</b>
CD8 > 750	0.45 (0.20–1.01)	0.0532	<b>0.35 (0.37–1.68)</b>	<b>0.0242</b>
Granzyme B >1,200	1.62 (0.81–3.24)	0.1733	<b>2.52 (1.08–5.92)</b>	<b>0.0335</b>
CD4 > 803	0.51 (0.25–1.05)	0.0670	<b>0.42 (0.18–0.99)</b>	<b>0.0468</b>
IL17 > 740	1.58 (0.75–3.33)	0.2318	1.14 (0.47–2.81)	0.7687
Foxp3 > 700	0.46 (0.21–1.05)	0.0639	0.76 (0.31–1.86)	0.5506
CD163 > 5,500	0.56 (0.27–1.13)	0.1048	0.62 (0.27–1.43)	0.2577
PD-L1 > 1,000	0.36 (0.12–1.02)	0.0550	0.37 (0.09–1.60)	0.1858
CD20 > 1,060	<b>0.39 (0.19–0.82)</b>	<b>0.0134</b>	<b>0.33 (0.13–0.82)</b>	<b>0.0174</b>
Membrane CD95L expression	0.64 (0.31–1.89)	0.2842	0.56 (0.23–1.38)	0.2061

NOTE: P &lt; 0.05 in bold.

De La Motte Rouge et al.

**Table 4.** Multivariate analysis of risk of recurrence

Data	Risk of recurrence HR (95% CI)	P
Residual disease after surgery	<b>6.16 (2.27–16.67)</b>	<b>0.0003</b>
CD3 > 6,000	<b>0.34 (0.15–0.79)</b>	<b>0.0124</b>
Granzyme B <1,200	<b>2.63 (1.16–5.95)</b>	<b>0.0207</b>
s-CD95L <516 pg/mL	<b>3.54 (1.13–11.11)</b>	<b>0.0301</b>

NOTE:  $P < 0.05$  in bold.**Table 5.** Multivariate analysis of risk of death

Data	Risk of death HR (95% CI)	P
Residual disease after surgery	<b>9.99 (2.61–38.19)</b>	<b>0.0035</b>
CD3 > 6,000	<b>0.27 (0.10–0.71)</b>	<b>0.0082</b>
CD8 > 6,000	<b>0.33 (0.12–0.87)</b>	<b>0.0252</b>

NOTE:  $P < 0.05$  in bold.

lymphocytes, without affecting FoxP3<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes; they postulated that CD95L expression on tumor endothelial cells is a poor prognostic factor due to this mechanism, which generates a tolerogenic microenvironment (41). Our data suggest that the mechanism proposed by Motz and colleagues is not complete and that the CD95/CD95L system plays a more complex role in cancer. Indeed, we showed that s-CD95L is a good prognostic factor because it could contribute to drive antitumor immune responses; however, data obtained with m-CD95L confirm the results of Motz and colleagues, in that a higher number of FoxP3<sup>+</sup> T cells are accumulated in tumors of patients with endothelial expression of m-CD95L as compared with those in which CD95L is not detected. The metalloprotease that cleaves m-CD95L to generate s-CD95L is the missing link that prevents us from presenting a more complete overview of HGSOc prognosis based on the CD95/CD95L system. Nevertheless, our findings support the utility of s-CD95L as a biomarker for selecting patients with HGSOc for checkpoint inhibitor treatment trial.

#### Conclusion

Serum concentration of s-CD95L is associated with an increased number of tumor-infiltrating FoxP3<sup>+</sup> T cells and a better prognosis in women with HGSOc. s-CD95L levels correlate with

prognosis. An s-CD95L level > 516 pg/mL is a cut-off value for assessing tumor immune infiltration in patients with HGSOc and could be used to select patients for inclusion in clinical trials that evaluate checkpoint inhibitor treatment responses, such as inhibitors that block PD-1/PD-L1.

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

T. de La Motte Rouge is an advisor/consultant at Roche, AstraZeneca, Clovis Oncology, Tesaro, and has received speakers bureau honoraria from AstraZeneca and Tesaro. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

#### Authors' Contributions

**Conception and design:** T. de La Motte Rouge, J. Corné, P. Legembre, V. Lavoué  
**Development of methodology:** T. de La Motte Rouge, J. Corné, A. Cauchois, M. Le Boulch, C. Poupon, N. Rioux-Leclercq, V. Catros, J. Levéque, A. Fautrel, M. Le Gallo, V. Lavoué  
**Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.):** T. de La Motte Rouge, J. Corné, A. Cauchois, C. Poupon, S. Henno, E. Le Pabic, B. Laviolle, M. Le Gallo, P. Legembre, V. Lavoué  
**Writing, review, and/or revision of the manuscript:** T. de La Motte Rouge, M. Le Boulch, P. Legembre, V. Lavoué  
**Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases):** T. de La Motte Rouge, J. Corné, M. Le Boulch, B. Laviolle, V. Catros, J. Levéque, P. Legembre, V. Lavoué  
**Study supervision:** T. de La Motte Rouge, P. Legembre, V. Lavoué

#### Acknowledgments

The authors would like to thank Centre de ressources biologiques du CHU de Rennes, France and bioeditis for editing the article. The project was supported by La Vannetaise, Cancropole grand ouest (PLASTICO), INCA PLBIO, Ligue Contre le Cancer, Fondation ARC, and ANR PRCE.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received April 26, 2019; revised July 15, 2019; accepted September 10, 2019; published first September 19, 2019.

#### References

- Webb PM, Jordan SJ. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2017;41:3–14.
- Vergote I, Trope CG, Amant F, Kristensen GB, Ehlen T, Johnson N, et al. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 2010;363:943–53.
- Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013;39:1–10.
- Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996;77:1303–10.
- Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3<sup>+</sup> T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:186–92.
- Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res* 2001;61:3932–6.
- Seo AN, Lee HJ, Kim EJ, Kim HJ, Jang MH, Lee HE, et al. Tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *Br J Cancer* 2013;109:2705–13.
- Yamaguchi R, Tanaka M, Yano A, Tse GM, Yamaguchi M, Koura K, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are important pathologic predictors for neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Hum Pathol* 2012;43:1688–94.
- de Jong RA, Leffers N, Boezen HM, ten Hoor KA, van der Zee AG, Hollema H, et al. Presence of tumor-infiltrating lymphocytes is an independent prognostic factor in type I and II endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2009;114:105–10.
- Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8<sup>+</sup>/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:18538–43.
- Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348:203–13.
- Zhang S, Ke X, Zeng S, Wu M, Lou J, Wu L, et al. Analysis of CD8<sup>+</sup> Treg cells in patients with ovarian cancer: a possible mechanism for immune impairment. *Cell Mol Immunol* 2015;12:580–91.
- Tomsova M, Melichar B, Sedlakova I, Steiner I. Prognostic significance of CD3<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2008;108:415–20.

14. Stumpf M, Hasenburg A, Riener MO, Jütting U, Wang C, Shen Y, et al. Intraepithelial CD8-positive T lymphocytes predict survival for patients with serous stage III ovarian carcinomas: relevance of clonal selection of T lymphocytes. *Br J Cancer* 2009;101:1513–21.
15. Lavoue V, Thedrez A, Levesque J, Foucher F, Henno S, Jauffret V, et al. Immunity of human epithelial ovarian carcinoma: the paradigm of immune suppression in cancer. *J Transl Med* 2013;11:147.
16. Clarke B, Tinker AV, Lee CH, Subramanian S, van de Rijn M, Turbin D, et al. Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss. *Mod Pathol* 2009;22:393–402.
17. Townsend KN, Spowart JE, Huwatt H, Eshragh S, West NR, Elrick MA, et al. Markers of T cell infiltration and function associate with favorable outcome in vascularized high-grade serous ovarian carcinoma. *PLoS One* 2013;8:e82406.
18. Pinto MP, Balmaceda C, Bravo ML, Kato S, Villarroel A, Owen GI, et al. Patient inflammatory status and CD4+/CD8+ intraepithelial tumor lymphocyte infiltration are predictors of outcomes in high-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2018;151:10–7.
19. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10:942–9.
20. Hermans C, Anz D, Engel J, Kirchner T, Endres S, Mayr D. Analysis of FoxP3+ T-regulatory cells and CD8+ T-cells in ovarian carcinoma: location and tumor infiltration patterns are key prognostic markers. *PLoS One* 2014;9:e111757.
21. Kryczek I, Wei S, Zhu G, Myers L, Mottram P, Cheng P, et al. Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2007;67:8900–5.
22. Leffers N, Gooden MJ, de Jong RA, Hoogbeem BN, ten Hoor KA, Hollema H, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:449–59.
23. Milne K, Kobel M, Kalloger SE, Barnes RO, Gao D, Gilks CB, et al. Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. *PLoS One* 2009;4:e6412.
24. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol* 2018;19:40–50.
25. Baert T, Vergote I, Coosemans A. Ovarian cancer and the immune system. *Gynecol Oncol Rep* 2017;19:57–8.
26. Turner TB, Buchsbaum DJ, Straughn JM Jr, Randall ID, Arend RC. Ovarian cancer and the immune system - the role of targeted therapies. *Gynecol Oncol* 2016;142:349–56.
27. Huang QT, Zhou L, Zeng WJ, Ma QQ, Wang W, Zhong M, et al. Prognostic significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio in ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cell Physiol Biochem* 2017;41:2411–8.
28. Wang Y, Liu P, Xu Y, Zhang W, Tong L, Guo Z, et al. Preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts response to first-line platinum-based chemotherapy and prognosis in serous ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015;75:255–62.
29. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob JJ, Cowey CL, et al. Overall survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2017;377:1345–56.
30. Basak EA, Koolen SLW, Hurkmans DP, Schreurs MWJ, Bins S, Oomen-de Hoop E, et al. Correlation between nivolumab exposure and treatment outcomes in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2019;109:12–20.
31. Kim KH, Cho J, Ku BM, Koh J, Sun JM, Lee SH, et al. The first-week proliferative response of peripheral blood PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells predicts the response to anti-PD-1 therapy in solid tumors. *Clin Cancer Res* 2019;25:2144–54.
32. Riaz N, Havel JJ, Makarov V, Desrichard A, Urba WJ, Sims JS, et al. Tumor and microenvironment evolution during immunotherapy with nivolumab. *Cell* 2017;171:934–49.
33. Hamanishi J, Mandai M, Ikeda T, Minami M, Kawaguchi A, Murayama T, et al. Safety and antitumor activity of anti-PD-1 antibody, nivolumab, in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2015;33:4015–22.
34. Matulonis UA, Shapira-Frommer R, Santin A, Lisyskaya AS, Pignata S, Vergote I, et al. Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients with advanced recurrent ovarian cancer: Interim results from the phase 2 KEYNOTE-100 study. *J Clin Oncol* 2018;36:15s (suppl; abstr 5511).
35. Varga A, Pihl-Paul SA, Ott PA, Mehnert JM, Berton-Rigaud D, Morosky A, et al. Pembrolizumab in patients (pts) with PD-L1-positive (PD-L1+) advanced ovarian cancer: updated analysis of KEYNOTE-028. *J Clin Oncol* 2017;35:15s (suppl; abstr 5513).
36. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 2009;30:180–92.
37. Holler N, Tardivel A, Kovacs-Bankowski M, Hertig S, Gaide O, Martinon F, et al. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol* 2003;23:1428–40.
38. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Kramer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995;14:5579–88.
39. Kokkonen TS, Augustin MT, Kokkonen J, Karttunen R, Karttunen TJ. Serum and tissue CD23, IL-15, and FasL in cow's-milk protein-sensitive enteropathy and in coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:525–31.
40. Kokkonen TS, Karttunen TJ. Endothelial Fas-ligand in inflammatory bowel diseases and in acute appendicitis. *J Histochem Cytochem* 2015;63:931–42.
41. Motz GT, Santoro SP, Wang LP, Garrabrant T, Lastra RR, Hagemann IS, et al. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nat Med* 2014;20:607–15.
42. Tautz S, Chaigne-Delalande B, Selva E, Khadra N, Daburon S, Contin-Bordes C, et al. The naturally processed CD95L elicits a c-yes/calcium/P13K-driven cell migration pathway. *PLoS One* 2011;6:e100109.
43. Poissonnier A, Legembre P. Boyden chamber assay to study of cell migration induced by metalloprotease cleaved-CD95L. *Methods Mol Biol* 2017;1557:117–23.
44. Prat J. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet* 2014;124:1–5.
45. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, et al. Assessing tumor-infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immunooncology Biomarkers Working Group: part 1: assessing the host immune response, TILs in invasive breast carcinoma and ductal carcinoma in situ, metastatic tumor deposits and areas for further research. *Adv Anat Pathol* 2017;24:235–51.
46. Contal C, O'Quigley JQ J. An application of change point methods in studying the effect of age on survival in breast cancer. *Comput Stat Data Anal* 1999;30:252–70.
47. Roy M, Connor J, Al-Niaimi A, Rose SL, Mahajan A. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1A1) expression by immunohistochemistry is associated with chemo-refractoriness in patients with high-grade ovarian serous carcinoma. *Hum Pathol* 2018;73:1–6.
48. Luyckx M, Leblanc E, Filleron T, Morice P, Darai E, Classe JM, et al. Maximal cytoreduction in patients with FIGO stage IIIC to stage IV ovarian, fallopian, and peritoneal cancer in day-to-day practice: a retrospective French Multicentric Study. *Int J Gynecol Cancer* 2012;22:1337–43.
49. Cowan RA, Eriksson AGZ, Jaber SM, Zhou Q, Iasonos A, Zivanovic O, et al. A comparative analysis of prediction models for complete gross resection in secondary cytoreductive surgery for ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2017;145:230–5.
50. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* 2014;14:275–91.
51. Oskarsson T, Batlle E, Massague J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell* 2014;14:306–21.
52. Poissonnier A, Sanseau D, Le Gallo M, Malleter M, Levoin N, Viel R, et al. CD95-mediated calcium signaling promotes T helper 17 trafficking to inflamed organs in lupus-prone mice. *Immunity* 2016;45:209–23.

De La Motte Rouge et al.

53. Vira H, Pradhan V, Umare V, Chaudhary A, Rajadhyksha A, Nadkar M, et al. Role of MMP-7 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). *Lupus* 2017;26:937-43.
54. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011;474:609-15.
55. Barbarin A, Cayssials E, Jacomet F, Nunez NG, Basbous S, Lefevre L, et al. Phenotype of NK-like CD8(+) T cells with innate features in humans and their relevance in cancer diseases. *Front Immunol* 2017;8:316.
56. Barnett JC, Bean SM, Whitaker RS, Kondoh E, Baba T, Fujii S, et al. Ovarian cancer tumor infiltrating T-regulatory (T(reg)) cells are associated with a metastatic phenotype. *Gynecol Oncol* 2010;116:556-62.
57. Hagemann AR, Hagemann IS, Cadungog M, Hwang WT, Patel P, Lal P, et al. Tissue-based immune monitoring II: multiple tumor sites reveal immunologic homogeneity in serous ovarian carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2011;12:367-77.
58. Schiavon V, Duchez S, Branchtein M, How-Kit A, Cassius C, Daunay A, et al. Microenvironment tailors nTreg structure and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116:6298-307.
59. Malleter M, Tauzin S, Bessede A, Castellano R, Goubard A, Godey F, et al. CD95L cell surface cleavage triggers a prometastatic signaling pathway in triple-negative breast cancer. *Cancer Res* 2013;73:6711-21.

# Molecular Cancer Research

## Serum CD95L Level Correlates with Tumor Immune Infiltration and Is a Positive Prognostic Marker for Advanced High-Grade Serous Ovarian Cancer

Thibault De La Motte Rouge, Julien Corné, Aurélie Cauchois, et al.

*Mol Cancer Res* 2019;17:2537-2548. Published OnlineFirst September 19, 2019.

<b>Updated version</b>	Access the most recent version of this article at: <a href="https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0449">doi:10.1158/1541-7786.MCR-19-0449</a>
<b>Supplementary Material</b>	Access the most recent supplemental material at: <a href="http://mcr.aacrjournals.org/content/suppl/2019/09/19/1541-7786.MCR-19-0449.DC1">http://mcr.aacrjournals.org/content/suppl/2019/09/19/1541-7786.MCR-19-0449.DC1</a>

<b>Cited articles</b>	This article cites 59 articles, 10 of which you can access for free at: <a href="http://mcr.aacrjournals.org/content/17/12/2537.full#ref-list-1">http://mcr.aacrjournals.org/content/17/12/2537.full#ref-list-1</a>
-----------------------	--

<b>E-mail alerts</b>	<a href="#">Sign up to receive free email-alerts</a> related to this article or journal.
<b>Reprints and Subscriptions</b>	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at <a href="mailto:pubs@aacr.org">pubs@aacr.org</a> .
<b>Permissions</b>	To request permission to re-use all or part of this article, use this link <a href="http://mcr.aacrjournals.org/content/17/12/2537">http://mcr.aacrjournals.org/content/17/12/2537</a> . Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.

**Article 2 - le cycle congélation-décongélation des cellules de cancers du sein triple négatifs modifie les profils CD24 / CD44 des cellules tumorales et le pourcentage de cellules immunitaires infiltrant la tumeur. BMC Res Notes. 2018 Jun 20;11(1):401 (242)**

Introduction

Dans les cancers du sein triple négatifs, un niveau sérique élevé de CD95L est corrélé à un risque de rechute élevé (84). Pour étudier le rôle du système CD95/CD95L sur les cancers du sein triple négatifs, notamment sur l'infiltrat immunitaire et les cellules souches tumorales, nous avons proposé que des échantillons de tumeurs triple négatives prélevées chez des patientes au moment de la chirurgie soit dissociées puis analysées par cytométrie de flux à l'état frais notamment pour CD45+ (identification des cellules immunitaires) et CD45- CD24/CD44 (identification des cellules souches possédant une signature CD45-CD24<sup>Low</sup>CD44<sup>High</sup>). L'échantillon tumoral non utilisé était congelé selon des procédures standard et conservé à - 150°C.

Afin de vérifier si l'échantillon n'était pas modifié par la cryoconservation, nous avons procédé à une décongélation puis ré-analysé par cytométrie de flux (n=15 patientes) les cellules provenant des tumeurs dissociées. Au moment de la décongélation, il est noté 25% de cellules mortes, provenant principalement des cellules CD45- (cellules tumorales). La principale population de cellules affectée est celle CD45-CD24<sup>low</sup>CD44<sup>low</sup> avec pour conséquence un enrichissement en cellules CD24<sup>Low</sup>CD44<sup>High</sup>, correspondant aux cellules souches. Afin de vérifier si ces cellules étaient modifiées par la congélation, des procédures de culture cellulaire pour la culture de cellules sphéroïdes (isolement de cellules souches) ont été conduites à partir d'échantillon frais et congelé/décongelé pour 3 patientes, puis une analyse génomique transcriptomique réalisée sur les cellules tumorales et du microenvironnement. L'analyse de l'ontologie génétique a révélé que le processus de congélation / décongélation a conduit à la modification de l'expression de 274 gènes (fold change > 2, P <0,05); la plupart d'entre eux étaient associés à la transition épithéliale à mésenchymateuse (EMT), tissus morphogénèse et jonction et adhésion cellulaires. Parmi ceux-ci, 224 gènes (82%) considérablement sous exprimés dans les cellules issues de la congélation /décongélation par rapport à ceux issues des tumeurs fraîches. Ces résultats suggèrent que soit la cryoconservation épargne les cellules

souches présentant les plus profils mésenchymateux dédifférenciés ou favorise une reprogrammation de la transition épithéliale mésenchymateuse.

### Résultats et conclusion

Nous avons identifié un nouveau problème pour l'analyse de données issues d'échantillons de tumeurs congelées. Nos résultats suggèrent qu'il sera difficile d'identifier des signatures robustes transposables en routine clinique si elles sont mises au point après un processus de congélation/décongélation. Nous déconseillons fortement l'utilisation d'échantillon de tumeur congelés dissociés pour une caractérisation précise de la population cellulaire car la décongélation crée un déséquilibre dans la proportion de sous-populations de cellules immunitaires et tumorales. De plus, parce que les signatures transcriptomiques de mammosphères dérivées d'échantillons congelés / décongelés ne sont pas représentatives de celles issues des cellules souches prélevées à l'état frais, cela excluant leur utilisation pour l'identification de nouveaux facteurs pronostics et / ou cibles thérapeutiques. Nous suggérons fortement que les futures études impliquant des cellules tumorales dissociées soient effectuées uniquement sur des tumeurs fraîches, jusqu'à ce que soit développées par les biobanques tumorales des méthodes validées préservant l'hétérogénéité tumorale lors des processus de congélation/décongélation des cellules vivantes isolées de tumeurs réséquées.

### Contribution

L'auteur de la thèse a contribué à cette publication en participant à l'analyse des expériences et à la rédaction de l'article.

RESEARCH NOTE

Open Access



# Tumor analysis: freeze–thawing cycle of triple-negative breast cancer cells alters tumor CD24/CD44 profiles and the percentage of tumor-infiltrating immune cells

Matthieu Le Gallo<sup>1,2</sup>, Thibault de la Motte Rouge<sup>1,2</sup>, Amanda Poissonnier<sup>1,2,4</sup>, Vincent Lavoué<sup>1,2,3</sup>, Patrick Tas<sup>1,2,3</sup>, Jean Leveque<sup>1,2,3</sup>, Florence Godey<sup>1,2</sup> and Patrick Legembre<sup>1,2\*</sup>

## Abstract

**Objective:** The use of novel methods to characterize living tumor cells relies on well-conceived biobanks. Herein, we raised the question of whether the composition of fresh and freeze/thawed dissociated tumor samples is comparable in terms of quantitative and qualitative profiling.

**Results:** Breast cancer is a heterogeneous disease, encompassing luminal A and B, basal/triple-negative breast cancer (TNBC), and ERBB2-like tumors. We examined living cells dissociated from TNBC and found that a classical freeze/thaw protocol leads to a marked reduction in the number of CD45<sup>-</sup>CD44<sup>low</sup>CD24<sup>low</sup> tumor cells. This, in turn, changed the percentage of tumor cells with certain CD44/CD24 expression patterns and changed the percentage of tumor-infiltrating immune cells. These cryopreservation-driven alterations in cellular phenotype make it impossible to compare fresh and frozen samples from the same patient directly. Moreover, the freeze/thaw process changed the transcriptomic signatures of triple-negative cancer stem cells in such a manner that hierarchical clustering no longer ranked them according to expected inter-individual differences. Overall, this study suggests that all analyses of living tumor cells should be conducted only using freshly dissociated tumors if we are to generate a robust scoring system for prognostic/predictive markers.

**Keywords:** Triple negative breast cancer, Immune infiltrate, Living biobank, Frozen

## Introduction

Personalized medicine necessitates identification of biomarkers that are accurate, sensitive, and disease-specific. This is particularly true for cancer, which is a disease characterized by marked tumor heterogeneity. Although thousands of biomarkers have been described, few have translated successfully to the clinic. Biomarkers are crucial not only for tumor diagnosis and prognosis, but also for better stratification of patients, which reduces

concerns related to over-treatment of indolent cancers and under-treatment of aggressive cancers.

Among women, breast cancer is the most common cause of cancer, and the second leading cause of cancer death after lung cancer [1, 2]. Triple-negative breast cancer (TNBC) represents 15–20% of all breast cancer cases. It comprises a heterogeneous tumor subset that lacks expression of estrogen and progesterone receptors and does not overexpress HER2. As a group, TNBCs are aggressive and prognoses and clinical outcomes are poor [1]. The low percentage of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) [3] and accumulation of cancer stem cells (CSCs) [4] mean that TNBCs often show drug resistance, recurrence, and metastasis [5, 6]. Therefore, exhaustive characterization of tumor-infiltrating immune cells and

\*Correspondence: patrick.legembre@inserm.fr

<sup>1</sup> COSS (Chemistry Oncogenesis Stress Signaling)-UMR 1242, Inserm, Univ Rennes, CLCC Eugène Marquis, Rue Bataille Flandres Dunkerque, 35042 Rennes, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2018. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

tumor cell heterogeneity is crucial if we are to identify new prognostic and predictive biomarkers and therapeutic targets.

Most, if not all, genomic and proteomic studies are performed using flash-frozen tumor tissues; hopefully, such tissues will yield transcriptomic and/or protein signatures that can be used to develop a personalized medicine approach. However, the complexity and heterogeneity of TNBC tumors mean that clinicians have yet to achieve this goal. We hypothesized that the use of novel methods to exhaustively characterize dissociated and living tumor cells may move us a step closer. For instance, multiparameter flow cytometry (i.e., cyTOF, single cell sequencing) can reveal detailed signatures that are unique to cells inside a tumor (e.g., immune, stromal, and tumor cells) and, by so-doing, identify new markers associated with relapse, and/or targets for a new generation of therapeutic drugs. Accordingly, laboratories will come to rely on well-conceived biobanks to develop dissociated cancer tissues.

## Main text

### Methods and patients

#### Patients

Patients (n=15) were diagnosed and treated at the Centre Eugène Marquis between 2017 and 2018. None showed evidence of relapse at the time of diagnosis and none received chemotherapy, endocrine therapy, or radiation therapy prior to surgery. Treatment decisions and follow-up processes were based solely on international recommendations.

#### Tumor samples

Triple-negative breast tumors were collected by a pathologist after resection by a surgeon and immediately placed in RPMI medium. The dissociation process initiated within 2 h after surgical resection. Tumors were dissociated using the tumor dissociation kit (Human) (Miltenyi Biotec GmbH), which is optimized to deliver a high yield of tumor cells and TILs while preserving important cell surface epitopes. TNBC pieces were weighed and cut into small pieces (<2 mm<sup>3</sup>), which were then treated with dissociation kit (Human) in a gentleMACS Dissociator, according to the manufacturer's recommendations. Briefly, tumors were mechanically dissociated in the gentleMACS dissociator for 36 s and then incubated at 37 °C for 30 min under continuous rotation. Next, a cycle of mechanical–chemical–mechanical dissociation was performed and dissociated cells were resuspended in RPMI. Macroscopic pieces were removed using a Corning<sup>®</sup> cell strainer (70 μm). Tumor cells were then washed twice in RPMI (20 ml) and counted using a hemocytometer.

#### Flow cytometry

Tumor cells (50,000 cells) were suspended in PBS supplemented with 2% BSA, 2% FCS, and FcR block (Miltenyi Biotec GmbH) at 4 °C for 20 min. Cells were then stained for 30 min at 4 °C with anti-CD24 PE (clone ML5, BD Biosciences), anti-CD44 APC (clone G44-26, BD Biosciences), and anti-CD45 PE-Vio770 (clone 5B1, Miltenyi Biotec GmbH) antibodies. Isotypic antibodies were used as a control for each fluorochrome (obtained from the same manufacturers). Cells were then washed twice in PBS supplemented with 2% BSA and 2% FCS and resuspended in PBS. To assess cell viability, cells were incubated with 7-AAD (BD Biosciences) for 10 min prior to cytometry analysis. Data were acquired using a Novocyte cytometer (ACEA Biosciences) and analyzed using FlowJo or Novoexpress software.

#### Cryopreservation and storage

The freezing process was carried out using standardized freezing procedures, following the guidelines issued by the "Haute Autorité de Santé", the government agency regulating the French healthcare system, for human tissue and cell samples biobanking. Freshly dissociated tumor cells were frozen in 1 ml of human serum albumin (HSA) Vialebex<sup>®</sup> (LFB BIOMEDICAMENTS, Les Ullis, France) supplemented with 10% DMSO (Sigma Aldrich). Each vial contained 2–5 × 10<sup>6</sup> cells (depending on the tumor dissociation yield). Briefly, freshly dissociated cell pellets were resuspended in 500 μl of pre-cooled HSA. Then, 500 μl of pre-cooled HSA containing 20% DMSO solution was added drop by drop to the cell suspension. The suspension was then homogenized and transferred to a cryotube. To ensure a standardized and controlled rate of freezing (–1 °C/min), cryotubes were first placed in a CoolCell<sup>®</sup> LX Cell Freezing Container (BioCision) at –80 °C. After 24 h, cells were transferred to a freezer set at –150 °C. All freezers were monitored; no critical temperature variations were recorded during storage.

For thawing, cells were placed in a water bath at 37 °C and then transferred to RPMI (40 ml) at RT to allow complete thawing. After a second wash in 20 ml of RPMI, the cells were counted using a hemocytometer. Cell viability was assessed using Trypan Blue.

#### Generation of mammospheres

Matched freshly dissociated and thawed tumor cells from the same patient were treated in the same way. Cells (1.5 × 10<sup>6</sup>) were seeded in 2 ml of Mammocult medium (StemCell Technologies) supplemented with heparin (4 μg/ml; Stem Cell Technologies), hydrocortisone (480 ng/ml; Stem Cell Technologies), penicillin (100 units/ml), and streptomycin (100 μg/ml) (Gibco)

ultra-low binding 6-well plates (Corning). After 15 days at 37 °C/5% CO<sub>2</sub>, mammospheres were collected and passed through a cell strainer (40 μm) to separate suspended cells from mammospheres. Next, mammospheres were dissociated with trypsin/EDTA (0.05% trypsin; Gibco) for 5 min. Dissociated cells were washed twice in PBS and stained as described above. RNA extracted from mammospheres using the NucleoSpin RNA XS extraction kit (Macherey–Nagel), according to the manufacturer's recommendations.

#### Microarray analysis

RNA quality was assessed using an RNA6000 nano chip (Agilent). For each condition (fresh or freeze/thawed), 9 ng of RNA was reverse transcribed using the Ovation PicoSL WTA System V2 (Nugen, Leek, The Netherlands). Fragmented cDNAs were hybridized to GeneChip Human Gene 2.0 ST microarrays (Affymetrix), which were scanned by a GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix). Raw data and quality-control metrics were generated using Expression Console software (Affymetrix). Probes were mapped using Brainarray V23 CDF files (<http://brainarray.mbni.med.umich.edu/>) and normalized by robust multi-array averaging with R software. Statistical analyses were performed using the limma R package; genes showing a twofold change in expression and a P value of 0.05 were considered significant. Gene Ontology terms enrichment analyses were performed using the ToppGene Suite (Chen J, Bardes EE, Aronow BJ, Jegga AG 2009. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Research* <https://doi.org/10.1093/nar/gkp427>). Hierarchical clustering was performed using Morpheus Matrix visualization and analysis software (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>).

#### Accession numbers

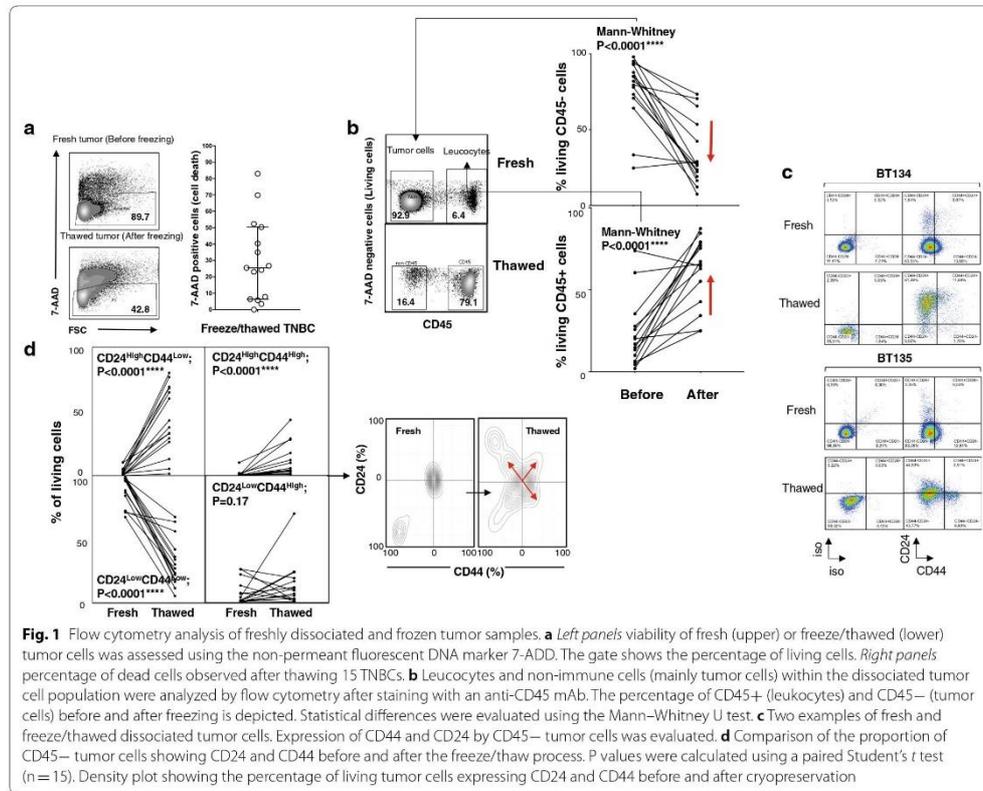
Raw and normalized data have been deposited to the GEO database accession ID GSE114359.

#### Results

We raised the question of whether the composition of fresh and freeze/thawed samples from the same patients was sufficiently similar in terms of quantitative and qualitative profiling and asked whether both could be used to investigate TILs (CD45-positive cells) and the phenotype (CD45<sup>neg</sup>CD24<sup>Low</sup>CD44<sup>High</sup>) of CSCs. To address this, we used multiparameter flow cytometry to compare the phenotypes of 15 freshly dissociated TNBCs and their matched cryopreserved counterparts. Briefly, to minimize mortality due to sample processing time, the pathologist collected samples in RPMI medium and the dissociation process was started within a maximum

of 120 min after surgical resection. Fresh TNBCs were dissociated using the Miltenyi Tumor dissociation kit (Human); 0.8 million cells were analyzed. In parallel, we cultured  $1.5 \times 10^6$  cells in serum-free medium in low-attachment plates to isolate spheroids, which are enriched in CSCs (see “Methods and patients” section). The remaining cells were frozen using a standardized procedure following the French “Haute Autorité de Santé” guidelines to biobanks and kept for 2 weeks in a freezer at –150 °C. The cells were then thawed and analyzed immediately by flow cytometry; spheroids were also generated. Total RNA was isolated from fresh and thawed spheroids and the transcriptomic signatures compared (see Additional file 1: Figure S1).

Cell viability was assessed by 7-AAD staining. The results showed that the freezing/thawing procedure for dissociated TNBC cells yielded 25.4% dead cells, with five dissociated tumor samples showing a drop in absolute numbers of 10% or less, and four tumors showing more than 50% dead cells (Fig. 1a) after thawing. The reasons for this were unknown since all samples were treated in a similar manner. Strikingly, most of the cells that died following the freezing/thawing process originated from the CD45<sup>–</sup> population (Fig. 1b), which in turn impacted the percentage of tumor-infiltrating leukocytes (i.e., CD45<sup>+</sup> cells; Fig. 1b). Of note, the percentage of tumor cells with a CD45<sup>–</sup>CD24<sup>Low</sup>CD44<sup>Low</sup> phenotype fell markedly after thawing (Fig. 1c, d). Two hypotheses may explain these losses: either these cells are highly sensitive to freezing/thawing, or they are reprogrammed to exhibit a different CD24/CD44 phenotype. The percentage of dead cells observed in Fig. 1a and the short delay between thawing and immunophenotyping are not compatible with the latter hypothesis, strongly suggesting that CD45<sup>–</sup>CD24<sup>Low</sup>CD44<sup>Low</sup> cells do not tolerate the freeze/thaw process well. Loss of this population resulted mainly in artificial enrichment of the CD24<sup>High</sup>CD44<sup>Low</sup> cell population and, albeit to a lesser extent, the CD24<sup>Low</sup>CD44<sup>High</sup> and CD24<sup>High</sup>CD44<sup>High</sup> populations (Fig. 1d). Because the CD24<sup>Low</sup>CD44<sup>High</sup> lineage was enriched after the freeze/thaw cycle, and this cell subset seems to correspond to stem/progenitor cancer cells [5, 6], we next wondered whether the transcriptomic signature of these enriched CSCs varied after the freezing/thawing process. To compare the transcriptome of CSCs derived from fresh and frozen samples, we used stringent cell culture procedures to culture spheroid cells. Compared with the bulk of dissociated tumor cells, spheroids were enriched for CD24<sup>Low</sup>CD44<sup>High</sup> cells (Fig. 2a). Next, we examined freshly dissociated TNBC cells from three different TNBC patients, along with the cells from the same patients frozen immediately after dissociation and cryopreserved for 15 days before thawing. Both sets of



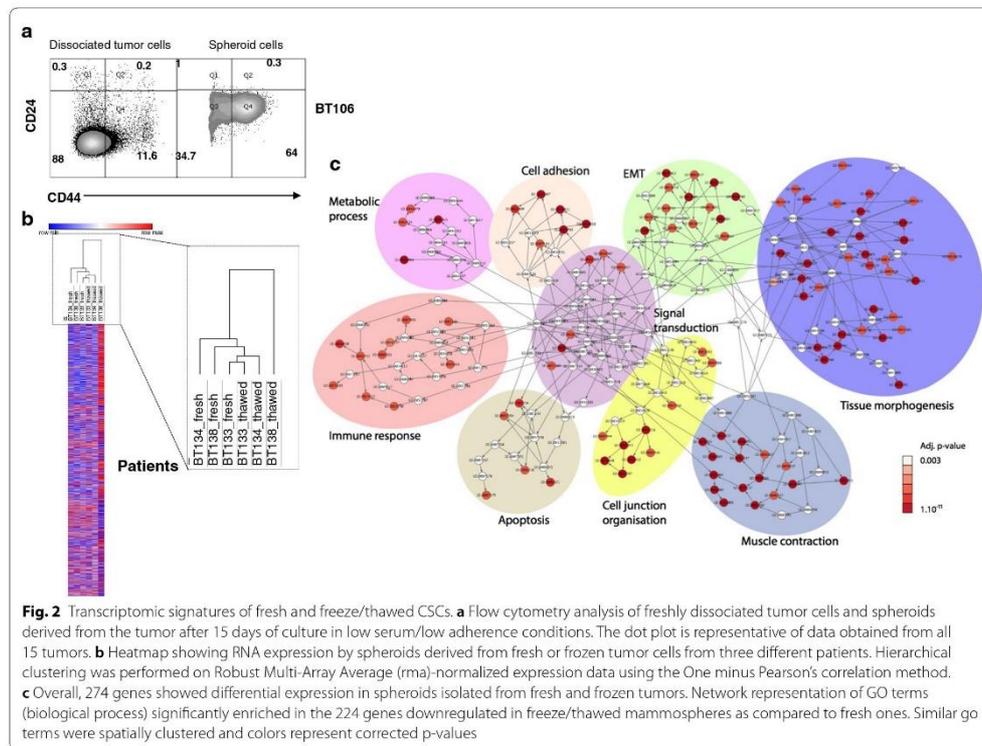
cells were cultured for 15 days in serum-free medium in low-adherence plates to select CSCs (CD44<sup>High</sup>CD24<sup>Low</sup>) and the transcriptomic signatures were compared (Fig. 2b). Unexpectedly, unsupervised hierarchical clustering of these tumor cells ranked tumors according to whether they had been subjected to freeze/thaw treatment and not according to their inter-individual differences; this shows that freeze/thawing the cells had a deleterious effect in their transcriptomic signatures. Gene Ontology terms enrichment analysis revealed that the freeze/thaw process drove deregulation of 274 genes (-fold change > 2, P < 0.05); most of these were associated to epithelial to mesenchymal transition (EMT), tissues morphogenesis and cell junction and adhesion (Fig. 2c). Of these, 224 genes (82%) in freeze/thaw spheroids were significantly down-regulated when compared with those in fresh spheroids (Table 1). Because these genes play a

role in organization of cell junctions and are lost during freeze/thaw of CSCs, we suggest that cryopreservation either spares breast cancer stem cells showing the most dedifferentiated mesenchymal profiles or favors EMT reprogramming (Fig. 2c and Additional file 2: Table S1).

### Discussion

Although one study did examine the impact of cryopreservation on gametes and embryos, this study appears to be the first to examine phenotypic changes caused by freeze/thawing living cells isolated from cancer patients [7].

Although molecular oncology has opened new avenues to classifying human cancers from a molecular standpoint, a number of issues associated with heterogeneous genomic platforms limit their ability to identifying signatures capable of predicting biological



behavior and/or identifying new molecular targets for more effective and less toxic therapeutic interventions [8]. We identified a novel issue using data meta-analysis based on profiling of fresh and frozen tumor samples; our findings suggest that it will be difficult to identify robust signatures transposable to patients if freeze/thawed dissociated cancer tissues are used.

We strongly discourage the use of frozen dissociated tumor sample for accurate cell population characterization, as thawing creates a disequilibrium in the proportion of immune and tumor cell subpopulations. In addition, because the transcriptomic signatures of mammospheres derived from frozen/thawed samples are not representative of those of initial CSCs, this study rules out their use for identification of new prognostic and/or therapeutic targets. We strongly suggest that future studies involving dissociated tumor cells

should be conducted using fresh tumors only; in parallel, tumor biobanks should develop validate methods of freezing living cells isolated from resected tumors that preserves tumor heterogeneity. In this way, we may be able to generate robust scoring systems for prognostic, predictive, and therapeutic markers. Such a system is an unmet clinical need with respect to patients with TNBC.

**Limitations**

Although, the freeze-thaw shock seems mainly to affect immune cells, a more detailed analysis would be required to further investigate whether some minor immune subsets could be affected by this stress and thereby, could also alter the conclusions drawn from analyses performed using freeze/thaw living cells.

**Table 1 Transcriptomic comparison between fresh TNBC cells and their freeze/thawed counterparts**

Probed	Gene name	logFC	FC	t	P value	Adj. P value	B	DESC	ENTREZID	ENSEMBL	BT133_fresh	BT138_fresh	BT133_thawed	BT138_thawed
10216_at	PRG4	2.97	7.81	2.57	0.04	0.85	-4.41	Proteoglycan 4	10216.00	ENSG00000116690	5.18	5.88	8.73	9.64
664613_at	MIR540A	2.46	5.48	4.28	0.00	0.85	-4.29	MicroRNA 540a	664613.00	ENSG00000207587	4.13	2.94	4.70	6.01
767568_at	SNORD113-8	2.42	5.35	2.56	0.04	0.85	-4.41	Small nuclear RNA, C/D box 113-8	767568.00	ENSG00000200367	3.96	3.09	4.14	7.91
407000_at	MIR218.1	2.31	4.95	2.71	0.03	0.85	-4.40	MicroRNA 218.1	407000.00	ENSG00000207732	4.05	3.62	4.19	5.86
102723604_at	LOC102723604	2.14	4.42	3.04	0.02	0.85	-4.37	Uncharacterized	102723604.00	ENSG00000258928	5.04	3.47	5.37	7.63
105369519_at	LOC105369519	2.08	4.22	2.52	0.04	0.85	-4.42	Uncharacterized	105369519.00	NA	2.96	3.41	3.78	7.19
2633_at	GBP1	2.06	4.17	2.62	0.04	0.85	-4.41	Guanylate binding protein 1	2633.00	ENSG00000117228	5.85	3.16	6.79	6.98
26822_at	SNORD14A	2.05	4.13	3.54	0.01	0.85	-4.33	Small nuclear RNA, C/D box 14A	26822.00	ENSG00000272034	5.95	3.94	4.02	6.68
767579_at	SNORD114-3	1.99	3.97	2.87	0.03	0.85	-4.38	Small nuclear RNA, C/D box 114-3	767579.00	ENSG00000201839	4.05	2.30	5.67	3.68
342908_at	ZNF404	1.78	3.44	4.01	0.01	0.85	-4.30	Zinc finger protein 404	342908.00	ENSG00000176222	5.56	5.29	7.18	7.07
107983995_at	NA	1.65	3.14	3.44	0.01	0.85	-4.34	NA	NA	NA	3.95	3.77	5.11	6.58
767606_at	SNORD114-26	1.64	3.11	3.43	0.01	0.85	-4.34	Small nuclear RNA, C/D box 114-26	767606.00	ENSG00000200413	3.98	2.44	5.02	4.20
664612_at	MIR539	1.57	2.98	3.38	0.01	0.85	-4.34	MicroRNA 539	664612.00	ENSG00000202560	7.15	7.17	7.77	8.84
54518_at	APBB1P	1.57	2.97	2.52	0.04	0.85	-4.42	Amphoid beta precursor protein binding family B member 1 interacting protein	54518.00	ENSG00000077420	6.12	3.54	6.29	6.39
100033820_at	SNORD116-28	1.53	2.88	2.46	0.05	0.85	-4.42	Small nuclear RNA, C/D box 116-28	100033820.00	ENSG000000278123	4.08	2.25	4.17	5.75
8404_at	SIPARCL1	1.48	2.78	2.65	0.04	0.85	-4.40	SPARC like 1	8404.00	ENSG00000152583	6.89	4.74	7.73	6.94
100289635_at	ZNF605	1.45	2.73	3.65	0.01	0.85	-4.32	Zinc finger protein 605	100289635.00	ENSG00000196458	6.09	4.60	7.06	6.86
105376805_at	LOC105376805	1.41	2.66	3.09	0.02	0.85	-4.36	Uncharacterized	105376805.00	ENSG00000238172	4.47	4.24	4.62	6.01
100728002_at	LOC100728002	1.41	2.66	2.52	0.04	0.85	-4.42	Uncharacterized	100728002.00	NA	3.36	3.72	4.18	4.11
158131_at	OR1Q1	1.36	2.57	2.49	0.05	0.85	-4.42	Olfactory receptor family 1 subfamily Q member 1	158131.00	ENSG00000165202	3.88	2.84	5.66	5.00
100616251_at	MIR1587	1.36	2.57	2.60	0.04	0.85	-4.41	MicroRNA 1587	100616251.00	ENSG00000263972	4.55	4.60	5.02	5.44
106481206_at	RNU6-94P	1.31	2.47	2.59	0.04	0.85	-4.41	RNA, U6 small nuclear 94, pseudogene	106481206.00	NA	3.97	3.61	5.37	3.82

**Table 1 (continued)**

Probed	Gene name	logFC	FC	t	P value	Adj. P val	B	DESC	ENTREZID	ENSEMBL	BT133_fresh	BT134_fresh	BT138_fresh	BT133_thawed	BT134_thawed	BT138_thawed
57562_at	CEP126	1.30	2.46	4.04	0.01	0.85	-4.30	Centrosomal protein 126	57562.00	ENSG00000110318	4.80	3.93	4.71	6.19	5.70	5.45
5170_at	PDRK1	1.29	2.44	2.47	0.05	0.85	-4.42	3-Phosphoinositide dependent protein kinase 1	5170.00	ENSG00000140992	4.17	3.49	3.67	6.09	5.04	4.07
26782_at	SNORD61	1.28	2.43	3.60	0.01	0.85	-4.33	Small nucleolar RNA, C/D box 61	26782.00	ENSG00000206979	2.63	2.18	3.34	3.57	4.13	4.28
26770_at	SNORD79	1.23	2.35	2.91	0.03	0.85	-4.38	Small nucleolar RNA, C/D box 79	26770.00	NA	5.33	4.32	5.01	6.87	5.94	5.55
90499_at	FAM95A	1.22	2.32	2.49	0.05	0.85	-4.42	Family with sequence similarity 95 member A	90499.00	NA	3.93	3.53	3.65	4.23	4.49	6.04
100126355_at	MIR365A	1.20	2.30	2.60	0.04	0.85	-4.41	MicroRNA 365a	100126355.00	ENSG00000199130	5.26	3.96	4.05	6.12	4.97	5.78
441728_at	LOC441728	1.20	2.29	3.29	0.02	0.85	-4.35	Golgin-like pseudo-gene	441728.00	NA	3.29	3.39	3.15	4.38	3.82	5.21
5228_at	PGF	1.19	2.28	2.78	0.03	0.85	-4.39	Placental growth factor	5228.00	ENSG00000119630	3.93	3.80	5.04	4.97	5.99	5.36
619564_at	SNORD72	1.17	2.24	3.08	0.02	0.85	-4.36	Small nucleolar RNA, C/D box 72	619564.00	ENSG00000212296	2.29	1.80	1.89	2.94	3.95	2.60
168667_at	BMPER	1.15	2.21	5.79	0.00	0.85	-4.24	BMP binding endothelial regulator	168667.00	ENSG00000164619	4.90	4.78	4.60	6.05	5.64	6.02
64853_at	AIDA	1.15	2.21	2.51	0.05	0.85	-4.42	Axin interactor, dorsalization associated	64853.00	ENSG00000186063	4.41	2.58	3.68	4.84	4.63	4.64
100462981_at	MTRNR2L2	1.15	2.21	2.64	0.04	0.85	-4.40	MT-RNR2, like 2	100462981.00	ENSG00000269028	2.95	2.61	3.15	3.89	3.31	4.95
100379296_at	RNY4P13	1.14	2.20	3.05	0.02	0.85	-4.37	RNA, Ro-associated Y4 pseudogene 13	100379296.00	NA	3.42	3.02	3.47	4.06	4.02	5.24
100873920_at	NHS-AS1	1.12	2.17	4.52	0.00	0.85	-4.28	NHS antisense RNA 1	100873920.00	ENSG00000230020	3.29	2.94	3.06	3.81	4.57	4.27
340527_at	NHSL2	1.11	2.16	3.27	0.02	0.85	-4.35	NHIS like 2	340527.00	ENSG00000204131	4.91	4.01	4.04	5.86	5.05	5.38
7857_at	SCG2	1.10	2.15	3.01	0.02	0.85	-4.37	Secretogranin II	7857.00	ENSG00000171951	4.11	3.41	4.48	5.64	4.83	4.84
503582_at	ARGFX	1.10	2.14	2.84	0.03	0.85	-4.39	Arginine-fifty homeobox	503582.00	ENSG00000186103	2.98	2.69	2.91	3.90	3.24	4.74
57494_at	MIR521-1	1.10	2.14	2.91	0.03	0.85	-4.38	MicroRNA 521-1	57494.00	ENSG00000207634	3.23	3.03	3.58	3.92	4.03	5.17
26022_at	TMLM98	1.08	2.12	4.33	0.00	0.85	-4.29	Transmembrane protein 98	26022.00	ENSG00000006042	4.10	3.42	3.55	4.73	4.57	5.03
343521_at	TCTEX1D4	1.08	2.11	5.33	0.00	0.85	-4.25	Tctex domain containing 4	343521.00	ENSG00000188396	4.98	4.86	4.69	5.83	6.19	5.73

**Table 1 (continued)**

Probed	Gene name	logFC	FC	t	P value	Adj. P value	B	DESC	ENTREZID	ENSEMBL	BT133_fresh	BT134_fresh	BT138_fresh	BT133_thawed	BT134_thawed	BT138_thawed
4919_at	ROR1	1.07	2.10	2.78	0.03	0.85	-4.39	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1	4919.00	ENSG00000185483	4.27	4.19	5.12	6.24	5.25	5.30
440910_at	LOC440910	1.07	2.09	5.58	0.00	0.85	-4.24	Uncharacterized LOC440910	440910.00	ENSG00000231431	4.11	3.73	3.77	5.05	4.78	4.98
105373893_at	LOC105373893	1.06	2.09	3.87	0.01	0.85	-4.31	Uncharacterized LOC105373893	105373893.00	NA	2.54	3.11	3.03	3.60	4.36	3.91
105375249_at	LOC105375249	1.06	2.08	2.92	0.03	0.85	-4.38	Uncharacterized LOC105375249	105375249.00	NA	3.06	2.60	2.85	3.12	4.33	4.23
84973_at	SNHG7	1.03	2.05	2.97	0.02	0.85	-4.37	Small nuclear RNA host gene 7	84973.00	ENSG00000233016	4.84	4.29	4.02	5.62	4.82	5.81
400728_at	FAH87B	1.03	2.04	3.33	0.02	0.85	-4.35	Family with sequence similarity 87 member B	400728.00	ENSG00000177757	4.65	4.11	4.01	5.48	4.76	5.63
283685_at	COLGAL2	1.03	2.04	2.49	0.05	0.85	-4.42	Golgin A6 family-like 2	283685.00	ENSG00000174450	4.22	4.06	4.06	4.52	4.84	6.07
9376_at	SLC22A8	1.01	2.02	3.32	0.02	0.85	-4.35	Solute carrier family 22 member 8	9376.00	ENSG00000149452	3.30	3.43	3.29	4.09	3.97	5.00
9787_at	DLGAP5	-1.00	-2.00	-2.86	0.04	0.85	-4.40	DLG associated protein 5	9787.00	ENSG00000126787	5.91	5.43	4.60	4.59	4.40	3.95
5709_at	PSWD3	-1.00	-2.00	-3.12	0.02	0.85	-4.36	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 3	5709.00	ENSG00000108344	6.23	6.90	7.03	5.88	6.05	5.23
5154_at	PDGFA	-1.00	-2.00	-3.42	0.01	0.85	-4.34	Platelet derived growth factor subunit A	5154.00	ENSG00000197461	5.01	6.02	5.81	4.54	4.60	4.69
163050_at	ZNF564	-1.00	-2.00	-3.74	0.01	0.85	-4.32	Zinc finger protein 564	163050.00	ENSG00000249709	5.69	6.30	6.20	4.67	5.30	5.22
7405_at	UVRAG	-1.00	-2.01	-2.59	0.04	0.85	-4.41	UV radiation resistance associated	7405.00	ENSG00000198382	6.49	7.01	7.35	6.44	6.17	5.23
283624_at	LINC00641	-1.01	-2.01	-3.15	0.02	0.85	-4.36	Long intergenic non-protein coding RNA 641	283624.00	ENSG00000258441	5.99	6.25	6.36	5.41	5.63	4.55
3931_at	LCAT	-1.01	-2.01	-5.27	0.00	0.85	-4.25	Lecithin-cholesterol acyltransferase	3931.00	ENSG00000213398	5.49	5.73	5.80	4.83	4.71	4.45
1318_at	SLC31A2	-1.01	-2.01	-2.96	0.02	0.85	-4.38	Solute carrier family 31 member 2	1318.00	ENSG00000138867	5.63	6.51	6.83	5.56	5.17	5.21
4771_at	NIF2	-1.01	-2.02	-2.70	0.03	0.85	-4.40	Neurofibromin 2	4771.00	ENSG00000186575	5.54	6.07	5.83	5.22	5.18	4.00
54947_at	LPCT2	-1.01	-2.02	-2.51	0.05	0.85	-4.42	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2	54947.00	ENSG00000087253	5.56	6.63	7.04	5.19	5.34	5.67
1978_at	EIF4EBP1	-1.01	-2.02	-2.98	0.02	0.85	-4.37	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	1978.00	ENSG00000187840	5.94	6.91	6.67	5.68	5.79	5.01
407043_at	MIR7-1	-1.02	-2.02	-3.21	0.02	0.85	-4.36	MicroRNA 7-1	407043.00	ENSG00000284179	4.77	5.46	5.67	4.54	3.86	4.46

Table 1 (continued)

Probed	Gene name	logFC	FC	t	P value	Adj. P value	B	DESC	ENTREZID	ENSEMBL	BT133_fresh	BT134_fresh	BT138_fresh	BT133_thawed	BT134_thawed	BT138_thawed
8893_at	EIF2B5	-1.02	-2.03	-2.44	0.05	0.85	-4.42	Eukaryotic translation initiation factor 2B subunit epsilon	8893.00	ENSG00000145191	6.73	7.46	6.76	6.48	6.28	5.13
205564_at	SENP5	-1.02	-2.03	-2.45	0.05	0.85	-4.42	SUMO1/sentrin specific peptidase 5	205564.00	ENSG00000119231	6.72	6.75	7.15	6.53	6.06	4.98
2305_at	FOXM1	-1.02	-2.03	-2.84	0.03	0.85	-4.39	Forkhead box M1	2305.00	ENSG00000112066	5.61	5.60	5.15	4.64	4.96	3.71
113263_at	GLCC1	-1.02	-2.03	-2.65	0.04	0.85	-4.40	Glucocorticoid induced 1	113263.00	ENSG00000106415	6.15	6.57	6.53	6.11	5.41	4.66
2030_at	SLC29A1	-1.03	-2.04	-2.60	0.04	0.85	-4.41	Solute carrier family 29 member 1 (Augustin blood group)	2030.00	ENSG00000112759	5.22	6.50	6.64	5.02	5.06	5.20
6660_at	SOX5	-1.03	-2.04	-4.88	0.00	0.85	-4.27	SRV-box 5	6660.00	ENSG00000134532	4.32	3.94	4.54	3.13	3.33	3.24
144100_at	PLEKHA7	-1.03	-2.04	-2.57	0.04	0.85	-4.41	Pleckstrin homology domain containing 7	144100.00	ENSG00000166689	3.85	5.38	4.81	3.67	3.85	3.44
23248_at	RPRD2	-1.03	-2.04	-2.45	0.05	0.85	-4.42	Regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 2	23248.00	ENSG00000163125	6.94	7.36	7.59	6.80	6.62	5.38
26273_at	FBXO3	-1.03	-2.05	-3.22	0.02	0.85	-4.35	F-box protein 3	26273.00	ENSG00000110429	5.28	6.10	6.40	5.06	4.69	4.94
57037_at	ANKMY2	-1.03	-2.05	-2.81	0.03	0.85	-4.39	Ankyrin repeat and MYND domain containing 2	57037.00	ENSG00000106524	5.45	6.12	5.33	5.19	4.55	4.06
9701_at	PPP6R2	-1.04	-2.05	-2.88	0.03	0.85	-4.38	Protein phosphatase 6 regulatory subunit 2	9701.00	ENSG00000100239	5.03	5.51	5.22	4.64	4.56	3.46
10564_at	ARHGTF2	-1.04	-2.05	-2.46	0.05	0.85	-4.42	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor 2	10564.00	ENSG00000124198	7.10	7.70	7.10	6.75	6.66	5.37
79005_at	SCNM1	-1.04	-2.06	-3.37	0.01	0.85	-4.34	Sodium channel modulator 1	79005.00	ENSG00000163156	4.53	4.80	5.40	4.27	3.81	3.54
6558_at	SLC12A2	-1.04	-2.06	-2.88	0.03	0.85	-4.38	Solute carrier family 12 member 2	6558.00	ENSG00000064651	7.47	8.24	7.42	7.15	6.77	6.09
37767_at	CAI3	-1.05	-2.06	-3.02	0.02	0.85	-4.37	Carbonic anhydrase 13	37767.00	ENSG00000185015	3.82	4.88	4.77	3.82	3.32	3.19
10678_at	B3GNT2	-1.05	-2.07	-5.23	0.00	0.85	-4.25	UDP-GlcNAc6S-beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2	10678.00	ENSG00000170340	6.95	7.17	7.39	6.29	5.94	6.15
6641_at	SNTB1	-1.05	-2.07	-2.91	0.03	0.85	-4.38	synaptobrevin 1	6641.00	ENSG00000172164	6.23	7.02	7.18	5.99	6.09	5.19
51050_at	P115	-1.06	-2.08	-3.28	0.02	0.85	-4.35	Peptidase inhibitor 15	51050.00	ENSG00000137558	4.70	3.74	3.81	2.77	2.96	3.35
222068_at	TIMED4	-1.06	-2.08	-2.62	0.04	0.85	-4.41	Transmembrane p24 trafficking protein-4	222068.00	ENSG00000158604	6.22	6.92	6.84	6.17	5.82	4.81

**Table 1 (continued)**

Probelid	Gene name	logFC	FC	t	P value	Adj. P val	B	DESC	ENTREZID	ENSEMBL	BT133_fresh	BT134_fresh	BT138_fresh	BT133_thawed	BT134_thawed	BT138_thawed
1719_at	DHER	-1.06	-2.08	-2.82	0.03	0.85	-4.39	Dihydrofolate reductase	1719.00	ENSG00000228716	4.72	5.34	5.88	4.73	4.22	3.81
51203_at	NUSAP1	-1.06	-2.09	-2.70	0.03	0.85	-4.40	Nucleolar and spindle associated protein 1	51203.00	ENSG00000137804	6.15	5.52	5.25	4.53	5.23	3.97
6217_at	RPS16	-1.06	-2.09	-2.75	0.03	0.85	-4.39	Ribosomal protein S16	6217.00	ENSG00000105193	8.53	9.00	9.28	8.50	7.94	7.17
28960_at	DCPS	-1.07	-2.10	-2.51	0.05	0.85	-4.42	Decapping enzyme, scavenger	28960.00	ENSG00000110063	5.10	6.58	5.59	4.75	5.06	4.25
9929_at	JOSD1	-1.07	-2.10	-2.52	0.04	0.85	-4.42	Josephin domain containing 1	9929.00	ENSG00000100221	6.81	7.41	7.05	6.93	5.64	5.48
54534_at	MRP150	-1.07	-2.10	-2.90	0.03	0.85	-4.38	Mitochondrial ribosomal protein L50	54534.00	ENSG00000136897	5.55	6.48	6.67	5.08	5.61	4.80
51706_at	CYB5R1	-1.08	-2.11	-2.67	0.04	0.85	-4.40	Cytochrome b5 reductase 1	51706.00	ENSG00000159348	5.42	5.82	6.36	4.62	5.51	4.24
6615_at	SNAIL	-1.08	-2.11	-4.82	0.00	0.85	-4.27	Snail family transcriptional repressor 1	6615.00	ENSG00000124216	5.55	5.85	5.80	4.36	4.62	4.99
1063_at	CENPF	-1.08	-2.12	-3.03	0.02	0.85	-4.37	Centromere protein F	1063.00	ENSG00000117724	7.15	6.27	6.93	5.82	6.15	5.12
5832_at	ALDH18A1	-1.08	-2.12	-2.73	0.03	0.85	-4.40	Aldehyde dehydrogenase 18 family member A1	5832.00	ENSG00000059573	6.94	7.26	7.20	6.51	6.48	5.16
116092_at	DNITTP1	-1.09	-2.12	-2.57	0.04	0.85	-4.41	Deoxynucleosyltransferase terminal interacting protein 1	116092.00	ENSG00000101457	5.89	6.68	6.59	5.61	5.82	4.47
6241_at	RRM2	-1.10	-2.14	-2.83	0.03	0.85	-4.39	Ribonucleotide reductase regulatory subunit M2	6241.00	ENSG00000171848	7.05	6.78	5.62	5.47	5.24	5.44
54764_at	ZRANB1	-1.10	-2.14	-3.01	0.02	0.85	-4.37	Zinc finger-RANBP2-type containing 1	54764.00	ENSG00000019995	7.41	8.66	7.86	7.18	6.91	6.54
50_at	AC02	-1.10	-2.14	-2.43	0.05	0.85	-4.43	Aconitase 2	50.00	ENSG00000100412	4.95	6.14	5.36	4.01	5.18	3.97
84546_at	SNORD358	-1.10	-2.15	-2.56	0.04	0.85	-4.41	Small nuclear RNA, C/D box 358	84546.00	ENSG00000200530	5.69	5.74	6.57	4.42	5.71	4.55
677845_at	SNORA79	-1.11	-2.15	-2.50	0.05	0.85	-4.42	Small nuclear RNA, H/ACA box 79	677845.00	ENSG00000221303	4.99	6.70	5.51	4.76	4.70	4.42
54700_at	RRN3	-1.11	-2.16	-2.52	0.04	0.85	-4.42	RRN3 homolog, RNA polymerase I transcription factor	54700.00	ENSG00000085771, ENSG00000278494	5.79	5.48	5.91	5.61	4.19	4.05
56907_at	SPIRE1	-1.11	-2.17	-3.21	0.02	0.85	-4.35	Spir-type actin nucleation factor 1	56907.00	ENSG00000134278	6.98	7.96	7.50	6.63	6.63	5.83
1739_at	DIG1	-1.11	-2.17	-3.42	0.01	0.85	-4.34	Disc large MAGUK scaffold protein 1	1739.00	ENSG0000005711	6.80	7.23	7.18	6.51	6.01	5.36
9991_at	PTBP3	-1.12	-2.17	-2.96	0.02	0.85	-4.38	Polypyrimidine tract binding protein 3	9991.00	ENSG000000119314	8.29	9.03	8.69	7.97	7.88	6.81

**Table 1 (continued)**

Probed	Gene name	logFC	FC	t	P value	Adj. P val	B	DESC	ENTREZID	ENSEMBL	BT133_fresh	BT134_fresh	BT138_fresh	BT133_thawed	BT134_thawed	BT138_thawed
54512_at	EXOSC4	-1.12	-2.17	-2.89	0.03	0.85	-4.38	Exosome component 4	54512.00	ENSG00000178896	6.25	7.39	6.94	5.57	6.31	5.35
56910_at	STARD7	-1.12	-2.17	-2.79	0.03	0.85	-4.39	StAR-related lipid transfer domain containing 7	56910.00	ENSG000000084090	8.17	8.42	9.00	7.59	7.98	6.66
5894_at	RAF1	-1.12	-2.17	-2.62	0.04	0.85	-4.41	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	5894.00	ENSG00000132155	7.08	7.18	7.55	6.44	6.79	5.22
3099_at	HK2	-1.12	-2.18	-2.80	0.03	0.85	-4.39	Hexokinase 2	3099.00	ENSG00000159399	6.52	7.97	7.18	6.28	6.31	5.72
1017_at	CDK2	-1.13	-2.18	-2.60	0.04	0.85	-4.41	Cyclin dependent kinase 2	1017.00	ENSG00000123374	6.47	7.67	7.78	5.95	6.73	5.86
9388_at	LIPG	-1.13	-2.19	-2.82	0.03	0.85	-4.39	Lipase G, endothelial type	9388.00	ENSG00000101670	4.66	6.09	5.53	4.62	4.32	3.94
100128398_at	LOC100128398	-1.14	-2.20	-2.82	0.03	0.85	-4.39	Uncharacterized LOC100128398	100128398.00	ENSG00000176593	4.70	4.73	5.99	4.23	4.13	3.65
8714_at	ABCC3	-1.14	-2.21	-2.45	0.05	0.85	-4.42	ATP binding cassette subfamily C member 3	8714.00	ENSG00000108846	6.34	7.36	7.00	6.03	6.39	4.86
64866_at	CDCP1	-1.15	-2.22	-2.46	0.05	0.85	-4.42	CUB domain containing protein 1	64866.00	ENSG00000163814	7.31	8.23	7.10	7.00	6.62	5.57
2673_at	GFPT1	-1.15	-2.23	-2.86	0.03	0.85	-4.38	Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1	2673.00	ENSG00000198380	7.65	8.48	7.99	7.48	7.05	6.13
6376_at	CX3CL1	-1.16	-2.23	-2.48	0.05	0.85	-4.42	C-X3-C motif chemokine ligand 1	6376.00	ENSG00000006210	5.36	6.55	6.82	4.74	5.71	4.81
116113_at	FOXP4	-1.16	-2.24	-3.51	0.01	0.85	-4.33	Forkhead box P4	116113.00	ENSG00000137166	5.23	6.44	5.95	4.53	4.84	4.78
203413_at	CTB3	-1.16	-2.24	-2.49	0.05	0.85	-4.42	Cancer/testis antigen 83	203413.00	ENSG00000204019	4.95	6.72	5.25	4.50	4.48	4.45
8503_at	PIK3R3	-1.17	-2.25	-2.52	0.04	0.85	-4.42	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3	8503.00	ENSG00000117461	6.13	7.36	5.60	5.48	5.17	4.93
29992_at	KDM2A	-1.17	-2.25	-2.51	0.04	0.85	-4.42	Lysine demethylase 2A	29992.00	ENSG00000173120	8.13	8.42	8.27	7.76	7.52	6.03
55707_at	NECAP2	-1.18	-2.26	-2.77	0.03	0.85	-4.39	NECAP endocytosis associated 2	55707.00	ENSG00000157191	5.93	6.96	7.07	5.21	6.14	5.08
55227_at	LRRIC1	-1.18	-2.26	-2.74	0.03	0.85	-4.39	Leucine rich repeat containing 1	55227.00	ENSG00000137269	3.60	5.28	4.36	3.44	3.21	3.05
8694_at	DGAT1	-1.19	-2.28	-2.63	0.04	0.85	-4.40	Diacylglycerol O-acyltransferase 1	8694.00	ENSG00000185000	5.46	6.59	7.05	5.26	5.54	4.74
64225_at	ATL2	-1.19	-2.28	-3.39	0.01	0.85	-4.34	Atlastin GTPase 2	64225.00	ENSG00000119787	5.73	6.75	6.41	5.31	5.42	4.61
6301_at	SARS	-1.19	-2.28	-2.62	0.04	0.85	-4.41	Seryl-RNA synthetase	6301.00	ENSG00000031698	6.58	6.90	7.30	6.15	6.30	4.76

**Table 1 (continued)**

Probed	Gene name	logFC	FC	t	P value	Adj. P value	B	DESC	ENTREZID	ENSEMBL	BT133_fresh	BT134_fresh	BT138_fresh	BT133_thawed	BT134_thawed	BT138_thawed
6536_at	SLC6A9	-1.19	-2.28	-3.92	0.01	0.85	-4.31	Solute carrier family 6 member 9	6536.00	ENSG00000196517	6.25	6.41	7.04	5.30	5.04	5.79
4494_at	MTIF	-1.19	-2.29	-2.61	0.04	0.85	-4.41	Metallothionein 1F	4494.00	ENSG00000198817	7.00	7.65	7.47	6.32	6.97	5.25
54069_at	MIS18A	-1.20	-2.29	-3.11	0.02	0.85	-4.36	MIS18 kinetochore protein A	54069.00	ENSG00000159055	6.46	7.26	6.78	6.34	5.50	5.06
139231_at	FAM199X	-1.20	-2.29	-4.94	0.00	0.85	-4.26	Family with sequence similarity 199, X-linked	139231.00	ENSG00000123575	6.30	6.70	6.83	5.73	5.35	5.14
81502_at	HMI13	-1.20	-2.30	-2.64	0.04	0.85	-4.40	Hitocompatibility minor 13	81502.00	ENSG00000101294	6.54	6.81	7.20	6.04	6.24	4.66
81875_at	ISG20L2	-1.20	-2.30	-2.49	0.05	0.85	-4.42	Interferon stimulated exonuclease gene 20 like 2	81875.00	ENSG00000143319	6.63	6.70	7.71	6.03	6.46	4.94
10040_at	TOM1L1	-1.22	-2.32	-2.98	0.02	0.85	-4.37	Target of mybl like 1 membrane trafficking protein	10040.00	ENSG00000141198	6.21	7.28	5.96	5.74	5.08	4.99
440138_at	ALG11	-1.22	-2.33	-2.47	0.05	0.85	-4.42	ALG11, alpha-1,2-mannosyltransferase	440138.00	ENSG00000253710	6.85	6.96	7.14	6.24	6.43	4.62
57669_at	EPB41L5	-1.22	-2.33	-3.05	0.02	0.85	-4.37	Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5	57669.00	ENSG00000115109	5.94	6.75	6.66	5.73	5.48	4.48
2120_at	ETV6	-1.23	-2.34	-2.75	0.03	0.85	-4.39	ETS variant 6	2120.00	ENSG00000138083	6.38	7.66	7.03	6.26	6.06	5.07
85461_at	TANC1	-1.24	-2.36	-2.81	0.03	0.85	-4.39	Tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1	85461.00	ENSG00000115183	6.36	7.37	6.29	5.86	5.76	4.69
127544_at	RNF198	-1.24	-2.36	-3.13	0.02	0.85	-4.36	Ring finger protein 198	127544.00	ENSG00000116514	5.77	6.76	6.27	5.32	5.44	4.33
8351_at	HIST1H3D	-1.24	-2.36	-2.71	0.03	0.85	-4.40	Histone cluster 1 H3 family member d	8351.00	ENSG00000197409	6.54	6.61	7.43	6.39	4.83	5.65
2762_at	GMDS	-1.25	-2.38	-2.97	0.02	0.85	-4.37	GDP-mannose 4/6-dehydratase	2762.00	ENSG00000112699	5.64	6.19	6.75	5.17	5.43	4.22
55298_at	RNF121	-1.25	-2.39	-2.52	0.04	0.85	-4.42	Ring finger protein 121	55298.00	ENSG00000137522	4.68	5.17	5.44	4.28	4.49	2.76
6805_at	STX3	-1.26	-2.39	-3.23	0.02	0.85	-4.35	Syntaxin 3	6809.00	ENSG00000166900	6.03	6.89	7.18	5.46	5.92	4.94
51514_at	DTL	-1.26	-2.39	-3.24	0.02	0.85	-4.35	Denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog	51514.00	ENSG00000143476	6.44	5.08	5.58	4.77	4.83	4.22
1905_at	SPFR3	-1.26	-2.40	-3.11	0.02	0.85	-4.36	Sphingosine-1-phosphate receptor 3	1903.00	ENSG00000213694	5.47	5.96	6.54	5.20	4.95	4.04
100288069_at	LOC100288069	-1.27	-2.40	-3.58	0.01	0.85	-4.33	Uncharacterized LOC100288069	100288069.00	NA	5.03	5.98	5.56	4.54	3.69	4.55

**Table 1 (continued)**

Probed	Gene name	logFC	FC	t	P value	Adj. P val	B	DESC	ENTREZID	ENSEMBL	BT133_fresh	BT134_fresh	BT138_fresh	BT133_thawed	BT134_thawed	BT138_thawed
221079_at	ARL5B	-1.27	-2.41	-2.86	0.03	0.85	-4.38	ADP ribosylation factor like GTPase 5B	221079.00	ENSG00000165997	6.61	8.07	7.89	6.46	6.53	5.78
72_at	ACTG2	-1.27	-2.41	-3.35	0.01	0.85	-4.35	Actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	72.00	ENSG00000163017	3.76	4.44	3.10	2.36	2.87	2.25
23636_at	NUP62	-1.27	-2.41	-2.97	0.02	0.85	-4.37	Nucleoporin 62	23636.00	ENSG00000213024	5.99	6.14	7.01	5.40	5.58	4.35
57154_at	SMURF1	-1.28	-2.43	-2.97	0.02	0.85	-4.37	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	57154.00	ENSG00000198742, ENSG00000284126	5.85	6.76	5.71	5.32	5.08	4.08
9055_at	PRCI	-1.28	-2.43	-4.05	0.01	0.85	-4.30	Protein regulator of cytokinesis 1	9055.00	ENSG00000198901	7.49	7.99	7.11	6.27	6.64	5.83
201475_at	RAB12	-1.28	-2.43	-2.88	0.03	0.85	-4.38	RAB12, member RAS oncogene family	201475.00	ENSG00000206418	7.79	8.27	7.74	6.98	7.29	5.68
11123_at	RCAN3	-1.30	-2.46	-2.97	0.02	0.85	-4.37	RCAN family member 3	11123.00	ENSG00000117602	5.67	7.23	6.70	5.67	5.10	4.94
10276_at	NET1	-1.30	-2.46	-3.19	0.02	0.85	-4.36	Neuroepithelial cell transforming 1	10276.00	ENSG00000173848	6.53	7.72	6.78	5.85	6.14	5.14
79065_at	ATG9A	-1.30	-2.47	-3.05	0.02	0.85	-4.37	Autophagy related 9A	79065.00	ENSG00000198925	6.34	7.11	7.46	5.94	6.12	4.93
890_at	CCNA2	-1.31	-2.47	-2.50	0.05	0.85	-4.42	cyclin A2	890.00	ENSG00000145386	6.91	6.72	5.52	5.40	5.63	4.20
10056658_at	OCLN	-1.31	-2.48	-3.25	0.02	0.85	-4.35	occludin	10056658.00	ENSG00000197822, ENSG00000273814	3.76	5.05	5.21	3.44	3.42	3.24
5209_at	PFKFB3	-1.31	-2.49	-2.46	0.05	0.85	-4.42	6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3	5209.00	ENSG00000170525	4.95	5.48	6.21	4.44	5.01	3.25
51361_at	HOOK1	-1.31	-2.49	-2.65	0.04	0.85	-4.40	Hook microtubule tethering protein 1	51361.00	ENSG00000134709	3.25	4.78	5.06	2.77	3.04	3.34
701_at	BUB1B	-1.32	-2.50	-5.79	0.00	0.85	-4.24	BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B	701.00	ENSG00000156970	6.46	6.40	5.91	5.01	4.70	5.10
85106_at	DNAJC14	-1.33	-2.52	-3.14	0.02	0.85	-4.36	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C14	85106.00	ENSG00000135392	5.91	6.24	6.27	5.19	5.38	3.85
6907_at	TBL1X	-1.34	-2.53	-3.73	0.01	0.85	-4.32	Transducin beta like 1 X-linked	6907.00	ENSG00000101849	4.83	5.79	4.97	4.30	3.90	3.38
3728_at	JLUP	-1.35	-2.54	-2.69	0.04	0.85	-4.40	Junction plakoglobin	3728.00	ENSG00000173801	5.39	7.24	6.88	4.82	5.41	5.25
7155_at	TOP2A	-1.35	-2.55	-2.47	0.05	0.85	-4.42	DNA topoisomerase II alpha	7155.00	ENSG00000131747	8.13	6.98	7.44	6.45	6.96	5.08
56888_at	KCMF1	-1.35	-2.56	-2.57	0.04	0.85	-4.41	Potassium channel modulatory factor 1	56888.00	ENSG00000176407	7.45	8.10	8.39	7.40	6.94	5.54

**Table 1 (continued)**

Probed	Gene name	logFC	FC	t	P value	Adj. P val	B	DESC	ENTREZID	ENSEMBL	BT133_fresh	BT134_fresh	BT138_fresh	BT138_fresh	BT133_thawed	BT134_thawed	BT138_thawed
112616_at	CMTM7	-1.35	-2.56	-2.58	0.04	0.85	-4.41	CK1F like MARVEL domain containing 7	112616.00	ENSG00000153551	5.31	7.09	6.28	4.46	5.58	4.57	
4318_at	MMP9	-1.36	-2.57	-2.86	0.03	0.85	-4.38	Matrix metalloproteinase 9	4318.00	ENSG00000100985	5.69	6.61	7.44	5.56	5.32	4.77	
57535_at	KIAA1324	-1.36	-2.57	-3.51	0.01	0.85	-4.33	KIAA1324	57535.00	ENSG00000116299	5.17	6.65	5.85	4.34	4.75	4.49	
57162_at	PELI1	-1.38	-2.60	-2.82	0.03	0.85	-4.39	Pellino E3 ubiquitin protein ligase 1	57162.00	ENSG00000197329	5.32	7.19	6.58	5.08	5.22	4.64	
9654_at	TTL4	-1.38	-2.60	-2.48	0.05	0.85	-4.42	Tubulin tyrosine ligase like 4	9654.00	ENSG00000135912	6.28	7.67	8.29	6.19	6.45	5.46	
493856_at	C15D2	-1.39	-2.61	-4.51	0.00	0.85	-4.28	CDGSH iron sulfur domain 2	493856.00	ENSG00000145354	6.53	7.52	7.37	6.00	5.65	5.61	
1857_at	DVL3	-1.39	-2.62	-2.90	0.03	0.85	-4.38	Disevelled segment polarity protein 3	1857.00	ENSG00000161202	7.03	8.07	7.79	6.77	6.66	5.30	
102723739_at	LOC102723739	-1.39	-2.63	-2.66	0.04	0.85	-4.40	Uncharacterized LOC102723739	102723739.00	NA	3.14	4.09	5.29	2.79	2.80	2.75	
91452_at	ACBD5	-1.40	-2.63	-2.44	0.05	0.85	-4.42	Acyl-CoA binding domain containing 5	91452.00	ENSG00000107897	5.59	7.02	5.87	5.24	5.35	3.71	
79622_at	SNRNP25	-1.41	-2.66	-3.19	0.02	0.85	-4.36	Small nuclear ribonucleoprotein U11/U12 subunit 25	79622.00	ENSG00000161981	5.44	6.73	6.20	4.54	5.39	4.20	
200634_at	KRTCAP3	-1.41	-2.66	-2.79	0.03	0.85	-4.39	Keratocyte associated protein 3	200634.00	ENSG00000157992	5.96	7.90	6.93	5.59	5.84	5.12	
6533_at	SLC6A6	-1.41	-2.66	-2.61	0.04	0.85	-4.41	Solute carrier family 6 member 6	6533.00	ENSG00000131389	6.44	7.15	8.29	5.87	6.50	5.28	
3419_at	IDH3A	-1.41	-2.67	-2.56	0.04	0.85	-4.41	Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD(+)) alpha	3419.00	ENSG00000166411	6.50	7.78	6.68	6.24	5.95	4.54	
85236_at	HIST1H2BK	-1.42	-2.67	-2.84	0.03	0.85	-4.39	Histone cluster 1 H2B family member K	85236.00	ENSG00000197903	8.26	7.61	8.77	7.17	7.39	5.83	
4133_at	MAP2	-1.42	-2.68	-2.67	0.04	0.85	-4.40	Microtubule associated protein 2	4133.00	ENSG00000078018	5.20	7.30	5.83	4.86	4.76	4.45	
10809_at	STARD10	-1.42	-2.68	-2.82	0.03	0.85	-4.39	STAR related lipid transfer domain containing 10	10809.00	ENSG00000214530	5.74	7.20	6.04	4.20	4.94	5.57	
440278_at	CATSPER2P1	-1.43	-2.70	-3.43	0.01	0.85	-4.34	Catlon channel sperm associated 2 pseudogene 1	440278.00	ENSG00000205771	4.41	5.58	4.78	4.17	3.16	3.15	
8985_at	PLOD3	-1.46	-2.74	-3.09	0.02	0.85	-4.36	Procollagen-lysine-2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	8985.00	ENSG00000106397	7.17	8.09	8.06	6.92	6.63	5.41	

**Table 1 (continued)**

Probed	Gene name	logFC	FC	t	P value	Adj. P val	B	DESC	ENTREZID	ENSEMBL	BT133_fresh	BT134_fresh	BT138_fresh	BT133_thawed	BT134_thawed	BT138_thawed
7978_at	MTERF1	-1.46	-2.74	-3.13	0.02	0.85	-4.36	Mitochondrial transcription termination factor 1	7978.00	ENSG00000127989	5.75	5.78	5.99	4.98	3.31	4.87
146223_at	CWITM4	-1.47	-2.78	-4.22	0.01	0.85	-4.29	CKLF like MARVEL transmembrane domain containing 4	146223.00	ENSG00000183723	6.79	7.29	6.90	5.74	6.00	4.82
64426_at	SUDS3	-1.48	-2.78	-3.91	0.01	0.85	-4.31	SDS3 homolog, SINGA corepressor complex component	64426.00	ENSG00000111707	5.36	5.85	6.04	4.52	4.77	3.53
57530_at	CGN	-1.48	-2.79	-2.47	0.05	0.85	-4.42	Cingulin	57530.00	ENSG00000143375	3.80	5.94	5.36	2.96	4.09	3.61
6271_at	S100A1	-1.48	-2.79	-2.43	0.05	0.85	-4.42	S100 calcium binding protein A1	6271.00	ENSG00000160678	4.99	7.06	7.09	4.48	4.99	5.24
375035_at	SFT2D2	-1.49	-2.81	-2.72	0.03	0.85	-4.40	SFT2 domain containing 2	375035.00	ENSG00000213064	8.02	8.63	9.94	7.04	8.03	7.05
158586_at	ZXDB	-1.50	-2.82	-2.98	0.02	0.85	-4.37	Zinc finger, X-linked, duplicated B	158586.00	ENSG00000198455	6.61	7.35	6.90	6.50	5.24	4.62
9568_at	SLC9A3R1	-1.50	-2.82	-3.06	0.02	0.85	-4.37	SLC9A3 regulator 1	9568.00	ENSG00000109062	6.51	8.26	7.59	5.91	6.44	5.52
6396_at	SLECTM1	-1.50	-2.83	-2.51	0.04	0.85	-4.42	Secreted and transmembrane 1	6396.00	ENSG00000141574	5.80	6.88	8.25	5.56	5.25	5.61
1717_at	DHCR7	-1.51	-2.84	-2.91	0.03	0.85	-4.38	7-Dehydrocholesterol reductase	1717.00	ENSG00000172893	6.16	8.01	7.10	6.15	5.50	5.10
7097_at	TLR2	-1.51	-2.84	-3.05	0.02	0.85	-4.37	Toll like receptor 2	7097.00	ENSG00000137462	5.32	6.65	6.31	3.74	5.13	4.89
94039_at	ZNF101	-1.53	-2.90	-2.44	0.05	0.85	-4.42	Zinc finger protein 101	94039.00	ENSG00000181896	4.28	6.82	5.07	3.94	3.99	3.64
22974_at	TPX2	-1.54	-2.91	-3.85	0.01	0.85	-4.31	TPX2, microtubule nucleation factor	22974.00	ENSG00000088325	6.77	6.86	6.44	5.59	5.59	4.27
1838_at	DTNB	-1.55	-2.92	-3.70	0.01	0.85	-4.32	Dystrobrein beta	1838.00	ENSG00000138101	4.93	5.76	6.59	4.31	4.17	4.17
51176_at	LEF1	-1.55	-2.92	-3.59	0.01	0.85	-4.33	Lymphoid enhancer binding factor 1	51176.00	ENSG00000138795	4.60	4.50	5.54	4.01	2.71	3.28
10207_at	PATJ	-1.55	-2.94	-3.54	0.01	0.85	-4.33	PATJ, crumbs cell polarity complex component	10207.00	ENSG00000132849	5.44	7.03	6.29	5.14	4.59	4.38
29028_at	AIAD2	-1.56	-2.95	-3.11	0.02	0.85	-4.36	AI-Pase family, AAA domain containing 2	29028.00	ENSG00000156802	6.59	6.84	6.37	5.91	5.26	3.94
4301_at	AFDN	-1.58	-2.99	-3.08	0.02	0.85	-4.37	Afadin, adherens junction formation factor	4301.00	ENSG00000130396	7.28	8.54	7.96	6.92	6.74	5.38
3838_at	KPNA2	-1.58	-2.99	-2.62	0.04	0.85	-4.41	Karyopherin subunit alpha 2	3838.00	ENSG00000182481	7.53	7.88	7.85	7.19	6.54	4.78

**Table 1 (continued)**

Probed	Gene name	logFC	FC	t	P value	Adj. P value	B	DESC	ENTREZID	ENSEMBL	BT133_fresh	BT134_fresh	BT138_fresh	BT133_thawed	BT134_thawed	BT138_thawed
79837_at	PIP4K2C	-1.58	-2.99	-2.43	0.05	0.85	-4.42	Phosphatidylinositol-4-kinase type 2 gamma	79837.00	ENSG00000166908	5.02	7.63	6.73	4.54	5.18	4.91
3691_at	ITGB4	-1.59	-3.01	-3.59	0.01	0.85	-4.33	Integrin subunit beta 4	3691.00	ENSG00000132470	4.89	6.44	6.02	3.86	4.64	4.08
8342_at	HST1P2BM	-1.59	-3.02	-7.74	0.00	0.85	-4.21	Histone cluster 1 H2B family member m	8342.00	ENSG00000273703	6.08	6.15	6.49	4.88	4.55	4.50
1317_at	SLC31A1	-1.60	-3.03	-2.62	0.04	0.85	-4.41	Solute carrier family 31 member 1	1317.00	ENSG00000136868	7.61	8.97	8.40	7.02	7.62	5.54
360019_at	KRT18P10	-1.61	-3.05	-3.19	0.02	0.85	-4.36	Keratin 18 pseudogene 10	360019.00	NA	3.49	5.09	3.33	2.02	2.32	2.73
388564_at	TMLH238	-1.62	-3.07	-2.91	0.03	0.85	-4.38	Transmembrane protein 238	388564.00	ENSG00000233493	5.09	6.52	7.12	5.18	4.36	4.34
4316_at	MMP7	-1.62	-3.07	-2.79	0.03	0.85	-4.39	Matrix metalloproteinase 7	4316.00	ENSG00000137673	6.90	8.39	6.73	6.19	6.15	4.82
27350_at	APOBEC3C	-1.62	-3.08	-3.59	0.01	0.85	-4.33	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3C	27350.00	ENSG00000244509	6.78	6.83	7.46	6.07	5.66	4.47
26578_at	O5TF1	-1.62	-3.08	-2.59	0.04	0.85	-4.41	Osteoclast stimulating factor 1	26578.00	ENSG00000134996	6.81	7.32	7.15	6.36	6.06	4.00
8424_at	BBOX1	-1.62	-3.08	-2.43	0.05	0.85	-4.43	Gamma-Butyrobetaine hydroxylase 1	8424.00	ENSG00000129151	3.19	4.73	5.98	2.95	3.10	2.97
56990_at	CDC42SE2	-1.63	-3.10	-2.83	0.03	0.85	-4.39	CDC42 small effector 2	56990.00	ENSG00000158985	6.36	6.43	6.68	5.77	5.28	3.52
27095_at	TRAPPC3	-1.64	-3.11	-2.68	0.04	0.85	-4.40	Trafficking protein particle complex 3	27095.00	ENSG00000054116	7.43	8.62	9.34	7.39	7.21	5.87
1672_at	DEFB1	-1.64	-3.12	-2.76	0.03	0.85	-4.39	Defensin beta 1	1672.00	ENSG00000164825	6.43	8.53	7.29	5.20	6.46	5.67
7045_at	TGFBI	-1.65	-3.13	-2.51	0.04	0.85	-4.42	Transforming growth factor beta induced	7045.00	ENSG00000120708	8.86	7.38	7.93	6.92	7.22	5.10
105374310_at	LOC105374310	-1.65	-3.15	-3.11	0.02	0.85	-4.36	Uncharacterized LOC105374310	105374310.00	NA	4.90	6.39	6.91	4.27	4.80	4.16
1836_at	SLC26A2	-1.67	-3.17	-2.90	0.03	0.85	-4.38	Solute carrier family 26 member 2	1836.00	ENSG00000155850	6.09	7.64	6.78	5.93	5.41	4.17
196_at	AHR	-1.68	-3.21	-3.62	0.01	0.85	-4.33	Aryl hydrocarbon receptor	196.00	ENSG00000106546	8.48	9.96	8.80	7.66	7.75	6.77
4233_at	MET	-1.70	-3.24	-2.82	0.03	0.85	-4.39	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	4233.00	ENSG00000105976	6.25	6.90	5.83	5.72	4.39	3.58
10652_at	YKT6	-1.70	-3.24	-3.35	0.01	0.85	-4.34	YKT6 v-SNARE homolog	10652.00	ENSG00000106636	6.29	7.03	7.09	5.77	5.51	4.03

Table 1 (continued)

Probelid	Gene name	logFC	FC	t	P value	Adj. P val	B	DESC	ENTREZID	ENSEMBL	BT133_fresh	BT134_fresh	BT138_fresh	BT133_thawed	BT134_thawed	BT138_thawed
5768_at	QSOX1	-1.70	-3.25	-2.53	0.04	0.85	-4.41	Quiescin sulphydryl oxidase 1	5768.00	ENSG00000116260	5.27	7.66	7.06	5.27	5.40	4.22
93474_at	ZNF670	-1.72	-3.30	-5.97	0.00	0.85	-4.24	Zinc finger protein 670	93474.00	ENSG00000277462	4.16	4.70	4.86	3.29	2.65	2.61
7020_at	TFA2A	-1.74	-3.34	-2.58	0.04	0.85	-4.41	Transcription factor AP-2 alpha	7020.00	ENSG00000137203	5.64	6.83	8.41	5.11	5.46	5.09
11221_at	DUSP10	-1.74	-3.34	-3.52	0.01	0.85	-4.33	Dual specificity phosphatase 10	11221.00	ENSG00000143507	7.27	7.36	8.15	6.18	6.53	4.85
56900_at	TMEM167B	-1.75	-3.36	-2.51	0.04	0.85	-4.42	Transmembrane protein 167B	56900.00	ENSG00000215717	6.05	7.34	7.33	5.78	5.98	3.71
5557_at	PRMT1	-1.77	-3.42	-3.72	0.01	0.85	-4.32	DNA primase subunit 1	5557.00	ENSG00000198056	5.69	6.34	5.89	5.24	3.85	3.52
5795_at	PTPRJ	-1.78	-3.45	-2.69	0.04	0.85	-4.40	Protein tyrosine phosphatase, receptor type J	5795.00	ENSG00000149177	5.39	8.03	6.45	4.69	5.31	4.51
79022_at	TMEM106C	-1.79	-3.46	-2.53	0.04	0.85	-4.41	Transmembrane protein 106C	79022.00	ENSG00000134291	5.41	7.66	6.77	5.50	5.25	3.73
481_at	ATP11B1	-1.80	-3.47	-2.47	0.05	0.85	-4.42	ATPase Na+/K+-transporting subunit beta 1	481.00	ENSG00000143153	7.64	10.31	8.18	6.69	7.58	6.48
105376171_at	LOC105376171	-1.81	-3.51	-3.93	0.01	0.85	-4.31	Uncharacterized LOC105376171	105376171.00	ENSG00000231521	5.55	6.06	6.77	5.09	4.15	3.71
283987_at	HID1	-1.84	-3.59	-3.15	0.02	0.85	-4.36	HID1 domain containing	283987.00	ENSG00000167861	5.14	7.50	6.41	4.34	4.84	4.34
1942_at	EFNA1	-1.85	-3.59	-3.36	0.01	0.85	-4.34	Ephrin A1	1942.00	ENSG00000169242	3.73	5.03	5.96	2.89	3.02	3.27
84844_at	PHF5A	-1.85	-3.60	-2.79	0.03	0.85	-4.39	PHD finger protein 5A	84844.00	ENSG00000100410	4.91	6.55	7.50	4.70	3.97	4.75
10653_at	SPINT2	-1.86	-3.63	-2.56	0.04	0.85	-4.41	Serine peptidase inhibitor, kunitz type 2	10653.00	ENSG00000167642	5.07	7.84	6.95	4.08	5.09	5.10
100313770_at	MIR548K	-1.87	-3.66	-2.88	0.03	0.85	-4.38	MicroRNA 548k	100313770.00	ENSG00000221333	3.67	4.79	6.36	3.00	3.16	3.05
89481_at	EPRK1	-1.90	-3.73	-2.96	0.02	0.85	-4.38	Epiplakin 1	89481.00	ENSG00000261150	3.92	5.27	6.60	3.38	3.37	3.34
55971_at	BAVAP2L1	-1.90	-3.74	-2.68	0.04	0.85	-4.40	BA1 associated protein 2 like 1	55971.00	ENSG00000006453	5.12	7.77	6.23	4.14	5.25	4.03
3675_at	ITGA3	-1.91	-3.75	-2.69	0.03	0.85	-4.40	Integrin subunit alpha 3	3675.00	ENSG00000005884	6.84	7.81	7.05	6.01	6.25	3.72
1545_at	CYP11B1	-1.95	-3.86	-2.71	0.03	0.85	-4.40	Cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1	1545.00	ENSG00000138061	7.76	8.41	9.92	7.13	7.54	5.58
57153_at	SLC44A2	-1.96	-3.88	-2.62	0.04	0.85	-4.41	Solute carrier family 44 member 2	57153.00	ENSG00000129353	6.65	8.62	8.63	6.29	6.93	4.82
11009_at	IL24	-1.96	-3.90	-2.95	0.02	0.85	-4.38	Interleukin 24	11009.00	ENSG00000162892	6.61	7.42	7.13	4.36	6.63	4.28

**Table 1 (continued)**

Probelid	Gene name	logFC	FC	t	P value	Adj. P value	B	DESC	ENTREZID	ENSEMBL	BT133_fresh	BT134_fresh	BT138_fresh	BT133_thawed	BT134_thawed	BT138_thawed
6272_at	SORT1	-1.99	-3.97	-2.78	0.03	0.85	-4.39	Sortilin 1	6272.00	ENSG00000134243	5.51	7.42	7.93	5.07	5.70	4.12
6692_at	SPINT1	-2.00	-4.01	-3.35	0.01	0.85	-4.35	Serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1	6692.00	ENSG00000166145	5.61	8.07	6.52	4.84	4.67	4.68
129642_at	MBOAT2	-2.01	-4.03	-3.80	0.01	0.85	-4.32	Membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	129642.00	ENSG00000143797	6.45	7.14	6.80	5.33	5.43	3.59
1829_at	DSG2	-2.01	-4.04	-3.59	0.01	0.85	-4.33	Desmoglein 2	1829.00	ENSG0000046604	6.13	8.00	6.21	4.67	5.29	4.34
92421_at	CHMP4C	-2.07	-4.19	-2.76	0.03	0.85	-4.39	Charged multivesicular body protein-4C	92421.00	ENSG00000164695	4.82	7.95	6.36	4.17	4.22	4.54
219970_at	GLYATL2	-2.07	-4.19	-5.74	0.00	0.85	-4.24	Glycine-N-acyltransferase like 2	219970.00	ENSG00000156689	6.74	6.55	6.57	5.30	4.44	3.92
1366_at	CLDN7	-2.10	-4.30	-3.20	0.02	0.85	-4.36	Claudin 7	1366.00	ENSG00000181885	5.76	8.28	7.54	4.96	5.60	4.71
55041_at	PIKRB2	-2.12	-4.34	-2.52	0.04	0.85	-4.42	Pleckstrin homology domain containing 82	55041.00	ENSG00000115762	5.98	7.53	7.36	5.85	5.63	3.04
337875_at	HIST2H2BA	-2.16	-4.47	-3.17	0.02	0.85	-4.36	Histone cluster 2H2B family member a (pseudogene)	337875.00	NA	5.74	6.89	7.36	5.17	5.17	3.17
6768_at	ST14	-2.18	-4.53	-2.65	0.04	0.85	-4.40	Suppression of tumorigenicity 14	6768.00	ENSG00000149418	4.10	7.39	6.61	3.59	4.00	3.98
8140_at	SLC7A5	-2.20	-4.58	-2.99	0.02	0.85	-4.37	Solute carrier family 7 member 5	8140.00	ENSG00000103257	6.75	9.18	8.08	5.84	6.74	4.84
1824_at	DSC2	-2.20	-4.61	-3.51	0.01	0.85	-4.33	Desmocollin 2	1824.00	ENSG00000134755	7.20	9.00	8.68	6.43	6.77	5.07
200058_at	FLJ23867	-2.20	-4.61	-3.11	0.02	0.85	-4.36	Uncharacterized protein FLJ23867	200058.00	NA	6.24	9.21	8.00	5.63	5.62	5.59
51330_at	TNFRSF12A	-2.28	-4.86	-2.71	0.03	0.85	-4.40	TNF receptor superfamily member 12A	51330.00	ENSG00000006327	6.98	8.53	10.21	5.90	7.16	5.82
2517_at	FUCA1	-2.31	-4.97	-2.64	0.04	0.85	-4.40	alpha-L-Fucosidase 1	2517.00	ENSG00000179163	5.26	7.76	8.62	5.33	5.19	4.17
1832_at	DSP	-2.34	-5.06	-6.25	0.00	0.85	-4.23	Desmoplakin	1832.00	ENSG00000096696	7.04	8.21	8.17	5.74	5.56	5.11
1500_at	CTNND1	-2.38	-5.22	-2.78	0.03	0.85	-4.39	Catenin delta 1	1500.00	ENSG00000198561	6.60	9.08	8.82	5.74	7.01	4.60
59599_at	SUIF2	-2.39	-5.24	-3.21	0.02	0.85	-4.36	Sulfatase 2	59599.00	ENSG00000196562	6.43	8.46	6.99	4.71	6.15	3.84
102723517_at	LOC102723517	-2.42	-5.34	-2.87	0.03	0.85	-4.38	Uncharacterized LOC102723517	102723517.00	ENSG00000234899	7.56	9.83	10.72	6.94	7.68	6.25
79679_at	VTCN1	-2.42	-5.36	-2.75	0.03	0.85	-4.39	V-set domain containing T-cell activation inhibitor 1	79679.00	ENSG00000134258	4.11	6.81	7.68	3.76	3.66	3.92
50848_at	F11R	-2.45	-5.45	-2.56	0.04	0.85	-4.41	F11 receptor	50848.00	ENSG00000158769	5.11	8.90	7.36	4.60	5.42	4.00
4071_at	TMS6F1	-2.46	-5.50	-2.70	0.03	0.85	-4.40	Transmembrane 4L six family member 1	4071.00	ENSG00000169908	5.87	9.24	7.98	5.71	5.82	4.19
999_at	CDH1	-2.46	-5.50	-3.13	0.02	0.85	-4.36	Cadherin 1	999.00	ENSG00000039068	6.21	9.33	6.90	4.97	5.32	4.78

Table 1 (continued)

Probed	Gene name	logFC	FC	t	P value	Adj. P val	B	DESC	ENTREZID	ENSEMBL	BT133_fresh	BT134_fresh	BT138_fresh	BT133_thawed	BT134_thawed	BT138_thawed
2568_at	GABRRP	-2.51	-5.70	-2.92	0.03	0.85	-4.38	gamma-Aminobutyric acid type-A receptor p1 subunit	2568.00	ENSG00000094755	5.83	8.82	8.48	4.59	6.09	4.90
54845_at	ESRPT	-2.56	-5.91	-2.58	0.04	0.85	-4.41	Epithelial splicing regulatory protein 1	54845.00	ENSG00000104413	3.97	8.06	6.65	3.27	4.06	3.66
3655_at	ITGA6	-2.58	-5.97	-2.73	0.03	0.85	-4.40	Integrin subunit alpha 6	3655.00	ENSG00000091409	5.87	9.56	8.76	4.93	5.84	5.69
3854_at	KRT6B	-2.61	-6.11	-2.62	0.04	0.85	-4.41	Keratin 6B	3854.00	ENSG00000185179	9.02	9.60	9.42	8.23	7.64	4.34
3694_at	ITGB6	-2.63	-6.18	-5.73	0.00	0.85	-4.24	Integrin subunit beta 6	3694.00	ENSG00000115221	7.21	8.24	7.04	4.28	5.59	4.73
27075_at	TSPAN3	-2.75	-6.73	-2.70	0.03	0.85	-4.40	Tetraspanin 3	27075.00	ENSG00000106537	5.26	9.38	8.10	4.39	4.75	5.35
654319_at	SNORA5A	-2.76	-6.79	-3.19	0.02	0.85	-4.36	Small nucleolar RNA, H/ACA box 5A	654319.00	ENSG00000206838	3.56	6.90	6.28	3.32	2.69	2.45
8842_at	PROM1	-2.76	-6.79	-2.56	0.04	0.85	-4.41	Prominin 1	8842.00	ENSG00000007062	5.98	9.88	7.29	4.82	6.17	3.86
102723505_at	LINC02095	-2.86	-7.25	-2.67	0.04	0.85	-4.40	Long intergenic non-protein coding RNA 2095	102723505.00	ENSG00000228639	5.17	8.97	8.94	4.90	5.43	4.17
114569_at	MAL2	-3.05	-8.28	-3.35	0.01	0.85	-4.34	mal,T-cell differentiation protein 2 (gene/pseudogene)	114569.00	ENSG00000147676	7.95	10.23	9.52	6.32	7.65	4.58
938_at	CD24P4	-3.29	-9.81	-3.13	0.02	0.85	-4.36	CD24 molecule pseudogene 4	938.00	NA	6.48	7.89	7.12	3.49	6.16	1.96
105376425_at	LOC105376425	-3.46	-11.03	-3.40	0.01	0.85	-4.34	Uncharacterized LOC105376425	105376425.00	NA	6.44	9.61	6.90	5.20	4.68	2.68
8364_at	HIST1H4C	-3.63	-12.39	-3.25	0.02	0.85	-4.35	Histone cluster 1H4 family member c	8364.00	ENSG00000197061	6.78	5.03	9.38	4.50	2.75	3.05
260436_at	FDOSP	-4.42	-21.46	-2.81	0.03	0.85	-4.39	Follicular dendritic cell secreted protein	260436.00	ENSG00000181617	8.08	11.32	11.19	4.13	9.03	4.16
6279_at	S100A8	-4.79	-27.66	-3.93	0.01	0.85	-p4.31	S100 calcium binding protein A8	6279.00	ENSG00000143546	5.66	9.82	10.42	3.96	3.56	4.01

BT133, BT134 and BT138 corresponds to three different TNBC patients

## Additional files

**Additional file 1: Figure S1.** Flowchart showing the TNBC dissociation and spheroid protocols.

**Additional file 2: Table S1.** Gene ontology enrichment associated with the freeze/thaw process in TNBCs.

## Authors' contributions

MLG, TMR and AP conducted the experiments and analyzed data. VL, PT, JL and FG provided tumor samples and analyzed data. MLG, TMR, VL, JL, FG and PL wrote the paper. PL designed the experiments and supervised the project. All authors read and approved the final manuscript.

## Author details

<sup>1</sup>COSS (Chemistry Oncogenesis Stress Signaling)-UMR 1242, Inserm, Univ Rennes, CLCC Eugène Marquis, Rue Bataille Flandres Dunkerque, 35042 Rennes, France. <sup>2</sup>Equipe Labellisée Ligue Contre Le Cancer, Rue Bataille Flandres Dunkerque, 35042 Rennes, France. <sup>3</sup>CHU Pontchaillou, Rennes, France. <sup>4</sup>Present Address: Oregon Health and Science University, Portland, USA.

## Acknowledgements

We are grateful to the CRB Rennes for its technical assistance. This work was supported by INCa PLBIO, Ligue Contre le Cancer and Fondation ARC.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Availability of data and materials

The study was conducted with human samples and clinical data of Rennes Biobank Breast Cancer Collection (BRIF Number: BB-0033-00056) certified NF S96900 for receipt preparation preservation and provision of biological resources. Raw and normalized transcriptomic data have been deposited to the GEO database accession ID GSE114359. All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

## Consent for publication

Not applicable.

## Ethics approval and consent to participate

The breast Cancer Collection was declared and approved by the French institution since 2008 (DC-2008-338). All patients provided written informed consent to the use of surgical specimens and clinic-pathological data for research purposes (as required by the French Committee for the Protection of Human Subjects (CCPPRB)). Rennes CCPPRB approved the use of tumor tissues

for this study (6 May 2013; No. 357/2013). Collection of tumors was approved by French Minister of higher education and research (No. AC-2008-141). The study did not need additional ethical approval.

## Funding

This work was supported by INCa PLBIO, Ligue Contre le Cancer and Fondation ARC. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 11 May 2018 Accepted: 12 June 2018

Published online: 20 June 2018

## References

1. Cronin KA, Lake AJ, Scott S, Sherman RL, Noone AM, Howlader N, Henley SJ, Anderson RN, Firth AU, Ma J, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: national cancer statistics. *Cancer*. 2018. <https://doi.org/10.1002/cncr.31551>.
2. Negoita S, Feuer EJ, Mariotto A, Cronin KA, Petkov VI, Hussey SK, Benard V, Henley SJ, Anderson RN, Fedewa S, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part II: recent changes in prostate cancer trends and disease characteristics. *Cancer*. 2018. <https://doi.org/10.1002/cncr.31549>.
3. Ali HR, Chlon L, Pharoah PD, Markowitz F, Caldas C. Patterns of immune infiltration in breast cancer and their clinical implications: a gene-expression-based retrospective study. *PLoS Med*. 2016;13:e1002194.
4. Oskarsson T, Batlle E, Massague J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell*. 2014;14:306–21.
5. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:3983–8.
6. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007;1:555–67.
7. Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, Katz-Jaffe M, Larman MG. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology*. 2007;67:64–72.
8. Bianchi F, Nicassio F, Di Fiore PP. Unbiased vs. biased approaches to the identification of cancer signatures: the case of lung cancer. *Cell Cycle*. 2008;7:729–34.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



**Article 3 – Maintien du CD95 sur les cellules de cancers du sein triple négatifs pour éviter l'activité anti-tumorale des cellules NK. Submitted. bioRxiv 2021.02.12.431011; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.12.431011>**

### Introduction

Après délétion spécifique du CD95 dans des cancers de l'ovaire ou de cancer du foie induit chimiquement, il a été démontré dans des modèles murins qu'il existe une réduction de la croissance tumorale très importante, voir une absence complète de tumeur (223,228). D'ailleurs, dans les tumeurs résiduelles, l'expression de CD95 est présente, indiquant un échappement au mécanisme utilisé pour supprimer l'expression de CD95, et montrant ainsi l'importance de cette molécule pour la croissance tumorale *in vivo*. Dans les cancers du sein triple négatifs, CD95 est fortement exprimé à la surface des cellules tumorales, alors qu'il existe normalement une induction de l'apoptose via le CD95L par les cellules immunitaires.

Le but de l'étude rapportée ici est de comprendre le mécanisme par lequel CD95 est indispensable à la croissance tumorale. L'hypothèse évaluée concerne le rôle potentiellement important de la présence de CD95 dans la régulation de l'environnement immunitaire tumoral. Ainsi, dans cette étude, il a été testé la capacité des cellules tumorales sauvages ou délétées de CD95 à moduler le système immunitaire infiltrant la tumeur. Pour cela, nous avons étudié la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de tumeur du sein triple négative murine (4T1), en présence ou non de l'expression de CD95, et en analysant l'environnement immunitaires chez des souris immunodéficientes et immunocompétentes après implantation des cellules tumorales 4T1.

### Résultats et conclusion

Nous avons montré *in vitro* que la délétion de CD95 dans les cellules tumorales 4T1 n'affecte pas la croissance tumorale, mais diminue la capacité à former des cellules souches. *In vivo* chez des souris immunodéficientes, les cellules 4T1 déficientes en CD95 ont une croissance plus rapide que les cellules exprimant CD95 mais ne font pas de métastase, ceci étant probablement associé au rôle de CD95 dans le maintien du caractère souche de ces cellules. De manière surprenante, la croissance des cellules 4T1 déficientes en CD95 est très limitée par rapport à celle des cellules

exprimant CD95 dans les souris immunocompétentes suggérant que l'élimination de CD95 dans les cellules 4T1 favorise leur élimination par le système immunitaire. La suppression du CD95 entraîne une infiltration par des cellules immunitaires antitumorale (CD4+, CD8+, B cells) et une diminution de l'infiltration par les cellules myéloïdes suppressive (MDSC) qui augmentent la tolérance du cancer. L'étude plus fine de la réponse antitumorale grâce à des déplétions spécifiques des sous-population immunitaires (CD4+, CD8+, MDSC, NK) montre que ce sont principalement les cellules NK (et à un moindre degré les cellules T CD8 +) qui sont responsables de la croissance réduite des tumeurs CD95 K.O.

En résumé, nos données soulignent que le maintien de l'expression de CD95 sur les cellules tumorales permet de limiter la réponse anti-tumorale NK dans un modèle de tumeur triple négative. L'élimination de CD95 va au contraire entrainer une destruction tumorale par le système immunitaire, suggérant que le CD95 pourrait agir comme un nouveau checkpoint immunitaire. La génération d'antagonistes ciblant le CD95 pourrait s'accompagner d'effets thérapeutiques similaires aux traitements ciblant PD1 / CTLA-4, voir même renforcer leur efficacité.

#### Contribution

L'auteur de la thèse a contribué à cette publication en participant à l'analyse des expériences et à la rédaction de l'article.



## **CD95 is maintained on triple negative breast cancer cells to avoid anti-tumor activity of NK cells**

Abdul S. Qadir<sup>1,10,12</sup>, Jean Philippe Guégan<sup>2,10</sup>, Christophe Ginestier<sup>3</sup>, Assia Chaibi<sup>2</sup>, Alban Bessedé<sup>2</sup>, Emmanuelle Charafe-Jauffret<sup>3</sup>, Manon Macario<sup>3</sup>, Vincent Lavoué<sup>4</sup>, Thibault de la Motte Rouge<sup>5</sup>, Calvin Law<sup>1</sup>, Jacob Vilker<sup>1</sup>, Hongbin Wang<sup>6</sup>, Emily Stroup<sup>6</sup>, Matthew J. Schipma<sup>7</sup>, Bryan Bridgeman<sup>1</sup>, Andrea E. Murmann<sup>1</sup>, Zhe Ji<sup>6,8</sup>, Patrick Legembre<sup>9,11</sup>, and Marcus E. Peter<sup>1,7,11</sup>

<sup>1</sup> Division Hematology/Oncology, Department of Medicine, <sup>6</sup> Department of Pharmacology, <sup>7</sup> Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL 60611, USA

<sup>2</sup> Immusmol SAS, 229 Cours de l'Argonne 33000 Bordeaux, France

<sup>3</sup> Aix-Marseille Univ, Inserm, CNRS, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Epithelial Stem Cells and Cancer Lab, Marseille, France

<sup>4</sup> Department of Gynecology, University Hospital of Rennes, Rennes, France

<sup>5</sup> Centre Eugène Marquis, Rennes, France

<sup>8</sup> Department of Biomedical Engineering, McCormick School of Engineering, Northwestern University, Evanston, Illinois

<sup>9</sup> INSERM U1262, CRIBL, Université Limoges, Limoges, France

<sup>10</sup> Shared first authorship

<sup>11</sup> Shared last authorship

<sup>12</sup> Current address: Department of Pharmacology, The University of Illinois College of Medicine, Chicago, Illinois, 60612, USA

Contact: Marcus Peter, E-mail: m-peter@northwestern.edu., Patrick Legembre, Email: patrick.legembre@inserm.fr

Keywords:

Fas, cancer stem cells, breast cancer, MDSC

Running title: CD95/Fas acts as an immune suppressor in TNBC

**Abstract**

The apoptosis inducing receptor CD95/Fas has multiple tumorigenic activities. Stimulation by its cognate ligand CD95L on many cancer cells increases their growth, motility, ability to invade and/or their cancer stemness. Using genetically engineered mouse models of ovarian and liver cancer, we previously reported that deletion of CD95 in the tumor cells strongly reduced their ability to grow *in vivo* [1, 2]. Using a combination of immune-deficient and immune-competent mouse models, we now establish that loss of CD95 in metastatic triple negative breast cancer cells prevents tumor growth by modulating the immune landscape. CD95 deficient but not wild-type tumors barely grow in an immune-competent environment and show an increase in immune infiltrates into the tumor. This growth reduction is caused by NK cells and does not involve CD8<sup>+</sup> T cells. On the other hand, in immune compromised mice CD95 k.o. cells are not growth inhibited, but they fail to form metastases. In summary, we demonstrate that in addition to its tumor and metastasis promoting activities, CD95 expression by tumor cells can exert immune suppressive activities providing a new target for immune therapy.

## Introduction

CD95/Fas is a well characterized death receptor that in permissive cells or when crosslinked in cancer cells *in vitro* mediates induction of apoptosis when stimulated by its cognate ligand CD95L [3-5]. It is now well established that CD95 also has multiple nonapoptotic functions [6-8]. Many of these activities are tumor promoting (reviewed in [9, 10]). We previously demonstrated that neither a low grade serous nor an endometrial ovarian cancer, nor a chemically (DEN) induced liver cancer efficiently grew in mice after tissue specific deletion of CD95 in the ovaries or the liver, respectively [1, 2]. In fact, in all three models either no tumors formed or their numbers and sizes were severely reduced. Interestingly, all tested DEN-induced liver cancer nodules or low grade ovarian cancer that formed in mice still expressed CD95 [2] indicating that these tumors were escapers caused by the inefficiency of Cre recombination used to delete CD95 and pointing out a pivotal role of CD95 in cancer cell survival *in vivo*. However, it was not clear whether this activity of CD95 was cell autonomous or required cells of the tumor microenvironment.

Among women, breast cancer (BC) is the most common cause of cancer, and the second leading cause of cancer death [11]. BC is a heterogeneous disease whose molecular classification has been significantly improved to distinguish luminal A and B expressing hormonal receptors including estrogen (ER) and/or progesterone receptors (PR), basal/triple negative breast cancer (TNBC), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-like tumors. This molecular taxonomy is clinically relevant with basal/TNBC patients presenting the poorest clinical outcome with no targeted therapies available as compared to other molecular subtypes. TNBCs progress rapidly and generate metastases that remain the major cause of cancer-related mortality in these patients [12]. TNBC presents a major intratumoral heterogeneity that contributes to therapy failure and disease progression. The origin of this cellular heterogeneity is mainly explained by several subpopulations of self-renewing breast cancer stem cells (CSCs) sustaining the long-term oligoclonal maintenance of the neoplasm [13]. We recently reported that engaging CD95 on ER positive BC cells contributes to CSC survival [14, 15]. Although CD95L-expressing immune cells edit tumor cells by sparing cancer cells expressing low CD95 level at their plasma membrane [16], CD95 is highly expressed on TNBC [17] and the function of this receptor in these cancers remained unknown.

Myeloid derived suppressor cells (MDSCs) were initially identified in human and mouse cancers due to their potent immunosuppressive activity [18, 19]. MDSCs are a heterogeneous population of immature myeloid cells that include monocytic (M-MDSC, CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>High</sup>Ly6C<sup>High</sup>) and granulocytic (G-MDSC, CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>High</sup>Ly6G<sup>+</sup>) subsets both of which have been shown to exert immune-suppressive activities. Within tumors, additional myeloid cells referred to as tumor-associated macrophages (TAM) display immunosuppressive activity [20].

The presence of these cells inside the tumor seems to favor not only tumor cell survival but also angiogenesis and metastases [21] suggesting that inhibitors of MDSC recruitment inside tumors might represent an attractive therapeutic option [22]. To examine the role of CD95 in a TNBC model, we generated two independent sets of CD95 knockout 4T1 clones using different methods and on different continents. Only in immune competent mice, the deletion of CD95 caused a dramatic loss of tumor growth. This was accompanied by an increased T-cell infiltration (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells) and a reduction in G-MDSCs inside the tumors. A substantial increase in many other immune cells including natural killer (NK) cells was detected in the k.o. tumors as compared to control cancer cells. Most notably, depletion of tumor-infiltrating macrophages (TAM), CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cells did not restore tumor growth of the k.o. cells while elimination of NK cells did. Our data point at a novel role of CD95 as a general immune suppressive receptor

that advanced cancer cells maintain to avoid destruction by multiple immune cells and more specifically, 4T1 tumor cells keep CD95 expression to prevent a NK-driven anti-tumor response.

## Results

### Knock-out of CD95 does not affect the growth or stemness of 4T1 cells *in vitro*

We previously demonstrated that different cancers *in vivo* can barely grow without CD95 expression [1, 2]. In contrast, knocking out CD95 in either an ovarian cancer or a BC cell line did not substantially reduce growth of cancer cells *in vitro* [23]. We were therefore wondering whether the tumor microenvironment and/or a functional immune system was required for CD95 expressing tumor cells to grow *in vivo* or whether they were responsible for the destruction of CD95 deficient tumor cells. Based on our genetically engineered mouse models (GEMMs) in which either tumors did not form or tumors that formed still expressed CD95 due to Cre recombination inefficiency, we concluded that this question could not conclusively be addressed in a CD95 k.o. GEMM. We therefore used CRISPR/Cas9 gene editing to delete CD95 in the aggressive murine TNBC cell line 4T1 that could be grown in syngeneic Balb/c mice [24]. We generated single cell clones with a complete biallelic knockout of CD95. To increase the rigor of the study and to eliminate any possibility of clonal effects or effects of Cas9 expression two sets of k.o. clones were generated starting with different 4T1 lines and using different strategies to generate CD95 deficiency. The U-clones (generated in the US, all experiments in light blue boxes) involved the use of stable expression of GFP-Cas9 and a two guide (sg)RNA system to delete exon 9 of murine CD95 (**Fig. S1A**). On the other hand, the F-clones (generated in France, all experiments in yellow boxes) were generated by transfecting both Cas9 and a sgRNA-plasmid resulting in a frame shift mutation around the CD95 transcriptional start site (**Fig. S1B**). Two U-clones were confirmed to not contain CD95-exon 9 anymore (**Fig. S1C**). They had reduced total CD95 mRNA expression (**Fig. S1D**), expressed little or no detectable CD95 on their cell surface (**Fig. S1E**), and neither of the two k.o. clones had a consistent up or downregulation of CD95L mRNA when compared to either parental cells or a Cas9 control clone (**Fig. S1F**). Similarly, two k.o. F-clones were selected and expressed no detectable surface CD95 (**Fig. S1G**). Similar to the human cell lines in which we had deleted CD95, none of the four 4T1 CD95 k.o. clones showed growth reduction *in vitro* or major cell cycle changes when compared to their wt counterparts (**Fig. S1H-J**).

We had recently reported for a number of ER positive BC cell lines that chronic stimulation through CD95 induced cancer stemness through induction of a type I interferon response which resulted in activation of STAT1 [14, 15]. Stemness could also be increased by treating cells directly with type I interferons. In contrast, in the TNBC cell line 4T1 prolonged stimulation through CD95 or addition of IFN $\beta$  did not cause a substantial upregulation of CSC driving transcription factors, STAT1 or its major target gene PLSCR1 (**Fig. S2A**). While the stemness marker BMI1 was induced, the two E-box binding proteins ZEB1 and ZEB2 were not. Treatment of 4T1 cells with either LzCD95L or IFN $\beta$  did also not substantially affect cell growth (**Fig. S2B**) and it did not increase the ability of the cells to form spheres (**Fig. S2C**). It also did not result in an increase in ALDH1 activity (**Fig. S2D**) or upregulation of CD44 (**Fig. S2E**). Finally, treatment of 4T1 cells with LzCD95L did not induce a substantial amount of apoptosis (**Fig. S2F**). These data suggest that cell signaling through CD95 in 4T1 cells is severely impaired despite the fact that these cells express substantial amounts of surface CD95. Although we did not see a significant and reproducible change in the expression of some of the stemness markers in the CD95 k.o. U-clones (**Fig. S3A**), both CD95 k.o. U- and F-clones displayed a reduced ability to form spheres when

compared to control cells (**Fig. S3B**, and **C**). In summary, the stimulation of CD95 in 4T1 TNBC cells did not result in a major change in *in vitro* growth or cancer stemness suggesting that CD95 on these cells has low signaling competence. On the other hand, although the stemness markers were not dramatically affected by CD95 loss in 4T1 cells, the loss of this receptor was associated with a slight but significant reduction in the ability of the cells to form spheres, suggesting that the presence of CD95 could alter some tumor features.

#### **CD95-deficient 4T1 cells grow faster in immune deficient mice than wt cells but do not form lung metastases**

To determine whether the lack of CD95 expression would affect growth of 4T1 cells *in vivo*, we carried out an orthotopic graft of luciferase-expressing Cas9 control, or a mixture of the two CD95 k.o. U-clones into the mammary fat pad of NSG mice (**Fig. 1A**). After a lag phase of about 14 days the k.o. U-cells grew more rapidly than wt cells in the NSG mice. When the two k.o. clones and the two wt controls were injected individually tumor weight and volume was similar at two weeks in the mice (**Fig. 1B, C**). The two F-k.o. clones generally grew more rapidly than wt cells (**Fig. 1D**), suggesting that in immune deficient mice, cells without CD95 had a growth advantage. This was not due to a difference in the expression the stemness markers ALDH1 or CD44 (**Fig. 1E**). NSG mice are devoid of lymphocytes and NK cells, but do contain macrophages [25]. While the number of intratumor G-MDSCs was the same in wt and ko tumors (**Fig. 1F**), we observed a different distribution of F4/80 or CD163-expressing macrophages in CD95 k.o. as compared to wt tumors (**Fig. S4**). Whereas F4/80 or CD163-expressing macrophages infiltrated wt tumors, these cells remained at the tumor periphery in CD95 k.o. tumors, pointing at a modulation of the immune landscape even in NSG mice.

4T1 cells are aggressively growing cancer cells that form lung metastases in implanted mice [26]. While injection of wt 4T1 cells into NSG mice caused multiple lung metastases (**Fig. 1G, H**), barely any lung metastases were detected in mice with implanted CD95 k.o. cells (**Fig. 1G, H**). Interesting, this occurred despite the fact that the primary CD95 k.o. tumors grew larger than the wt tumors in these mice. Reduced numbers of lung metastases were also seen in NSG mice injected with the F-clones, however, the difference between wt and CD95 ko cells was not as dramatic (data not shown). These data are consistent with the known activity of CD95 to increase motility and invasiveness of breast cancer cells [27, 28] and could also be associated with the somewhat reduced capacity of CD95-deficient 4T1 cells to form spheroids as compared to wt counterparts (**Fig. S3B** and **C**).

#### **CD95 deficient 4T1 cells barely grow in immune competent mice compared to wt cells and show reduced markers of stemness**

We next wondered whether the loss of CD95 by tumor cells could impair tumor growth by modulating immune infiltrates. To evaluate this possibility, we orthotopically grafted 4T1 cells into syngeneic Balb/c mice. CD95 k.o. 4T1 cells grew much less than wt cells which only stopped growing when reaching a certain size and becoming necrotic (**Fig. 2A**). The Cas9 control, or a mixture of the two CD95 k.o. U-clones expressed luciferase (**Fig. 2A**). To exclude an immune effect linked to the fact that CD95 wt and k.o. clones expressed the xeno-antigen luciferase [29], we performed the experiment with unlabeled parental cells and compared the growth of parental cells with that of the vCas9 and the two CD95 k.o. U-clones individually (**Fig. 2B, C**). Tumors were harvested after two weeks of growth in the mice. Consistent with the above results, both the parental and unmodified 4T1 cells as well as the Cas9 expressing wt cells grew much faster than the two CD95 k.o. clones as monitored by both tumor volume and tumor weight (**Fig. 2B, C**). In fact, the k.o. cells barely grew in these mice. This behavior of CD95 k.o. cells was confirmed by

the orthotopic xenograft of the F-clones into Balb/c mice (**Fig. 2D**). Tumor growth of the two k.o. clones was less efficient than that of the parental cells or of a wt clone (**Fig. 2D**). In contrast to the tumors grown in NSG mice, *ex vivo* isolated CD95 k.o. U-clone tumor cells from the Balb/c mice showed a clear reduction of the stemness markers ALDH1 and CD44 when compared to wt tumors (**Fig. 2E**). Unexpectedly, these data suggest that the loss of the death receptor CD95 reduces tumor growth in mice that have a functional immune system.

#### **A differential analysis of gene expression changes identifies a general immune activation inside the CD95 k.o. tumors in immune competent mice**

To get insights into what is causing the suppression of tumor growth after deletion of CD95, we subjected two 4T1 wt controls (wt and vCas9 expressing) and the two CD95 k.o. U-clones to an RNAseq analysis under three different conditions: cells grown *in vitro*, cells grown in NSG and cells grown in Balb/c mice. As the goal was to identify altered genes in the tumors between wt and k.o. tumor specifically in the Balb/c mice, we performed a differential gene expression analysis using DESeq2 (**Table S1**). The number of significantly expressed genes across all samples was 13,083 and the numbers of genes differentially expressed (padj <0.05) between wt and k.o. cells was 496 (cell lines), 485 (NSG mice), and 620 (Balb/c mice). This amounted to 1090 differentially expressed unique genes. We performed k-means clustering with 6 clusters (determined by elbow plot) and plotted a heat map of adjusted expression to identify trends and unique groups (**Fig. 3A**). The top most significant GO terms are listed for each cluster. Interestingly, genes in the top two clusters were most highly deregulated specifically in the tumors grown in Balb/c mice when compared to either *in vitro* grown cells or grown in NSG mice. Genes in cluster 1 were upregulated in the k.o. tumors and genes in cluster 2 were downregulated. These changes could either be caused by gene expression changes in the tumor cells or more likely caused by infiltrating immune cells. Most importantly, due to the way the data were analyzed these changes did not reflect the difference between NSG and Balb/c mice but rather the difference between wt and CD95 k.o. tumors in the context of immune competent mice. To identify the function of the most highly deregulated genes, we ranked all deregulated genes across all 6 clusters according to the greatest fold difference in the k.o./wt ratio between Balb/c and NSG mice (**Table S2**) and subjected this list to a GO analysis (**Fig. 3B**). 10 of the 22 most significantly enriched GOs in the Balb/c mouse tumors were related to immune function and activation of specific immune cell subsets. This result pointed at a general increase in immune cell infiltration and activity in tumors lacking CD95.

#### **Deletion of CD95 causes an increase in infiltration of most immune cells into the tumor while infiltration of G-MDSCs is reduced**

Based on the results of the differential gene expression analysis of CD95 k.o. cells, we subjected U-clones grown as tumors in Balb/c mice to immunohistochemistry analysis (**Fig. 4A**). Macrophages (F4/80 staining) were found mostly at the periphery of the tumors and they were more abundant in CD95 k.o. tumors (**Fig. 4B**). T cells (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and regulatory T cells [Tregs - FOXP3 staining]) infiltrated k.o. tumors more readily compared to wt tumors. This was pronounced for CD8<sup>+</sup> T cells which were abundant and showed the most homogenous staining inside the CD95 k.o. tumors, while very few CD8<sup>+</sup> T cells were detected inside wt tumors (**Fig. 4A, B**). We also detected an increase in phospho-STAT1 in small islets inside the k.o. tumors consistent with an increase in immune infiltration. Tumor vessel density (CD31 staining) was similar between wt and k.o. tumors (**Fig. 4A**). These results suggested that CD95 expression in cancer cells could prevent immune cells including cytotoxic killer cells from infiltrating the tumors but had no effect on tumor vascularization, at least not in this rapidly growing tumor model. The IHC analysis of the U-tumors was followed up by a detailed multi-parameter flow cytometry

analysis of the tumor infiltrate inside the F-clones grown in Balb/c mice (**Fig. 4C**). This analysis independently confirmed that a large number of different immune cells had preferentially infiltrated the CD95 k.o. tumors including macrophages (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>), both M1 (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) and M2 (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) macrophages [30], and all types of T cells as evidenced by an increase in CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells (**Fig. 4C**). Interestingly, while the number of M-MDSCs was increased, the number of G-MDSCs was reduced in the k.o. tumors (**Fig. 4C**). To independently confirm this finding, we stained the U-clone tumors for Ly6G to detect G-MDSCs and confirmed the staining to be strongly reduced in the k.o. tumors (**Fig. 4D** and **4E**, left panel). These findings indicate that in TNBC cells, CD95 expression can prevent tumor infiltration of many cytotoxic immune cells including CD8<sup>+</sup> T-cells.

#### **NK but not CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> T cells are responsible for the reduced growth of CD95 k.o. tumors**

Multiple studies have shown that tumor infiltrating lymphocytes (TILs) (mostly CD8<sup>+</sup> T cells) have a strong prognostic impact on women affected by TNBC [31, 32]. A major reduction in disease and distant recurrences was reported for TNBC patients having high amounts of TILs [33]. We therefore wondered to what degree infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells detected in the k.o. tumors were responsible for the reduced tumor growth. To address this question, we depleted CD8<sup>+</sup> T cells in Balb/c mice by repeated injection of a neutralizing anti-CD8 mAb (**Fig. S5A**). Staining for CD8<sup>+</sup> T cells in the spleen of depleted mice was undetectable while that of CD4<sup>+</sup> T cells remained unaffected (**Fig. 5A, B**). 4T1 cells (U-clones) when grown *in vivo* resulted in a substantial increase in spleen size and weight as compared to CD95 k.o. counterparts (**Fig. 5C**). Of note, the reduced growth of CD95 k.o. cells compared to wt cells *in vivo* was not affected by the CD8<sup>+</sup> T-cell depletion despite the fact that CD8 infiltration was substantially reduced in the CD95 k.o. tumors upon CD8 depletion (**Fig. S6**). CD8 depletion had some effect on tumor growth in general as both wt and k.o. tumors grew slightly larger in the depleted mice (**Fig. 5D**). Consistent with that observation, when areas of the tumors were quantified for TUNEL staining that did not show overt cell death or necrosis (viable tumor tissue), CD8<sup>+</sup> T-cell-depleted tumors (both CD95 k.o. and wt 4T1 cells) experienced less TUNEL staining than untreated tumors but no difference was observed in fold change between CD95 k.o. and wt tumors (**Fig. 5E**, right panel). These data suggested that although increased TIL infiltration into the k.o. tumors did not explain the strongly reduced tumor growth after deletion of CD95, CD8<sup>+</sup> T cells did seem to contribute to the increased cell death seen in the 4T1 cells in general.

In a similar experiment, we confirmed that depletion of CD4<sup>+</sup> T cells also did not have a significant effect on the reduced growth of CD95 ko tumors (**Fig. S5B and S7A, B**). Because of the differences in the amounts of M-MDSCs observed in wt and ko tumors (**Fig. 4C**), we treated mice with an antibody to neutralize CSF1-R which has been shown to prevent the recruitment of tumor-infiltrating myeloid cells including macrophages and M-MDSCs [34, 35] (**Fig. S5C**). This experiment was also carried out because among all the CSF ligand and CSF receptor genes in our differential gene expression analysis, CSF1-R was the most highly deregulated gene between the two CD95 k.o. clones and the wt cells, both *in vitro* and when grown as tumors in Balb/c mice (but not in NSG mice) (**Table S3**). Targeting CSF1-R had no effect on tumor growth of either wt or CD95 ko tumors despite this antibody treatment leading to the decrease in tumor-associated macrophages (TAMs) and M-MDSCs and an increase in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells (**Fig. S7C-E**).

Finally, to test whether NK cells could be responsible for the reduced growth of CD95 k.o. tumors in Balb/c mice, we compared side-by-side the growth of wt and k.o. tumors in NOD-SCID IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> (NSG), NOD-SCID and Balb/c mice. NOD-SCID mice differ from their NSG counterparts mainly in the presence of NK cells [36, 37]. Interestingly, the growth reduction of the CD95 k.o. tumors in NOD-SCID mice was similar to the one seen in Balb/c mice and reversed to

the situation in NSG mice (**Fig. 5F**). Consistent with this finding, CD95 k.o. tumors exhibited a significantly higher number of tumor-infiltrating NK cells as compared to wt tumors in NOD-SCID mice (**Fig. 5G**). This was also seen in on the mRNA level in a NanoString analysis of wt and k.o. tumors grown in Balb/c mice (data not shown). Finally, depletion of NK cells in Balb/c mice by repeated injections of an anti-Asialo GM1 Ab (**Fig. S5D**), significantly minimized the growth difference between wt and k.o. tumors (**Fig. 5H**).

In summary, our data emphasized that in a mouse model of TNBC, the expression of CD95 on tumor cells regulated the global immune landscape. When CD95 was lost in the tumor cells while the total number of immune cells was reduced (as evidenced by the strong reduction in spleen size), the percentage of tumor-infiltrating lymphocytes and NK cells increased and was responsible for the anti-tumor response.

## Discussion

We previously reported that deletion of CD95 *in vivo* strongly reduced tumor formation and growth in three different mouse tumor models [1, 2]. In all cases, endogenous CD95 was deleted using Cre recombinase. In two of these models, one involving DEN induced liver cancer and one low grade ovarian cancer, we determined that most if not all tumor nodules that grew in these CD95 k.o. mice still expressed CD95 [1, 2] due to inefficient deletion by Cre. In the current work, we therefore used a syngeneic orthotopic cell line model that allowed us to selectively and completely delete CD95 in all cancer cells and assess its effect on tumor growth. We chose BC as a model because we had previously identified CD95 as a driver of cancer stemness in the context of BC [14, 15, 38]. We found that although the loss of CD95 in TNBC cells did not substantially affect cancer cell survival in an immune-depressed mouse model, when introduced into immune competent mice CD95 k.o. tumors barely grew.

A recent analysis of a cohort of 667 BC patients revealed that CD95 expression increases with advancing grade of disease [17]. In fact, ER-negative BC has almost twice as much CD95 expression as ER-positive BC and TNBC more than twice as much expression. The TNBC 4T1 cell line is part of a series of five BC cell lines that were isolated from mice after sequential growth and differ in their metastatic potential [39]. 4T1 is the most aggressive of these cell lines. Consistent with the data on human TNBC, 4T1 cells have the highest expression of CD95 mRNA of all five isolates (data not shown).

It was previously shown that CD95 signal-mediated inflammation is involved in promoting progression of 4T1 TNBC cells [40] through recruitment of MDSCs which have been reported to drive the growth of 4T1 tumors [41, 42]. We now demonstrate that the complete deletion of CD95 in 4T1 cells results in tumors that barely grow in immune competent mice but have no impairment to grow in immune deficient mice. Our differential analysis of genes upregulated in the k.o. tumors suggested a fundamental recruitment of immune cells with antitumor activity as multiple RNAs were detected consistent with both leukocyte and neutrophil degranulation (see Fig. 3B). The strongly decreased recruitment of G-MDSCs together with the increase in CD8<sup>+</sup> T and NK cells in the CD95 k.o. tumors we then observed, left two possibilities to explain the dependence of tumor cells on CD95 to grow *in vivo*: 1) Wt tumors grow more because MDSCs are driving their growth and the increased infiltration of CD8<sup>+</sup> T cells in k.o. tumors might be the result of the absence of MDSCs. 2) The reduced growth of k.o. tumors might be due to an increased recruitment of TILs. Interestingly, a good prognostic score was shown to be associated with CD8<sup>+</sup> TILs in ER-negative disease with high CD95 expression [17] suggesting that CTLs attack high CD95-expressing tumor cells. However, we now demonstrate that although CD8<sup>+</sup> CTLs exert a general anti-tumor effect in the 4T1 model, the loss of CD95 in these TNBC cells is associated with the recruitment of NK cells that reduced tumor growth, ruling out that it is only the MDSCs that drive the growth of wt cells. This finding is consistent with a report showing that treatment of mice with IL-21, a cytokine involved in the NK cell proliferation and activation [43], enhances 4T1 tumor rejection [44]. Not much is known about the role of NK cells in TNBC but molecular signatures associated with NK cells has been shown to be predictive of relapse free survival in breast cancer patients including TNBC patients [45].

In conclusion, we can now separate different observations on the apoptosis independent and cancer relevant functions of CD95 into at least four activities. 1) CD95 drives metastasis formation in a cell autonomous fashion. This observation is consistent with multiple reports demonstrating increased motility or invasiveness of tumor cells upon CD95 stimulation [27, 28, 40, 46-53]. Interestingly, we found that 4T1 cells only form metastases when CD95 is expressed, suggesting that it is indeed a metastatic driver. This activity does not require lymphocytes as this feature was

also found in NSG mice. 2) Stimulation of CD95 on cancer cells increases their proliferation. We reported evidence of increased CD95 driven proliferation of cancer cells and in fact stimulating apoptosis resistant cancer cells through CD95 increases their growth rate [54-56]. 3) CD95 stimulation increases cancer stemness [38, 57]. We previously showed that chronic stimulation of CD95 on multiple cancer cell lines including ER<sup>+</sup> BC induces production of type I interferons, which through activation Type I IFN receptors and activation of STAT1 drives cancer stemness [14, 15]. 4). In the present study, we uncover a novel and unexpected activity of CD95 as an immune suppressive receptor that seems to prevent infiltration of multiple immune cells into the tumor.

We do not believe that the findings on the role of CD95 as a suppressor of tumor immune infiltration is limited to the 4T1 TNBC model. Our data provide an explanation for a long standing enigma of why in GEMMs of endometrioid, low grade ovarian cancer, or liver cancer tumors could not efficiently grow *in vivo* after knock-out of CD95 [1, 2]. In addition, in the model of low grade ovarian cancer, we noticed that the deletion of CD95 in the tumors in the ovaries led to a massive amount of hemorrhage, necrotic cell death and an increase in infiltration of proinflammatory immune cells [2]. We had interpreted this result as a requirement for CD95 for the cancer cells to survive but in this mouse model, we could not determine whether the increase in inflammation we observed was the cause or the consequence of dying tumor cells. Our data now suggest that it was the deletion of CD95 on the developing tumor cells that triggered massive influx of immune cells.

An open question is whether CD95L is required for the immune suppressive activities of CD95. The inability of 4T1 cells to significantly respond to even prolonged CD95 stimulation suggests an activity of CD95 that is independent of its stimulation by CD95L. We can exclude 4T1 cells as a source of CD95L as we did not find a single read derived from CD95L in our analysis of the parental cells, the wt or CD95 k.o. U clones (out of 85 million reads in the RNA seq analysis in Fig. 3, data not shown), consistent with published data [58]. Our data provide support to the idea to not only target CD95L to block the tumor promoting activities of CD95L [59-61] but also to target the CD95 receptor directly.

In summary, this study reveals that CD95 expression on tumor cells impairs the immune attack and when removed enhances the destruction of tumors by the immune system, suggesting that CD95 is an immune checkpoint regulator, and the generation of CD95-targeting antagonists could mimic or add to the therapeutic effects of anti-PD1/CTLA4 drugs.

## Materials and Methods

### Cell Line and Reagents

The mouse breast cancer cell line to generate the U-clones 4T1 was purchased from the ATCC and cultured in RPMI 1640 medium (Mediatech Inc) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich), 1% L-glutamine (Mediatech Inc) and 1% penicillin/streptomycin (Mediatech Inc). The 4T1 cell line to generate the F-clones was purchased from ATCC (Molsheim Cedex, France) and cultured in RPMI supplemented with 8% heat-inactivated FCS (v/v) and 2 mM L-glutamine at 37°C/5% CO<sub>2</sub>. IFN $\beta$  (11415-1) (used at 1000U/ml) was purchased from pbl Assay Science. Leucine zipper tagged CD95L (LzCD95L) was used to induce apoptosis at 100 ng/ml as described before unless otherwise specified (Qadir et al., 2017). Propidium iodide (#P4864), bovine serum albumin (BSA), EdU flow cytometry kit 488, puromycin, G418 and hydrocortisone were purchased from Sigma-Aldrich. Blasticidin was purchased from InvivoGen. Reagents used for flow cytometry, anti-CD44-APC conjugated (17-0441-82), Isotype Rat IgG2b control (17-4031-82), PE conjugated-anti-CD95 (2-0951-83) and PE conjugated Isotype control (12-4714-82) were from eBioscience. The Aldefluor kit (Stem Cell Technologies) was used for the staining and quantification of ALDH1 activity by flow cytometry. Gates were based on the analysis of cells treated with the specific inhibiting reagent DEAB as a negative control following the instructions by the manufacturer. For the immune histochemistry (IHC) of tumor slides samples the following primary antibodies were used F4/80 (eBioscience™ # 14-4801), CD4 (eBioscience™ #14-9766-82), CD8 (eBioscience™ #14-0195-82), pSTAT1 (Cell Signaling #9167), CD31 (Santa Cruz #sc-1506), Ly6G (BD Bioscience #551459), CD11b (Abcam #ab133357), FOXP3 (eBioscience™ #14-5773-82), and NKp46 R&D Systems, AF2225). The secondary antibodies Biotin-SP-AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (#711-065-152) and Biotin-SP-AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG (H+L) (#712-065-153) were from Jackson ImmunoResearch Laboratories.

### CRISPR/Cas9 Mediated Deletion of CD95

Generation of the CD95 k.o. U-clones: In order to generate CD95 k.o. 4T1 clones, first stably expressing lentiCas9-Blast-4T1 cell (vCas9-4T1) lines were established. The lentiCas9-Blast virus was obtained from the viral core facility of Northwestern University. 4T1 cells (10<sup>5</sup>/well) were plated in 6 well plates and on the next day cells were infected with the indicated lentiCas9-Blast virus supernatants with polybrene (final concentration: 8  $\mu$ g/ml). Culture supernatants were replaced with fresh medium containing antibiotics 48 hours after transduction. Uninfected cells were eliminated by a selection medium RPMI-1640 including 4  $\mu$ g/ml Blasticidin. The two guide RNAs for exon 9 deletion of CD95 gene GCCGGGTTTCACATCTGCGCTAGG and CTTGAGGAATCTGATGACCGTGG were designed using the CRISPR design tool available at crispr.mit.edu. The 19-20nt crisprRNA (crRNA) complementary to the target of interest and 67nt transactivating crRNA (tracrRNA), which served as a bridge between the cas9 protein and the crRNA, were ordered from IDT. vCas9-4T1 cells were transfected with crRNA and tracrRNA according the manufactures protocol using TransIT-X2 transfecting reagent (Mirus) in 12 well plates. 3 days after transfection cells were subjected to cell sorting at 1 cell per well directly into 96-well plates. After two to three weeks, single cell clones were expanded and subjected to genotyping and single cell cloning. Deletions in clones were verified by genomic PCR using external and internal primers pairs. To detect the Exon 9 specific deletion in the CD95 gene, external primers were 5'-GGAACAGACCAAGCTTCCGA-3' (For. primer) and 5'-TCCAGAACACAGCCATGGTT-3' (Rev. primer), and two internal reverse primers were 5'-

TTGAGTAAATACATCCCGAGAATTG-3' (For. primer) and 5'-AGCAAGACAACAGAGCAATAGAAAT-3' (Rev. primer) (product size 790bp) and 5'-ATGCATGACAGCATCCAAGA-3' (For. primer) and 5'-TGCTGGCAAAGAGAACACAC-3' (Rev primer) (product size 338bp). After screening clones, Sanger sequencing was performed to confirm the proper deletion had occurred.

Generation of the CD95 k.o. F-clones: The following sgRNA sequences were cloned within PX459-V2 plasmid and then transfected with lipofectamine 3000 in 4T1 to generate cell lines deficient for CD95 according to manufacturer's instructions. sgRNA sequences target mouse CD95: 5'CACCGCTGCAGACATGCTGTGGATC3' (Fwd), 5'AAACGATCCACAGCATGTCTGCAGC3' (Rev). After transfection and puromycin selection for 48h, genome-edited cells were cloned by limited dilution and CD95-deficient cells were selected by flow cytometry.

### FACS analysis

For CD95 surface-staining cell pellets of about  $10^5$  cells were resuspended in 100 ml of PBS on ice. After resuspension, 5  $\mu$ l of either anti-CD95 primary antibody or matching isotype control were added. Cells were incubated on ice at 4°C, in the dark, for 30 min, washed twice with PBS, and percent CD95 positive cells were determined by Becton Dickinson LSR Fortessa at the Flow Cytometry Core Facility of the Northwestern University. ALDH1 activity was quantified as previously described (Ceppi et al., 2014). For CD44 staining, cells were washed twice with PBS and stained with primary antibody or isotype control for 30 min at 4°C in the dark, washed twice with PBS and CD44-APC positive cells were quantified. For the analysis of *ex vivo* tumor, wt and CD95 k.o. 4T1 tumors were extracted and minced with sterile razor blades and incubated for 2 h in the presence of Collagenase (1,000 units per sample) in sterile Epicult media (Stem Cell Technology). Cells were washed with sterile filtered PBS supplemented with 1% bovine serum albumin (PBS-BSA 1%) and filtered through a 40  $\mu$ m nylon mesh (BD Biosciences). For the detection of ALDH1 or CD44, cells were stained as describe above. Data were analyzed using FlowJo version 8.8.6 (Treestar Inc).

To analyze immune cells infiltrating F-clone in Balb/c mice, tumors were harvested, dissociated on gentleMACS using the Tumor dissociation kit (Miltenyi Biotec) and cells (250,000 cells) were stained with the following antibody panels. T lymphocytes-infiltrating tumors were identified using an antibody panel consisting of CCR4-BV421, CXCR5-BV605, CD8-BV650, CXCR3-BV711, CD45-BV785, CD4-AF488, CD3-PerCP/Cy5.5, CCR6-PE/Dazzle594 antibodies and Zombie NIR for cell viability. MDSC and macrophage-infiltrating tumors were stained using CD11b-BV510, F4/80-BV605, CD45-BV785, Gr1-PE/Dazzle594, Ly6C-PE/Cy7, Ly6G-APC antibodies and Zombie NIR for cell viability. M1/M2 cells and Treg cells were monitored in permeabilized cells using FoxP3-BV421, CD11b-BV510, F4/80-BV605, CD45-BV785, CD4-AF488, CD3-PerCP/Cy5.5, CD38-PE-Dazzle594, CD25-PE/Cy7, and Zombie NIR for cell viability. All antibodies used for tumor-infiltrating immune cells came from Biolegend (San Diego, CA, USA). Data were acquired using a Novocyte cytometer (ACEA Biosciences) and analyzed using Novoexpress software.

### Sphere forming assays

The single cell sphere formation assay was performed as previously described (Qadir et. al 2017), In brief, cells were pre-treated with LzCD95L, IFN $\beta$ , or received no treatment for 6 days. Cell suspensions were passed through a 40 $\mu$ m sterile cell strainer (Fisher Scientific) to obtain single cells. The strained cell suspension was serially diluted in Mammocult media (Stem Cell

Technology) and seeded at 1 cell/well in ultra-low adherence round bottom 96-well plates (Corning) in triplicate. The cells were cultured in Mammocult media supplemented with 4 µg/ml Heparin (Stem Cell Technology), 0.5 µg/ml hydrocortisone and 10% Mammocult Proliferation Supplement (Stem Cell Technology). After 6-7 days, cultures of U-clones were scanned using IncuCyte Zoom and spheres were counted. For F-clones, spheroids were counted manually. To assess the differences between parental and CD95 k.o. 4T1 cells, the cells were seeded without any treatment.

#### **Cell growth/proliferation assay**

To monitor cell proliferation in parental, vCas9, CD95 k.o. #54 and CD95 k.o. #69 4T1 cells, cells were seeded at 1000 cells/well in 96 well plates. Cell growth was monitored in quadruplicate samples at various time points in an IncuCyte Zoom using a confluency mask. To monitor proliferation of 4T1 parental cells with LzCD95L or IFNβ, 1000 cells/well were plated in 96 well, with media containing LzCD95L or IFNβ or no treatment and cell growth was monitored over time.

For F-clones, EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) proliferation assay (Sigma-Aldrich) was carried out according to the manufacturer's instructions. Briefly, 4T1 cells were incubated for 1h with 10µM of the thymidine analog EdU, then washed and fixed with PFA (4%) for 15 min. DNA synthesis (S phase) is associated with EdU incorporation. Finally, iFluor-488, is added and a 'click' chemistry reaction allows its covalent cross-linking to the EdU. Cell proliferation (EdU positive cells) was quantified using the Novocyte flow cytometer.

#### **Cell death assays and cell cycle analysis**

To quantify cell death, 50,000 cells were plated in 12 well plates in triplicate and then either left untreated or treated with different concentration of LzCD95L for 24 hr. The total cell pellet consisting of live and dead cells was either re-suspended in lysis buffer (0.1% sodium citrate, pH 7.4, 0.05% Triton X-100, 50 µg/ml propidium iodide), and after incubating for 2-4 hours in the dark at 4°C, percent cell death was quantified by flow cytometry or cells were re-suspended in media and an equal volume of Trypan blue solution (Lonza) was added. Both living and dead (blue) cells were counted on a hemocytometer under a light microscope. To perform cell cycle analysis, 600,000 cells were plated in 6 well plates in triplicate. After 16-20 hours (at ~80% confluence), plates were gently rinsed with PBS and trypsinized to obtain cell pellets. Cell pellets were then washed (resuspended in 2.5 ml PBS, centrifuged at 500 x g for 5 minutes, and then decanted) and resuspended in 500 µl lysis buffer (see above) and kept on ice and protected from light. Immediately before FACS analysis, samples were spiked with 1:500 DAPI solution as a counterstain to assess cell viability (with corresponding no DAPI controls). Samples were then analyzed on a BD FACS Aria SORP 6-Laser Cell sorter at the RHLCCC Flow Cytometry Core Facility. Subsequent data were analyzed using FlowJo 10 software.

#### **Real-time PCR**

Real-time PCR was performed as described recently (Qadir et. al 2017). In brief, total RNA was extracted using QIAzol Lysis reagent (Qiagen Sciences) and RNA concentration was measured using a NanoDrop 2000. 1-2 µg of total RNA was used to generate cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Gene expression in mouse cells was quantified using specific primers from Life technologies for mGAPDH (Mm99999915\_g1), Exon9 specific mCD95 (Mm01204974\_m1), Exon 1-2 specific mCD95 (Mm00433237\_m1), mCD95L (Mm00438864\_m1) mSTAT1 (Mm01257286\_m1), mPLSCR1 (Mm01228223\_g1),

mBMI1, (Mm03053308\_g1), mZEB1 (Mm00495564\_m1) and mZEB2 (Mm00497196\_m1) using of the comparative  $\Delta\Delta$ CT method and expressed as fold differences.

#### **Growth of 4T1 cells in NGS and Balb/c mice**

U-clones: 4T1 vCas9 (wt) and CD95 k.o. clones #54 and #69 were infected with pFU-L2G luciferase lentivirus as previously described (Ceppi et al., 2014). Then cells ( $1 \times 10^5$ ) of wt or a 1:1 mixture of the CD95 k.o. clones were injected in 100  $\mu$ l PBS and Matrigel (Cat#3432-010-01, Trevigen) (1:1 ratio) into the fourth mammary fat pad at the base of the nipple into female NOD-scid-gamma (NSG) mice and Balb/c mice (Jackson lab) according to the Northwestern University Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)-approved protocol. Growth of tumors was monitored weekly by using an IVIS Spectrum *in vivo* imaging system and luminescence was quantified at the regions of interest (ROI = the same area for each mouse encompassing the entire mammary gland) using the Living Image software. For some experiments L2G luciferase (Luc-neo) infected cells were further infected with NuLight Red Lentivirus Reagent (EF-1 alpha promoter, Puromycin selection, Essen Bioscience) and the stable cells were individually injected into the fourth mammary. Wild-type and k.o. cells were injected into the same mouse. In other experiments 4T1 CD95 k.o. #54 cells ( $1 \times 10^5$ ) (Luc-neo/Nuc-red) and CD95 k.o. #69 cells (Luc-neo/Nuc-red) were injected into same mouse. To grow F-clones *in vivo*:  $5 \times 10^4$  cells in PBS were injected in the fourth mammary fat pad at the base of the nipple into female Balb/c (Charles River, France). From Day 6, tumor volume was measured with a set of calipers and calculated by using the following formula: volume = (length $\times$ width<sup>2</sup>)/2. A colony of immunocompromised NSG mice (NOD/SCID/IL2r $\gamma$ null) was maintained in house under aseptic sterile conditions. The study was conducted under EU and French animal welfare regulations for animal use in experimentation (European Directive 2010/63/EU and French decree and orders of February 1st, 2013) and approved by local ethics committee (Agreement no. #16487-2018082108541206 v3). After two weeks of injection, tumor volume was measured with a set of calipers and calculated by using the following formula: volume = (length $\times$ width<sup>2</sup>)/2.

#### **Depletion of immune cells in mice**

To deplete CD8 T cells mice (5 mice/group) were injected i.p. with 200  $\mu$ g of either anti-mouse CD8 mAb (clone 53-6.7, BioXCell) or IgG2a isotype control (2A3, BioXCell) both in 100  $\mu$ l. To deplete CD4 T cells mice (5 mice/group) were injected i.p. with 200  $\mu$ g of either anti-mouse CD4 mAb (GK1.5, BioXCell) or IgG2b isotype control (2.43, BioXCell) both in 100  $\mu$ l. To deplete NK cells mice (5 mice/group) were injected i.p. with 50  $\mu$ g of either anti-Asialo GM1 rabbit polyclonal antibody (ThermoFisher) or polyclonal rabbit IgG (ThermoFisher) both in 100  $\mu$ l. To inhibit CSF1-R mice (5 mice/group) were injected i.p. with 20 mg/kg of either anti-mouse CSF1-R mAb (clone AFS98, BioXcell) or control rat IgG2a (BioXcell) both in 100  $\mu$ l. Injection frequencies are shown in **Fig. S5**.

#### **Immunohistochemistry analysis**

Tumors were fixed in 10% Normal Buffered Formalin (VWR, Cat.No.: 16004-128) for 24 hrs, and further processed by the Northwestern University Mouse Histology & Phenotyping Laboratory (MHPL) (paraffin embedding, sectioning at 4  $\mu$ m, slide preparation, and staining). Tissue sections of each specimen were stained using hematoxylin and Eosin (H&E) staining. The expression of F4/80, CD4, CD8, pSTAT1, CD31, FOXP3, Ly6G, CD11b, and NKp46 was determined in tumor and/or spleen slides. Paraffin sections were dewaxed and blocked with 5% BSA. The sections were then incubated with the relevant antibodies at 4°C overnight. The sections were washed with PBS.

For immunohistochemical analysis, sections were incubated with donkey anti-rabbit or donkey anti-rat antibody. Slides were examined and representative fields were photographed at 5x or 20x magnification using a Leica DM4000 B microscope. The immune-positive cells and staining intensities were quantified in a circle that was placed in each staining at the same position in a tumor of the 5x images. For each tumor and condition 8 fields were counted.

### **IHC quantification**

All stained slides on standard size (26 mm x 76 mm) were scanned using NanoZoomer 2.0-HT (020234 by Olympus America Inc.) with scanning mode of x20 (0.46  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ ) either automatic or semi-automatic set up under SOP (MICR 1.1.03) at the department of Pathology and RHLCCC Core Facility of Northwestern University. The digital images were then stored as high definition and were analyzed with NDP (NanoZoomer Digital Pathology, Hamamatsu Inc.) View software (<https://www.hamamatsu.com/us/en/product/type/U12388-01/index.html>) for quantification analysis. For identification of individual nuclei in the tissue, we trained a Cell Classifier in the Visiopharm Image analysis Suite (VIS, Horsholm, Denmark) by manually annotating exemplar nuclei that were positive and negative for DAB (DAB+ and DAB-, respectively). Once the Cell Classifier was trained, we applied the trained Cell Classifier to all images to generate counts of DAB+ and DAB- nuclei and calculate a percent positive index. Three sets of tumors and one set of spleens were analyzed for Ly6G, CD11b and TUNEL staining; in set 1 the entire tumor of multiple slides from 4T1 wt and CD95 k.o. in BALB/c mice were scanned, average percent positive cells for Ly6G and CD11 were determined. In set 2, either the entire tumor or 3 selected independent fields from pure tumor in multiple slides were quantified as average percent positive cells for TUNEL stain from 4T1 wt and CD95 k.o. in BALB/c mice treated with IgG or anti-CD8 Ab. Set 3 included the quantification of Ly6G staining in the entire tumor of multiple slides from 4T1 wt and CD95 k.o. tumors in NSG mice. Set 4 was the quantification of CD8, CD4, or NKp46 positive cells in spleens of depleted mice.

### **RNA-seq library construction from cell lines grown *in vitro***

Total RNAs from cells were extracted using TRIzol (Invitrogen 15596018). mRNAs were enriched using Oligo d(T)25 Magnetic Beads (NEB S1419S) following manufacturer's protocol. mRNAs were then fragmented at 94 °C in 10mM MgCl<sub>2</sub> buffer. Fragmented RNAs were end-repaired by T4 PNK (NEB M0201S) and poly(A)-tailed by E. coli Poly(A) Polymerase (NEB M0276S). The poly(A) tailed RNA fragments were reverse transcribed to cDNA using custom-designed oligo(dT) and locked nucleic acid (LNA) based on SMART-seq2 method [62]. The cDNAs were then PCR amplified using KAPA HiFi HotStart master mix (KK2601). 200-400 bp fragments of the library were cut from gels for Illumina Hiseq sequencing.

### **RNA-seq library construction from tumors grown *in vivo***

For the RNA sequencing wt and CD95 k.o. 4T1 tumors were isolated from NGS and Balb/c mice and tumor tissues were store in RNA later solution until further use. For RNA isolation tumor tissue was lysed using Qiazol and total RNA was isolated using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Cat.No# 74004) following the manufacturer's instructions. An on-column digestion step using the RNase-free DNase Set (Qiagen, Cat.No# 79254) was included for all RNA-Seq samples. RNA libraries were generated and sequenced (Genomics Core at Northwestern University). The quality of reads, in FASTQ format, was evaluated using FastQC. Reads were trimmed to remove Illumina adapters from the 3' ends using cutadapt [63]. Trimmed reads were aligned to the mouse genome (m38/mm10) using STAR [64]. Read counts for each gene were calculated using htseq-count [65] in conjunction with a gene annotation file for m38 obtained from Ensembl

(<http://useast.ensembl.org/index.html>). Normalization and differential expression were calculated using DESeq2 that employs the Wald test [66]. The cutoff for determining significantly differentially expressed genes was an FDR-adjusted p-value less than 0.05 using the Benjamini-Hochberg method.

#### **RNA-seq and gene ontology data analysis**

We used the first end of the sequencing reads for the analyses. The raw reads were filtered to remove low-quality reads using FASTQ Quality Filter from FASTX-Toolkit v0.0.14 (RRID:SCR\_005534). High-quality reads were then mapped to the mouse reference genome (mm10) using STAR v2.6.0 (RRID:SCR\_015899) with the following options to generate BAM files, count files, and read coverage tracks: --outSAMtype BAM SortedByCoordinate --quantMode TranscriptomeSAM GeneCounts --outWigType bedGraph --outWigNorm RPM. The transcriptomic BAM file was used to quantify gene expression using RSEM v1.3.0 (RRID:SCR\_013027). Differential gene expression analysis was carried out on the gene counts using DESeq2 (RRID:SCR\_015687). Gene expression ( $\log_2(\text{TPM} + 1)$ ) was normalized to the mean of the corresponding control samples and significantly differentially expressed genes (DESeq2 adjusted p-value < 0.05) were clustered into 6 groups using k-means clustering. Gene ontology analysis was performed for each cluster using the TopGO package (RRID:SCR\_014798). Heatmaps were created with the pheatmap package v1.0.12 (RRID:SCR\_016418). All analyses were carried out using R v3.6.3 (RRID:SCR\_001905). The GO enrichment analyses shown in Fig. 3B was performed using the GOrilla gene ontology analysis tool at <http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il> using default settings and a p-value cut-off of  $10^{-6}$ .

#### **Statistical methods**

All experiments were performed in triplicate. The results were expressed as mean  $\pm$  SD and analyzed by the Student's two-tailed t test or by ANOVA (Prism8). Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

**Data availability.** Sequencing data have been deposited in the National Cancer for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus with accession number GSE154676 (for the RNAseq analysis of the cell lines) and GSE154682 (for the RNAseq data of the tumors grown in mice).

#### **Acknowledgement**

U-clones: We would like to thank Shanshan Zhang for performing slide scanning and signal quantification and Michelle von Locquenhien for help with the generation of the 4T1 CD95 k.o. clones. F-clones: We would like to thank the IHC facility (Dr Alain Fautrel and Roselyne Viel, Rennes, France) for performing 4T1 tissue staining, slide scanning and signal quantification. This mouse study in NSG mice benefited from the help of Remy Castellano and Emmanuelle Josselin (Marseille, France). This work was funded by grant R35CA197450 to M.E.P, by INCa (PLBIO18-059), Ligue Contre le Cancer and Fondation de France (Price Jean Valade) for P.L. and by Lynn Sage Cancer Research Foundation and Lynn Sage Scholar fund for Z.J.

#### **Author contributions**

A.S.Q., J.P.G., C.G., E.C-J, A.B., V.L., T. M-R., P.L., Z.J. and M.E.P. planned the experiments. A.S.Q., J.P.G., C.L., H.B., E.S., A.C., J.V., M.J.S., M.M., A.E.M, and B.B. performed experiments or analyzed data. P.L. and M.E.P. directed the study and wrote the manuscript.

#### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

Figure 1

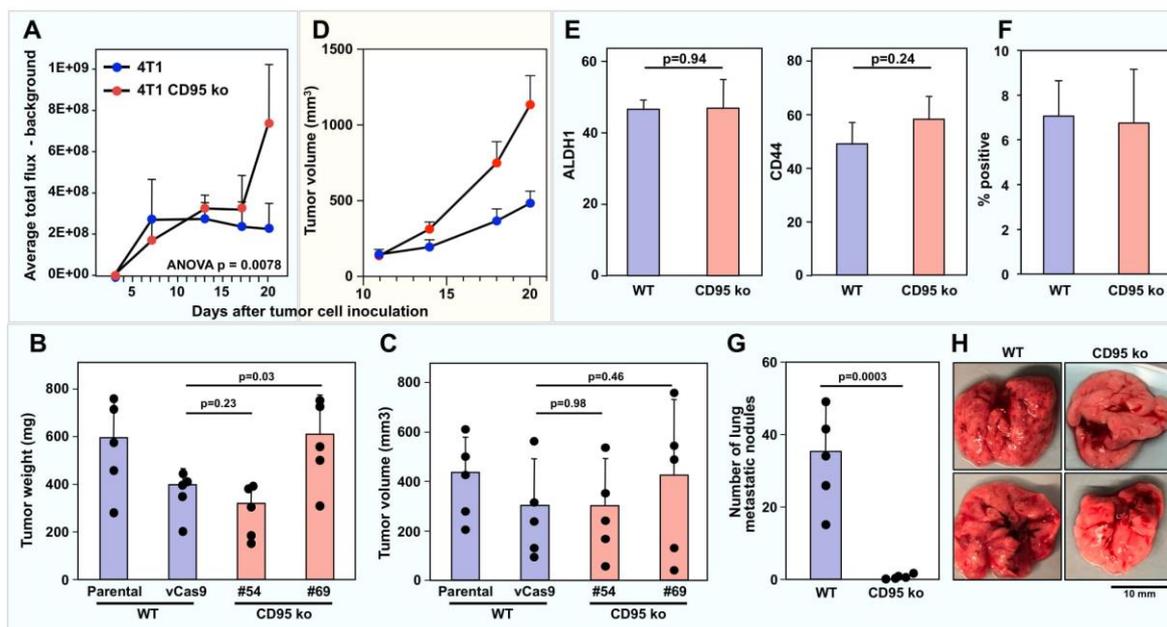


Figure 2

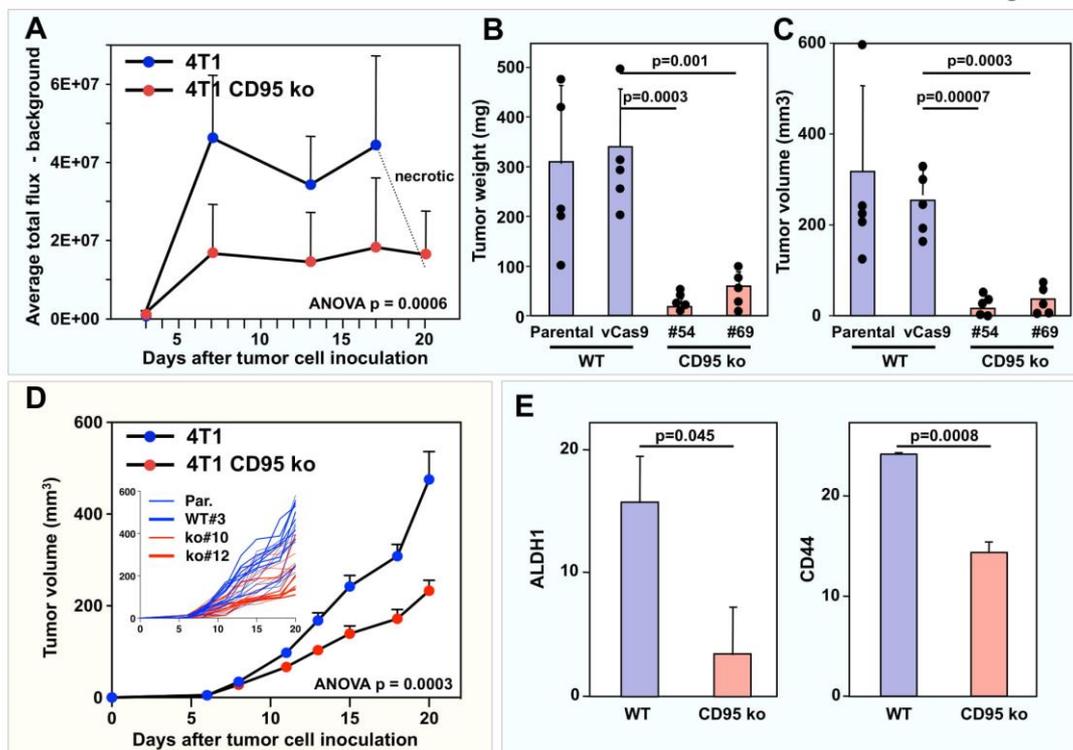


Figure 3

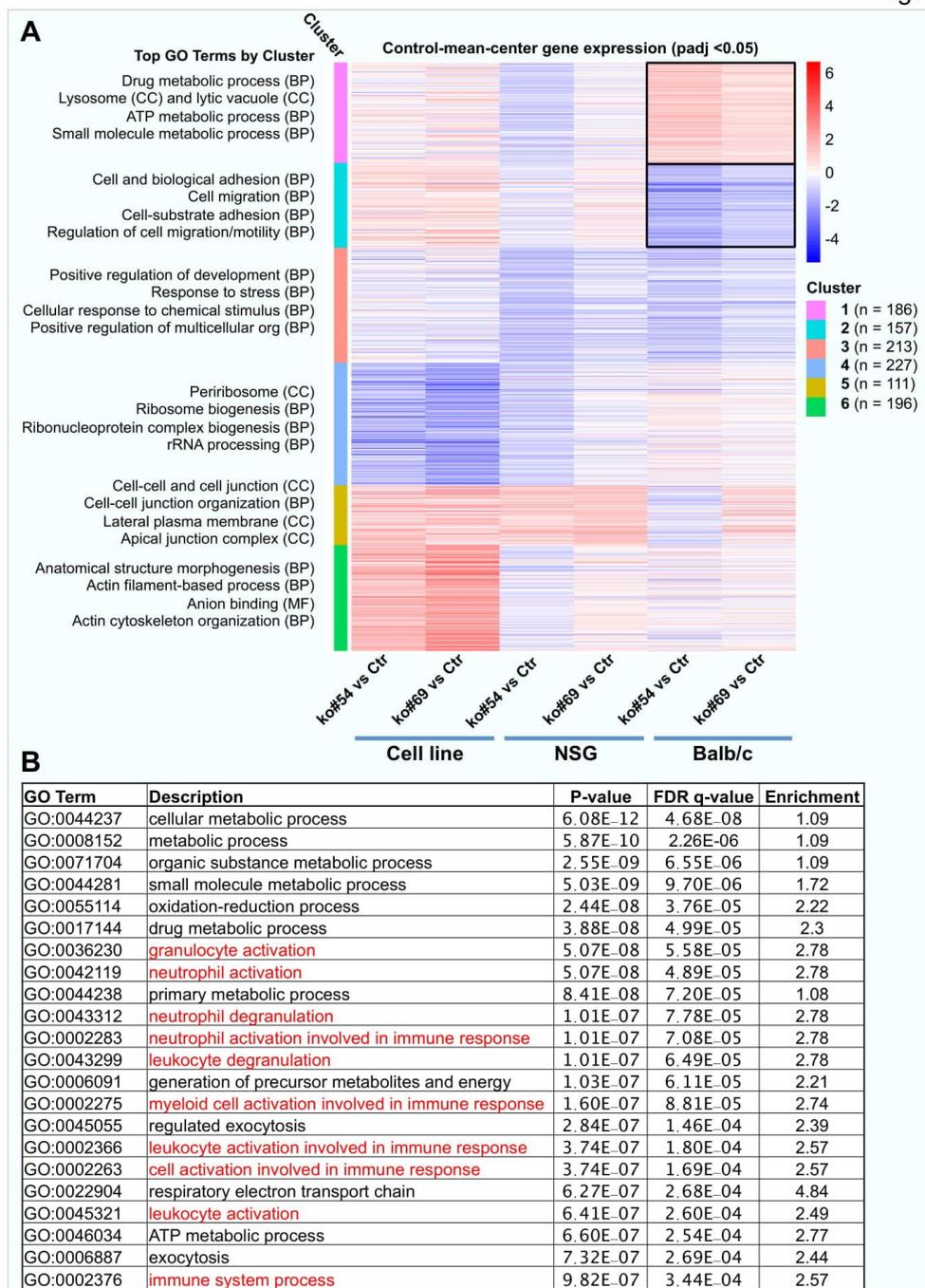


Figure 4

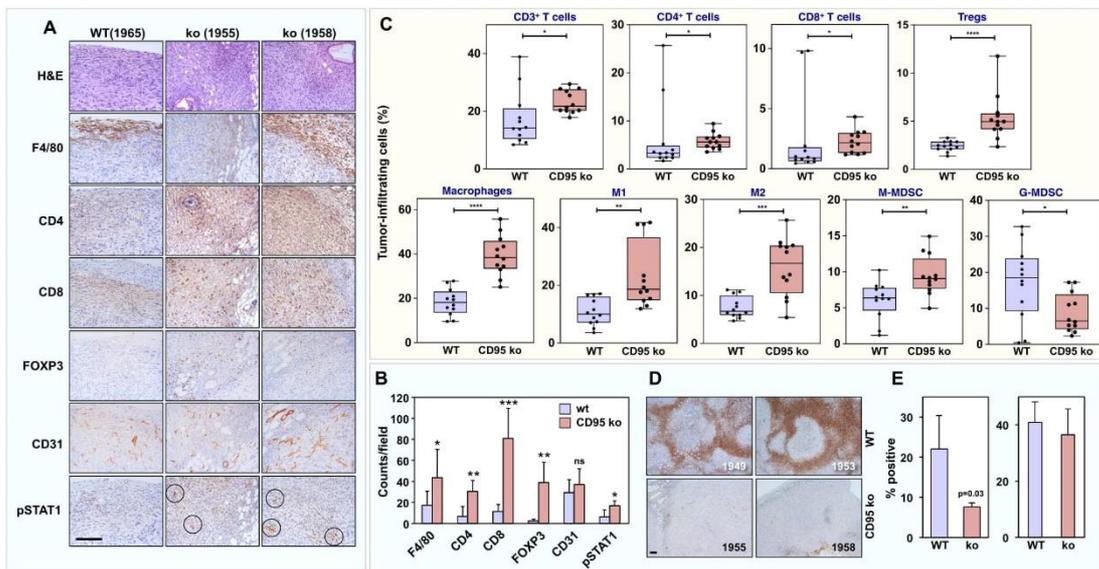
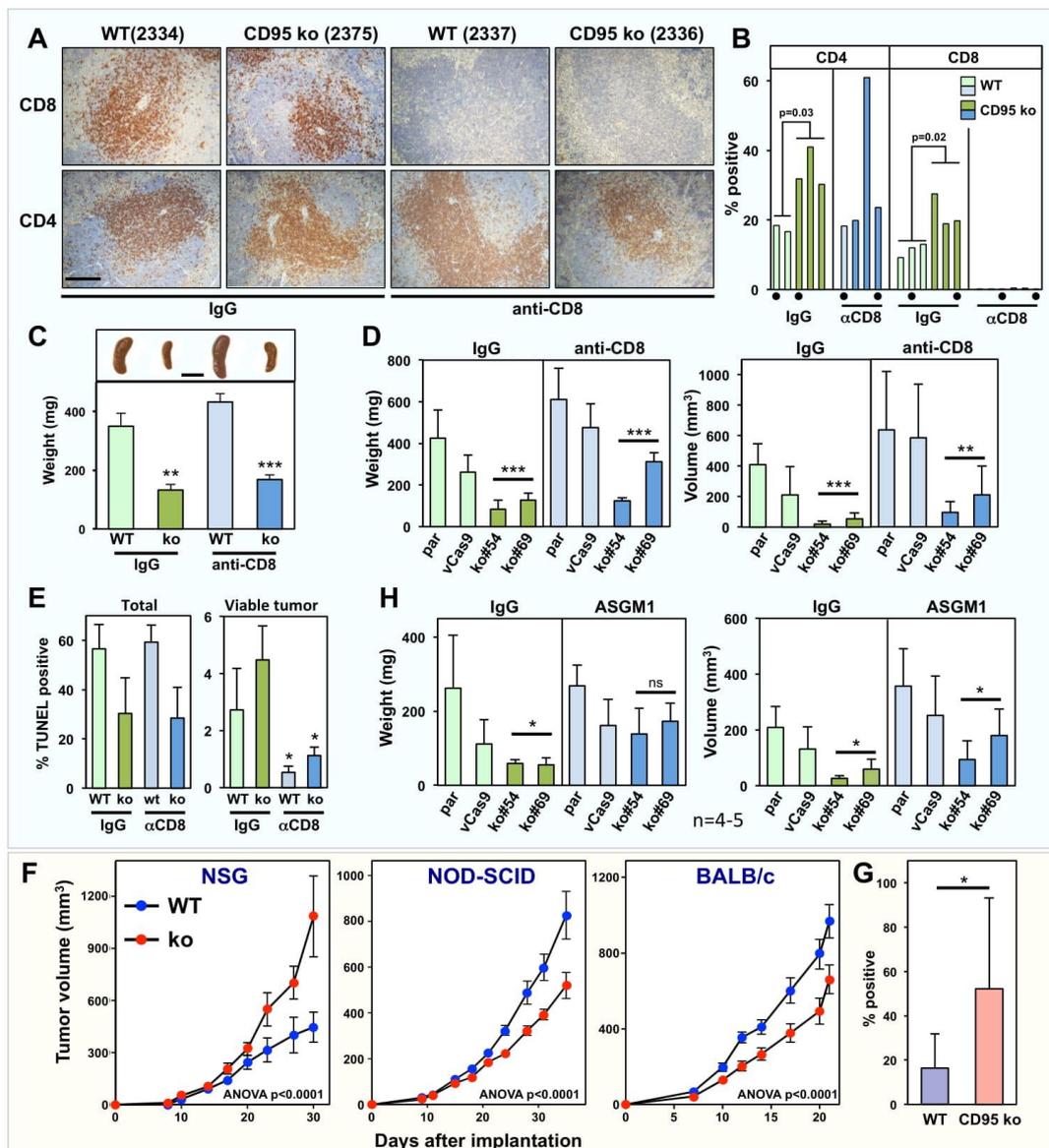


Figure 5



### Figure legends

#### Figure 1. Deletion of CD95 in 4T1 cells does not inhibit tumor growth in NSG mice but blocks lung metastasis.

- A** Wild-type (cCas9) or CD95 k.o. 4T1 (mixture of clones #54 and #69) cells ( $10^5$ ) were injected into the fat pad of NSG mice. Bioluminescence of tumors was quantified at the indicated times after injection of cells. p-value was calculated using two-way ANOVA.
- B, C** Equal numbers of WT (Parental or vCas9) or CD95 k.o. (#54 or #69) 4T1 cells were transplanted into the mammary fat pad of NSG mice, and tumor weight (**B**) and tumor volume (**C**) was measured after two weeks. Data are presented as means  $\pm$  SEM; n = 5 tumors for each group.
- D** Wild-type (mixture of clones #3 and #4) or CD95 k.o. 4T1 (mixture of clones #10 and #12) cells ( $10^5$ ) were injected into the mammary fat pad of NSG mice and tumor volume was measured using a caliper. p-value was calculated using ANOVA.
- E** ALDH1 activity and CD44 surface staining of single cells suspensions of tumors isolated from NSG mice.
- F** IHC quantification of Ly6G positive cells in the wt and CD95 k.o. tumors monitored in B.
- G** Equal numbers of WT (Parental or vCas9) or CD95 k.o. (1:1 mixture of #54 or #69) 4T1 cells were transplanted into the mammary fat pad of NSG mice, and tumor nodules of the primary tumor on the surface of the lungs were counted two weeks after transplantation. Data are presented as means  $\pm$  SEM; n = 5 tumors in each group.
- H** The appearance of representative lungs analyzed in G.
- Experiments involving U-clones are in a light blue box and experiments involving F-clones are in a light yellow box, respectively.

#### Figure 2. Deletion of CD95 in 4T1 cells inhibits tumor growth and cancer stemness in Balb/c mice.

- A** Luciferase expressing wild-type (cCas9) or CD95 k.o. 4T1 (mixture of two k.o. clones) cells ( $10^5$ ) were injected into the fat pad of Balb/c mice (5 mice per group). Bioluminescence of tumors was quantified at the indicated times after injection of cells. p-value was calculated using ANOVA.
- B, C** Equal numbers of unmodified WT (Parental or vCas9) or CD95 k.o. (#54 or #69) 4T1 cells were transplanted into the mammary fat pad of Balb/c mice, and tumor weight (**B**) and tumor volume (**C**) was measured after two weeks. Data are presented as means  $\pm$  SEM; n = 5 tumors for each group.
- D** Parental, wt (#3) and two CD95 k.o. (#10 and #12) 4T1 cells ( $10^5$  cells) were injected into the mammary fat pad of Balb/c mice (8 mice per group) and tumor volume was measured using a caliper. p-value was calculated using two-way ANOVA. Insert shows the growth of the individual tumors.
- E** ALDH1 activity and CD44 surface staining of single cells suspensions of tumors isolated from BALB/c mice.

#### Figure 3. Identification of genes selectively upregulated in the CD95 k.o. tumors grown in immunocompetent mice.

- A** Heatmap of control-normalized gene expression for significantly differentially expressed genes adjusted for the average expression in the respective control samples (DESeq2 adjusted *P*-value < 0.05). Genes were clustered using k-means with 6 clusters. The most enriched gene ontology terms for each cluster are shown to the left.

**B** GOrilla analysis of a ranked list of the genes differentially expressed in the CD95 k.o. versus the wt cells shown in A. Data were ranked according to the highest difference between the fold upregulation of genes in k.o. versus wt tumors in Balb/c and NSG mice. GO terms associated with immune infiltration and activation are shown in red. Experiments were performed with the U-clones.

**Figure 4. CD95 loss in TNBC cells increases general immune cell infiltration with only G-MDSCs being reduced when compared to wt tumors.**

- A** WT or CD95 k.o. 4T1 cells were injected into the mammary fat pad of BALB/c mice. Mice were sacrificed when tumors reached maximum allowed size or signs of ulceration were evident. Representative tumor sections of one mouse grafted with wt (1965) and two mice grafted with k.o. cancer cells (1955, 1958) stained with hematoxylin and eosin (H&E) or with antibody specific for mouse macrophages (F4/80), T-cells (CD4, CD8, FOXP3), endothelial cells (CD31), or pSTAT1. Representative images of the immuno-histochemical analysis and H&E staining are shown.
- B** The staining intensity of F4/80, CD4, CD8, pSTAT1, CD31 and FOXP3 was quantified. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). p-value \* $<0.05$ , \*\* $<0.001$ ; \*\*\* $<0.0001$ ; ns, not significant.
- C** After 21 days, tumors grown in Fig. 2D were resected and dissociated. Tumor-infiltrating cells including macrophages (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>); whole CD3<sup>+</sup> T-cell population, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-cells and Treg (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>), subsets; M1, (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>), M2 (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>); M-MDSC (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>) and G-MDSC (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup>Ly6G<sup>+</sup>) were quantified by multiparameter flow cytometry with the indicated combination of markers.
- D** Representative tumor sections of two mice injected with wt (1963, 1949) and two mice injected with k.o. cancer cells (1955, 1958) (all at 5x) stained for Ly6G.
- E** IHC quantification of Ly6G positive cells (left, examples shown in D) and CD11b (right) in the wt and CD95 k.o. tumors shown in B. Scale bars = 50  $\mu$ m.

**Figure 5: Depletion of NK cells but not of CD8<sup>+</sup> T cells reverse the growth defect of CD95 k.o. cells in immune competent mice.**

- A** Representative IHC images (10x) of spleens from mice treated with either isotype matched control antibody or anti-CD8 as indicated in A and stained for CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells. Scale bar = 50  $\mu$ m.
- B** Quantification of CD4 and CD8 T cells in the spleen of mice treated with either IgG or anti-CD8. Values labeled by a dot correspond to the images shown in A.
- C** *Top*, Representative images of spleens of treated mice. *Bottom*, average spleen weight of treated mice ( $n=3$ ). Scale bar = 1 cm.
- D** Tumor weight (left) and tumor volume (right) in anti-CD8-treated mice ( $n=5$ ) 16 days after tumor injection.
- E** IHC quantification of TUNEL staining of sections of wt and k.o. tumors in mice treated as in D.
- F** Tumor growth of a mix of wt 4T1 cells and a CD95 k.o. clone #4 in three different mouse strains. p-values were calculated using two-way ANOVA.
- G** IHC quantification of NKp46 positive NK cells in the wt and CD95 k.o. tumors grown in NOD-SCID mice shown in F.
- H** Tumor weight (left) and tumor volume (right) in anti-Asialo GM1-treated mice ( $n=5$ ) 16 days after tumor injection.

p-value \* $<0.05$ ; \*\* $<0.001$ ; \*\*\* $<0.0001$ . ns, not significant.

## References

1. Chen L, Park SM, Tumanov AV, Hau A, Sawada K, Feig C, Turner JR, Fu YX, Romero IL, Lengyel E, *et al.* (2010) CD95 promotes tumour growth. *Nature* **465**: 492-6
2. Hadji A, Ceppi P, Murmann AE, Brockway S, Pattanayak A, Bhinder B, Hau A, De Chant S, Parimi V, Kolesza P, *et al.* (2014) Death induced by CD95 or CD95 ligand elimination. *Cell Reports* **10**: 208-222
3. Krammer PH (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**: 789-95
4. Nagata S (1999) Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* **33**: 29-55
5. Peter ME, Barnhart BC, Algeciras-Schimmich A (2003) *CD95L/FasL and its receptor CD95 (APO-1/Fas)*. Academic Press, London
6. Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber AO, Newell MK, Owen LB, Pope RM, Tschopp J, Wajant H, *et al.* (2007) The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell* **129**: 447-50
7. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003) Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**: 53-66
8. Guegan JP, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Ducret T, Quignard JF, Vacher P, Legembre P (2020) CD95/Fas and metastatic disease: What does not kill you makes you stronger. *Semin Cancer Biol* **60**: 121-131
9. Peter ME, Hadji A, Murmann AE, Brockway S, Putzbach W, Pattanayak A, Ceppi P (2015) The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ* **22**: 885-6
10. Martin-Villalba A, Llorens-Bobadilla E, Wollny D (2013) CD95 in cancer: tool or target? *Trends Mol Med* **19**: 329-335
11. DeSantis CE, Fedewa SA, Goding Sauer A, Kramer JL, Smith RA, Jemal A (2016) Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA Cancer J Clin* **66**: 31-42
12. Christofori G (2006) New signals from the invasive front. *Nature* **441**: 444-50
13. Kreso A, Dick JE (2014) Evolution of the cancer stem cell model. *Cell stem cell* **14**: 275-91
14. Qadir AS, Ceppi P, Brockway S, Law C, Mu L, Khodarev NN, Kim J, Zhao JC, Putzbach W, Murmann AE, *et al.* (2017) CD95/Fas Increases Stemness in Cancer Cells by Inducing a STAT1-Dependent Type I Interferon Response. *Cell Rep* **18**: 2373-2386
15. Qadir AS, Stults AM, Murmann AE, Peter ME (2020) The mechanism of how CD95/Fas activates the Type I IFN/STAT1 axis, driving cancer stemness in breast cancer. *Sci Rep* **10**: 1310
16. Strasser A, Jost PJ, Nagata S (2009) The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* **30**: 180-92
17. Blok EJ, van den Bulk J, Dekker-Ensink NG, Derr R, Kanters C, Bastiaannet E, Kroep JR, van de Velde CJ, Kuppen PJ (2017) Combined evaluation of the FAS cell surface death receptor and CD8+ tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic biomarker in breast cancer. *Oncotarget* **8**: 15610-15620
18. Marvel D, Gabrilovich DI (2015) Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J Clin Invest* **125**: 3356-64
19. Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, Bronte V (2010) Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol* **22**: 238-44

20. Ugel S, De Sanctis F, Mandruzzato S, Bronte V (2015) Tumor-induced myeloid deviation: when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages. *J Clin Invest* **125**: 3365-76
21. Gabrilovich DI (2017) Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res* **5**: 3-8
22. Markowitz J, Wesolowski R, Papenfuss T, Brooks TR, Carson WE, 3rd (2013) Myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **140**: 13-21
23. Putzbach W, Haluck-Kangas A, Gao QQ, Sarshad AA, Bartom ET, Stults A, Qadir AS, Hafner M, Peter ME (2018) CD95/Fas ligand mRNA is toxic to cells. *eLife* **7**: e38621
24. Aslakson CJ, Miller FR (1992) Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res* **52**: 1399-405
25. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL (2007) Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* **7**: 118-30
26. Lelekakis M, Moseley JM, Martin TJ, Hards D, Williams E, Ho P, Lowen D, Javni J, Miller FR, Slavin J, et al. (1999) A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin Exp Metastasis* **17**: 163-70
27. Barnhart BC, Legembre P, Pietras E, Bubici C, Franzoso G, Peter ME (2004) CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *EMBO J* **23**: 3175-85
28. Malleter M, Tautzin S, Bessede A, Castellano R, Goubard A, Godey F, Leveque J, Jezequel P, Campion L, Campone M, et al. (2013) CD95L cell surface cleavage triggers a prometastatic signaling pathway in triple-negative breast cancer. *Cancer Res* **73**: 6711-21
29. Baklaushev VP, Kilpelainen A, Petkov S, Abakumov MA, Grinenko NF, Yusubalieva GM, Latanova AA, Gubskiy IL, Zabozaev FG, Starodubova ES, et al. (2017) Luciferase Expression Allows Bioluminescence Imaging But Imposes Limitations on the Orthotopic Mouse (4T1) Model of Breast Cancer. *Sci Rep* **7**: 7715
30. Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, Ruiz-Rosado Jde D, Popovich PG, Partida-Sanchez S, Guerau-de-Arellano M (2015) Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS One* **10**: e0145342
31. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, Blows FM, Liu B, Shah M, Earl HM, Poole CJ, Hiller L, Dunn JA, et al. (2014) Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. *Ann Oncol*
32. Ali HR, Chlon L, Pharoah PD, Markowitz F, Caldas C (2016) Patterns of Immune Infiltration in Breast Cancer and Their Clinical Implications: A Gene-Expression-Based Retrospective Study. *PLoS medicine* **13**: e1002194
33. Ibrahim EM, Al-Foheidi ME, Al-Mansour MM, Kazkaz GA (2014) The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* **148**: 467-76
34. Priceman SJ, Sung JL, Shaposhnik Z, Burton JB, Torres-Collado AX, Moughon DL, Johnson M, Lusic AJ, Cohen DA, Iruela-Arispe ML, et al. (2010) Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy. *Blood* **115**: 1461-71
35. Ries CH, Cannarile MA, Hoves S, Benz J, Wartha K, Runza V, Rey-Giraud F, Pradel LP, Feuerhake F, Klamann I, et al. (2014) Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer Cell* **25**: 846-59

36. Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, Greiner DL (2012) Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol* **12**: 786-98
37. Presa M, Chen YG, Grier AE, Leiter EH, Brehm MA, Greiner DL, Shultz LD, Serreze DV (2015) The Presence and Preferential Activation of Regulatory T Cells Diminish Adoptive Transfer of Autoimmune Diabetes by Polyclonal Nonobese Diabetic (NOD) T Cell Effectors into NSG versus NOD-scid Mice. *J Immunol* **195**: 3011-9
38. Ceppi P, Hadji A, Kohlhapp F, Pattanayak A, Hau A, Xia L, Liu H, Murmann AE, Peter ME (2014) CD95 and CD95L promote and protect cancer stem cells. *Nature Commun* **5**: 5238
39. Miller FR, Miller BE, Heppner GH (1983) Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. *Invasion & metastasis* **3**: 22-31
40. Liu Q, Tan Q, Zheng Y, Chen K, Qian C, Li N, Wang Q, Cao X (2014) Blockade of Fas signaling in breast cancer cells suppresses tumor growth and metastasis via disruption of Fas signaling-initiated cancer-related inflammation. *J Biol Chem* **289**: 11522-35
41. Ouzounova M, Lee E, Piranlioglu R, El Andaloussi A, Kolhe R, Demirci MF, Marasco D, Asm I, Chadli A, Hassan KA, *et al.* (2017) Monocytic and granulocytic myeloid derived suppressor cells differentially regulate spatiotemporal tumour plasticity during metastatic cascade. *Nat Commun* **8**: 14979
42. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI (2008) Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* **181**: 5791-802
43. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, Johnston J, Madden K, Xu W, West J, *et al.* (2000) Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* **408**: 57-63
44. Takaki R, Hayakawa Y, Nelson A, Sivakumar PV, Hughes S, Smyth MJ, Lanier LL (2005) IL-21 enhances tumor rejection through a NKG2D-dependent mechanism. *J Immunol* **175**: 2167-73
45. Ascierto ML, Idowu MO, Zhao Y, Khalak H, Payne KK, Wang XY, Dumur CI, Bedognetti D, Tomei S, Ascierto PA, *et al.* (2013) Molecular signatures mostly associated with NK cells are predictive of relapse free survival in breast cancer patients. *J Transl Med* **11**: 145
46. Briggs LC, *et al.* IKKgamma-mimetic peptides block the resistance to apoptosis associated with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection. *J Virol.* 2017;91(23). In
47. Cai Z, Yang F, Yu L, Yu Z, Jiang L, Wang Q, Yang Y, Wang L, Cao X, Wang J (2012) Activated T cell exosomes promote tumor invasion via Fas signaling pathway. *J Immunol* **188**: 5954-61
48. Hoogwater FJ, Nijkamp MW, Smakman N, Steller EJ, Emmink BL, Westendorp BF, Raats DA, Sprick MR, Schaefer U, Van Houdt WJ, *et al.* (2010) Oncogenic K-Ras turns death receptors into metastasis-promoting receptors in human and mouse colorectal cancer cells. *Gastroenterology* **138**: 2357-67
49. Letellier E, Kumar S, Sancho-Martinez I, Krauth S, Funke-Kaiser A, Laudenklos S, Konecki K, Klussmann S, Corsini NS, Kleber S, *et al.* (2010) CD95-ligand on peripheral myeloid cells activates Syk kinase to trigger their recruitment to the inflammatory site. *Immunity* **32**: 240-52
50. Lin HC, Lai PY, Lin YP, Huang JY, Yang BC (2012) Fas ligand enhances malignant behavior of tumor cells through interaction with Met, hepatocyte growth factor receptor, in lipid rafts. *J Biol Chem* **287**: 20664-73

51. Teodorczyk M, Kleber S, Wollny D, Sefrin JP, Aykut B, Mateos A, Herhaus P, Sancho-Martinez I, Hill O, Gieffers C, *et al.* (2015) CD95 promotes metastatic spread via Sck in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Death Differ* **22**: 1192-202
52. Trauzold A, Roder C, Sipos B, Karsten K, Arlt A, Jiang P, Martin-Subero JI, Siegmund D, Muerkoster S, Pagerols-Raluy L, *et al.* (2005) CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells. *FASEB J* **19**: 620-2
53. Zheng HX, Cai YD, Wang YD, Cui XB, Xie TT, Li WJ, Peng L, Zhang Y, Wang ZQ, Wang J, *et al.* (2013) Fas signaling promotes motility and metastasis through epithelial-mesenchymal transition in gastrointestinal cancer. *Oncogene* **32**: 1183-92
54. Putzbach W, Gao QQ, Patel M, van Dongen S, Haluck-Kangas A, Sarshad AA, Bartom E, Kim KY, Scholtens DM, Hafner M, *et al.* (2017) Many si/shRNAs can kill cancer cells by targeting multiple survival genes through an off-target mechanism. *eLife* **6**: e29702
55. Li H, Fan X, Stoicov C, Liu JH, Zubair S, Tsai E, Ste Marie R, Wang TC, Lyle S, Kurt-Jones E, *et al.* (2009) Human and mouse colon cancer utilizes CD95 signaling for local growth and metastatic spread to liver. *Gastroenterology* **137**: 934-44
56. Mapara MY, Bargou R, Zugck C, Dohner H, Ustaoglu F, Jonker RR, Krammer PH, Dorken B (1993) APO-1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: correlation with bcl-2 oncogene expression. *Eur J Immunol* **23**: 702-8
57. Drachsler M, Kleber S, Mateos A, Volk K, Mohr N, Chen S, Cirovic B, Tuttenberg J, Gieffers C, Sykora J, *et al.* (2016) CD95 maintains stem cell-like and non-classical EMT programs in primary human glioblastoma cells. *Cell Death Dis* **7**: e2209
58. Sinha P, Chornoguz O, Clements VK, Artemenko KA, Zubarev RA, Ostrand-Rosenberg S (2011) Myeloid-derived suppressor cells express the death receptor Fas and apoptose in response to T cell-expressed FasL. *Blood* **117**: 5381-90
59. Wick W, Fricke H, Junge K, Kobayakov G, Martens T, Heese O, Wiestler B, Schliesser MG, von Deimling A, Pichler J, *et al.* (2014) A phase II, randomized, study of weekly APG101+reirradiation versus reirradiation in progressive glioblastoma. *Clin Cancer Res* **20**: 6304-13
60. Wick W, Dettmer S, Berberich A, Kessler T, Karapanagiotou-Schenkel I, Wick A, Winkler F, Pfaff E, Brors B, Debus J, *et al.* (2019) N2M2 (NOA-20) phase I/II trial of molecularly matched targeted therapies plus radiotherapy in patients with newly diagnosed non-MGMT hypermethylated glioblastoma. *Neuro Oncol* **21**: 95-105
61. Wick W, Krendyukov A, Junge K, Hoyer T, Fricke H (2019) Longitudinal analysis of quality of life following treatment with Asunercept plus reirradiation versus reirradiation in progressive glioblastoma patients. *J Neurooncol* **145**: 531-540
62. Picelli S, Faridani OR, Bjorklund AK, Winberg G, Sagasser S, Sandberg R (2014) Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc* **9**: 171-81
63. Martin M (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnetjournal* **17**
64. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**: 15-21
65. Anders S, Pyl PT, Huber W (2015) HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**: 166-9
66. Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**: 550

## 4. Discussion

Dans les cancers du sein triple négatifs localisés, il avait été montré qu'un taux élevé de sCD95L présentait un caractère pronostic négatif. Etant donné les similitudes entre ces cancers et les cancers de l'ovaire séreux de haut grade, nous avons postulé que des résultats similaires pourraient être observés dans ce dernier modèle. Nous avons été surpris de constater au contraire un effet inverse dans les cancers de l'ovaire séreux de haut grade. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette contradiction. D'un point de vue clinique, déjà, il faut noter que les situations sont assez différentes : en effet, d'un côté, nous avons des cancers du sein de faible volume, localisés et de l'autre des cancers de l'ovaire avancés, avec un volume tumoral très élevé. Donc la cinétique tumorale pourrait expliquer en partie les différences observées. Dans la littérature, le caractère pronostic de sCD95L dans les cancers n'a pas fait l'objet de nombreuses études. Il semble exister une corrélation du niveau de sCD95L avec le stade tumoral, mais à stades équivalents, les résultats quant au caractère pronostic du niveau sCD95L sont variables. A noter cependant que le niveau sCD95L semble dans la majorité des études plus élevé chez les patients atteints de cancer que chez des volontaires sains.

Les effets de la signalisation CD95/CD95L semblent différents également au niveau biologique. Ainsi, dans les cancers de l'ovaire séreux de haut grade, nous n'avons pas montré d'impact direct sur les cellules tumorales, contrairement à ce qui a été retrouvé pour les cancers du sein triple négatifs, où la signalisation semble aussi jouer un rôle sur les cellules souches tumorales. Nos données dans les cancers de l'ovaire restent à confirmer dans d'autres études, mais il semble que la voie de signalisation CD95/CD95L est principalement impliquée dans le contrôle de la réponse immune pour les cancers de l'ovaire séreux de haut grade.

Au-delà ces aspects sur le pronostic, la voie de signalisation CD95/CD95L dans les cancers de l'ovaire séreux de haut grade et dans les cancers du sein triple négatifs joue un rôle important dans la régulation du système immunitaire et de la réponse antitumorale. Au-delà de la modulation de la réponse immune par induction ou non de l'apoptose des cellules immunitaires effectrices, la présence de CD95 dans les cellules tumorales semble jouer un rôle dans la modulation de la composition de l'infiltrat

immunitaire, et une modification de son équilibre entre tolérance et activité antitumorale. Ces données sont importantes car ce sont deux tumeurs pour lesquelles le système immunitaire joue un rôle majeur dans le contrôle tumoral et la progression de la maladie. Ainsi, l'infiltrat immunitaire lymphocytaire T, mais également B, est corrélé à un meilleur pronostic que ce soit dans les cancers du sein triple négatifs ou les cancers de l'ovaire séreux de haut grade. Cependant, la plupart des stratégies thérapeutiques ayant visé à restaurer un contrôle immunitaire antitumoral n'ont pas démontré d'efficacité notable en clinique dans les cancers du sein triple négatifs et les cancers séreux de haut grade. C'est notamment le cas des approches thérapeutiques ciblant PD1/PD-L1 qui globalement bénéficient de manière marginale à une minorité de patientes dans ces 2 types de cancer, contrairement à ce qui est observé pour d'autres cancers comme les mélanomes, les cancers bronchiques ou les cancers du rein. Les données négatives avec l'immunothérapie anti-PD1/PD-L1 dans les cancers du sein triple négatifs et les cancers de l'ovaire séreux de haut grade ne doivent cependant pas nous faire abandonner la piste de la modulation de la réponse immune. Il est possible, voir probable en effet qu'il faille actionner et jouer sur plusieurs voies contrôlant l'activation du système immunitaire simultanément. A ce titre, la mise en évidence de l'importance potentielle de la voie CD95/CD95L dans les cancers du sein triple négatifs et les cancers de l'ovaire séreux de haut grade pour le recrutement de différentes cellules du système immunitaire offre la possibilité d'explorer de nouvelles pistes thérapeutiques potentielles.

## 5. Perspectives et conclusion

Nos données dans les cancers de l'ovaire séreux de haut grade nécessitent d'être confirmées sur d'autres séries pour étayer nos hypothèses. Pour les cancers de l'ovaire séreux de haut grade, il est retrouvé fréquemment des anomalies de la réparation par recombinaison homologue (50% des cas environ), dont 20 à 30 % sont expliquées par des mutations BRCA. Le lien entre ces anomalies et la réponse immunitaire a fait l'objet d'études, car des données suggéraient que la présence d'anomalie HR pourraient entraîner une modulation de la réponse anti-tumorale,

notamment via la production de néoantigènes tumoraux et une augmentation de la charge mutationnelle. Les premières études réalisées allaient plutôt dans le sens d'un lien mais les études les plus récentes n'ont pas confirmé cette hypothèse. Il serait néanmoins intéressant de vérifier s'il existe des différences d'activation CD95/CD95L pour les cancers de l'ovaire séreux de haut grade présentant une anomalie HRD ou BRCA par rapport aux cancers HRP. Par ailleurs, il serait aussi intéressant d'étudier si la voie de signalisation CD95-CD95L peut être impactée par les traitements d'immunothérapie. En effet, nous avons montré qu'un niveau élevé de sCD95L est corrélé à un infiltrat immunitaire plus important dans les cancers de l'ovaire séreux de haut grade. La caractérisation plus fine de cet infiltrat immunitaire, est une voie à explorer. Cependant, contrairement à ce que nous avons mis en œuvre pour les cancers du sein triple négatifs, il n'est pas évident de collecter des échantillons de tumeurs fraîches, car d'une part la plupart des patientes sont traitées par chimiothérapie néoadjuvante, et nous ne disposons donc uniquement que de biopsies partiellement représentatives de la situation et d'autre part, le volume tumoral est très important du fait du stade avancé de la maladie.

Dans les cancers séreux de haut grade de l'ovaire, il a également été montré que la chimiothérapie peut moduler la réponse immune. L'étude d'une corrélation de l'infiltrat immunitaire après chimiothérapie et de l'effet sur la voie CD95/CD95L pourrait apporter une meilleure compréhension sur le rôle de cette voie. Par ailleurs, pour les cancers de l'ovaire séreux de haut grade, alors que l'efficacité de l'immunothérapie ciblant la voie anti-PD1/PD-L1 concerne une minorité de patientes, une question qui se pose est celle de biomarqueurs pouvant prédire la réponse au traitement d'immunothérapie. Ainsi, il pourrait être intéressant d'étudier la corrélation entre niveau sCD95L avant traitement et réponse à l'immunothérapie. Ayant participé à l'essai INEOV évaluant l'ajout d'un traitement par immunothérapie anti-PD-L1 (durvalumab) +/- anti-CTLA-4 (tremelimumab), nous pourrions évaluer l'impact de ces traitements selon le niveau sCD95L, afin de vérifier s'il existe une corrélation permettant d'identifier les patientes susceptibles de répondre de manière plus importante à cette approche thérapeutique.

Dans les cancers du sein triple négatifs localisés, il semble important de pouvoir continuer à étudier le rôle CD95/CD95L. Cependant, la collection pour étude que nous

avons menée chez les patientes ne peut se poursuivre, car du fait d'une modification des approches thérapeutiques, l'immense majorité des patientes sont maintenant traitées par chimiothérapie avant d'être opérée. Etant donné l'importance potentielle de la voie CD95/CD95L dans la résistance au traitement, il pourrait cependant être intéressant d'étudier le rôle de cette voie chez les patientes ne présentant pas une réponse complète histologique à la chimiothérapie. Ce type d'étude n'est pas facile à mener, car nécessite une organisation sans faille entre chirurgiens, anatomopathologistes et chercheurs, pour analyser en temps réel les cellules étant donné l'impact de la congélation sur la viabilité cellulaire.

Pour conclure, nous avons montré que la voie CD95/CD95L semble jouer un rôle important dans les cancers du sein triple négatifs et de l'ovaire séreux de haut grade. Contrairement à nos hypothèses initiales, l'action exercée semble différente entre ces 2 types tumoraux proches sur le plan moléculaire. Cependant, dans les 2 cas, cette action semble s'exercer notamment via une modulation de la réponse immunitaire antitumorale, ouvrant des perspectives potentielles pour mieux comprendre le rôle du système immunitaire dans ces tumeurs et peut être proposer de nouvelles approches thérapeutiques.

## Bibliographie

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108.
2. Morris GJ, Naidu S, Topham AK, Guiles F, Xu Y, McCue P, et al. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer*. 2007;110(4):876-84.
3. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007;13(15 Pt 1):4429-34.
4. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *NEngl J Med*. 2010;363(20):1938-48.
5. Deluche E, Antoine A, Bachelot T, Lardy-Cleaud A, Dieras V, Brain E, et al. Contemporary outcomes of metastatic breast cancer among 22,000 women from the multicentre ESME cohort 2008-2016. *Eur J Cancer*. 2020;129:60-70.
6. Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. *Cancer Discov*. 2019;9(2):176-98.
7. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2750-67.
8. Bareche Y, Venet D, Ignatiadis M, Aftimos P, Piccart M, Rothe F, et al. Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Ann Oncol*. 2018;29(4):895-902.
9. Lehmann BD, Jovanovic B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157368.
10. Uscanga-Perales GI, Santuario-Facio SK, Ortiz-López R. Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity. *Med Univ*. 2016;18(71):105-14.
11. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SA, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(7):1688-98.
12. Liu S, Lachapelle J, Leung S, Gao D, Foulkes WD, Nielsen TO. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res BCR*. 2012;14(2):R48.

13. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011;474(7353):609-15.
14. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 4 oct 2012;490(7418):61-70.
15. Hartman A-R, Kaldate RR, Sailer LM, Painter L, Grier CE, Endsley RR, et al. Prevalence of BRCA mutations in an unselected population of triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2012;118(11):2787-95.
16. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70.
17. Winter C, Nilsson MP, Olsson E, George AM, Chen Y, Kvist A, et al. Targeted sequencing of BRCA1 and BRCA2 across a large unselected breast cancer cohort suggests that one-third of mutations are somatic. *Ann Oncol*. 2016;27(8):1532-8.
18. Bertucci F, Ng CKY, Patsouris A, Droin N, Piscuoglio S, Carbuccia N, et al. Genomic characterization of metastatic breast cancers. *Nature*. 2019;569(7757):560-4.
19. Loibl S, Weber KE, Timms KM, Elkin EP, Hahnen E, Fasching PA, et al. Survival analysis of carboplatin added to an anthracycline/taxane-based neoadjuvant chemotherapy and HRD score as predictor of response-final results from GeparSixto. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2018;29(12):2341-7.
20. Tutt A, Tovey H, Cheang MCU, Kernaghan S, Kilburn L, Gazinska P, et al. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial. *NatMed*. 2018;24(5):628-37.
21. Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med*. 2017;377(6):523-33.
22. Litton JK, Rugo HS, Ettl J, Hurvitz SA, Gonçalves A, Lee KH, et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med*. 2018;379(8):753-63.
23. Diéras V, Han HS, Kaufman B, Wildiers H, Friedlander M, Ayoub JP, et al. Veliparib with carboplatin and paclitaxel in BRCA-mutated advanced breast cancer (BROCADE3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(10):1269-82.
24. Tung NM, Boughey JC, Pierce LJ, Robson ME, Bedrosian I, Dietz JR, et al. Management of Hereditary Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology, American Society for Radiation Oncology, and Society of Surgical Oncology Guideline. *J Clin Oncol*. 2020;38(18):2080-106.

25. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of « BRCAness » in sporadic cancers. *NatRev Cancer*. 2004;4(10):814-9.
26. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips K-A, Mooij TM, Roos-Blom M-J, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*. 2017;317(23):2402-16.
27. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. *Lancet*. 2014;384(9951):1376-88.
28. Bashashati A, Ha G, Tone A, Ding J, Prentice LM, Roth A, et al. Distinct evolutionary trajectories of primary high-grade serous ovarian cancers revealed through spatial mutational profiling. *J Pathol*. 2013;231(1):21-34.
29. Kurman RJ, Shih I. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *HumPathol*. 2011;42(7):918-31.
30. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 29 juin 2011;474(7353):609-15.
31. Konecny GE, Wang C, Hamidi H, Winterhoff B, Kalli KR, Dering J, et al. Prognostic and therapeutic relevance of molecular subtypes in high-grade serous ovarian cancer. *J NatlCancer Inst*. 2014;106(10).
32. Waldron L, Riester M, Birrer M. Molecular subtypes of high-grade serous ovarian cancer: the holy grail? *J NatlCancer Inst*. 2014;106(10).
33. Konstantinopoulos PA, Ceccaldi R, Shapiro GI, D'Andrea AD. Homologous Recombination Deficiency: Exploiting the Fundamental Vulnerability of Ovarian Cancer. *Cancer Discov*. 2015;5(11):1137-54.
34. Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, Lee MK, Pennil CC, Rendi MH, et al. Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2014;20(3):764-75.
35. Norquist BM, Brady MF, Harrell MI, Walsh T, Lee MK, Gulsuner S, et al. Mutations in Homologous Recombination Genes and Outcomes in Ovarian Carcinoma Patients in GOG 218: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. *Clin Cancer Res*. 2018;24(4):777-83.
36. de la Motte Rouge T, Ray-Coquard I, You B. [Medical treatment in ovarian cancers newly diagnosed: Article drafted from the French Guidelines in oncology entitled « Initial management of patients with epithelial ovarian cancer » developed by FRANCOGYN, CNGOF, SFOG, GINECO-ARCAGY under the aegis of CNGOF and endorsed by INCa]. *Gynecol Obstet Fertil Senol*. 2019;47(2):222-37.

37. Moore K, Colombo N, Scambia G, Kim B-G, Oaknin A, Friedlander M, et al. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(26):2495-505.
38. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, Pérol D, Gonzalez-Martin A, Berger R, et al. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 2019;381(25):2416-28.
39. González-Martín A, Pothuri B, Vergote I, DePont Christensen R, Graybill W, Mirza MR, et al. Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 2019;381(25):2391-402.
40. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(15):1382-92.
41. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, Oza AM, Mahner S, Redondo A, et al. Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(22):2154-64.
42. Coleman RL, Oza AM, Lorusso D, Aghajanian C, Oaknin A, Dean A, et al. Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2017;390(10106):1949-61.
43. Cavallo F, De GC, Nanni P, Forni G, Lollini PL. 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(3):319-26.
44. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991-8.
45. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-71.
46. Tower H, Ruppert M, Britt K. The Immune Microenvironment of Breast Cancer Progression. *Cancers Basel*. 2019;11(9).
47. Galluzzi L, Chan TA, Kroemer G, Wolchok JD, Lopez-Soto A. The hallmarks of successful anticancer immunotherapy. *Sci Transl Med*. 2018;10(459).
48. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*. 2015;348(6230):69-74.
49. Gubin MM, Zhang X, Schuster H, Caron E, Ward JP, Noguchi T, et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature*. 2014;515(7528):577-81.
50. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 2005;23(3):609-18.

51. Maby P, Tougeron D, Hamieh M, Mlecnik B, Kora H, Bindea G, et al. Correlation between Density of CD8+ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy. *Cancer Res.* 2015;75(17):3446-55.
52. Kraya AA, Maxwell KN, Wubbenhorst B, Wenz BM, Pluta J, Rech AJ, et al. Genomic Signatures Predict the Immunogenicity of BRCA-Deficient Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2019;25(14):4363-74.
53. Liu YL, Selenica P, Zhou Q, Iasonos A, Callahan M, Feit NZ, et al. BRCA Mutations, Homologous DNA Repair Deficiency, Tumor Mutational Burden, and Response to Immune Checkpoint Inhibition in Recurrent Ovarian Cancer. *JCO Precis Oncol.* 2020;4.
54. Balachandran VP, Luksza M, Zhao JN, Makarov V, Moral JA, Remark R, et al. Identification of unique neoantigen qualities in long-term survivors of pancreatic cancer. *Nature.* 2017;551(7681):512-6.
55. Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell.* 2015;161(2):205-14.
56. Buisseret L, Pommey S, Allard B, Garaud S, Bergeron M, Cousineau I, et al. Clinical significance of CD73 in triple-negative breast cancer: multiplex analysis of a phase III clinical trial. *Ann Oncol.* 2018;29(4):1056-62.
57. Chang CH, Qiu J, O'Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell.* 2015;162(6):1229-41.
58. Brand A, Singer K, Koehl GE, Kolitzus M, Schoenhammer G, Thiel A, et al. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab.* 2016;24(5):657-71.
59. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Immunol.* 2011;29:71-109.
60. Travis MA, Sheppard D. TGF- $\beta$  activation and function in immunity. *Annu Immunol.* 2014;32:51-82.
61. Sade-Feldman M, Jiao YJ, Chen JH, Rooney MS, Barzily-Rokni M, Eliane JP, et al. Resistance to checkpoint blockade therapy through inactivation of antigen presentation. *Nat Commun.* 2017;8(1):1136.
62. Fridman WH, Zitvogel L, Sautes-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(12):717-34.
63. Böttcher JP, Bonavita E, Chakravarty P, Blees H, Cabeza-Cabrero M, Sammicheli S, et al. NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor

- Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell*. 2018;172(5):1022-1037.e14.
64. Wouters MCA, Nelson BH. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating B Cells and Plasma Cells in Human Cancer. *Clin Cancer Res*. 2018;24(24):6125-35.
  65. Garaud S, Zayakin P, Buisseret L, Rulle U, Silina K, de WA, et al. Antigen Specificity and Clinical Significance of IgG and IgA Autoantibodies Produced in situ by Tumor-Infiltrating B Cells in Breast Cancer. *Front Immunol*. 2018;9:2660.
  66. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang TH, et al. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity*. 2018;48(4):812-30.
  67. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-4.
  68. Dieu-Nosjean MC, Giraldo NA, Kaplon H, Germain C, Fridman WH, Sautès-Fridman C. Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. *ImmunolRev*. 2016;271(1):260-75.
  69. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 2017;541(7637):321-30.
  70. Cabrita R, Lauss M, Sanna A, Donia M, Skaarup LM, Mitra S, et al. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature*. 2020;577(7791):561-5.
  71. Teillaud J-L, Dieu-Nosjean M-C. Tertiary Lymphoid Structures: An Anti-tumor School for Adaptive Immune Cells and an Antibody Factory to Fight Cancer? *Front Immunol*. 2017;8:830.
  72. Thommen DS, Schreiner J, MÖller P, Herzig P, Roller A, Belousov A, et al. Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors. *Cancer ImmunolRes*. 2015;3(12):1344-55.
  73. Sautès-Fridman C, Lawand M, Giraldo NA, Kaplon H, Germain C, Fridman WH, et al. Tertiary Lymphoid Structures in Cancers: Prognostic Value, Regulation, and Manipulation for Therapeutic Intervention. *Front Immunol*. 2016;7:407.
  74. Becht E, Giraldo NA, Lacroix L, Buttard B, Elarouci N, Petitprez F, et al. Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. *Genome Biol*. 2016;17(1):218.
  75. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *NatRev Cancer*. 2016;16(9):582-98.

76. Bahrami A, Khazaei M, Bagherieh F, Ghayour-Mobarhan M, Maftouh M, Hassanian SM, et al. Targeting stroma in pancreatic cancer: Promises and failures of targeted therapies. *J Cell Physiol.* 2017;232(11):2931-7.
77. Jiang H, Hegde S, Knolhoff BL, Zhu Y, Herndon JM, Meyer MA, et al. Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. *NatMed.* 2016;22(8):851-60.
78. Chen W, Ten DP. Immunoregulation by members of the TGF $\beta$  superfamily. *NatRev Immunol.* 2016;16(12):723-40.
79. Tauriello DVF, Palomo-Ponce S, Stork D, Berenguer-Llergo A, Badia-Ramentol J, Iglesias M, et al. TGF $\beta$  drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature.* 2018;554(7693):538-43.
80. López-Soto A, Gonzalez S, Smyth MJ, Galluzzi L. Control of Metastasis by NK Cells. *Cancer Cell.* 2017;32(2):135-54.
81. Kumar V, Donthireddy L, Marvel D, Condamine T, Wang F, Lavilla-Alonso S, et al. Cancer-Associated Fibroblasts Neutralize the Anti-tumor Effect of CSF1 Receptor Blockade by Inducing PMN-MDSC Infiltration of Tumors. *Cancer Cell.* 2017;32(5):654-68.
82. Lakins MA, Ghorani E, Munir H, Martins CP, Shields JD. Cancer-associated fibroblasts induce antigen-specific deletion of CD8 (+) T Cells to protect tumour cells. *NatCommun.* 2018;9(1):948.
83. Schaaf MB, Garg AD, Agostinis P. Defining the role of the tumor vasculature in antitumor immunity and immunotherapy. *Cell DeathDis.* 2018;9(2):115.
84. Malleter M, Tauzin S, Bessede A, Castellano R, Goubard A, Godey F, et al. CD95L cell surface cleavage triggers a prometastatic signaling pathway in triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* 2013;73(22):6711-21.
85. Motz GT, Santoro SP, Wang LP, Garrabrant T, Lastra RR, Hagemann IS, et al. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *NatMed.* 2014;20(6):607-15.
86. Terme M, Pernot S, Marcheteau E, Sandoval F, Benhamouda N, Colussi O, et al. VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2013;73(2):539-49.
87. Zhao Y, Ting KK, Li J, Cogger VC, Chen J, Johansson-Percival A, et al. Targeting Vascular Endothelial-Cadherin in Tumor-Associated Blood Vessels Promotes T-cell-Mediated Immunotherapy. *Cancer Res.* 2017;77(16):4434-47.
88. Burstein HJ, Curigliano G, Loibl S, Dubsy P, Gnant M, Poortmans P, et al. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2019;30(10):1541-57.

89. Loi S. The ESMO clinical practise guidelines for early breast cancer: diagnosis, treatment and follow-up: on the winding road to personalized medicine. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2019;30(8):1183-4.
90. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AHS, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011;29(15):1949-55.
91. Gruosso T, Gigoux M, Manem VSK, Bertos N, Zuo D, Perlitch I, et al. Spatially distinct tumor immune microenvironments stratify triple-negative breast cancers. *J Clin Invest*. 2019;129(4):1785-800.
92. Costa A, Kieffer Y, Scholer-Dahirel A, Pelon F, Bourachot B, Cardon M, et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell*. 2018;33(3):463-479.e10.
93. Savas P, Virassamy B, Ye C, Salim A, Mintoff CP, Caramia F, et al. Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis. *Nat Med*. 2018;24(7):986-93.
94. West NR, Milne K, Truong PT, Macpherson N, Nelson BH, Watson PH. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res BCR*. 2011;13(6):R126.
95. Seo AN, Lee HJ, Kim EJ, Kim HJ, Jang MH, Lee HE, et al. Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *Br J Cancer*. 2013;109(10):2705-13.
96. Badr NM, Berditchevski F, Shaaban AM. The Immune Microenvironment in Breast Carcinoma: Predictive and Prognostic Role in the Neoadjuvant Setting. *Pathobiol J Immunopathol Mol Cell Biol*. 2020;87(2):61-74.
97. Bottai G, Raschioni C, Losurdo A, Di Tommaso L, Tinterri C, Torrisi R, et al. An immune stratification reveals a subset of PD-1/LAG-3 double-positive triple-negative breast cancers. *Breast Cancer Res BCR*. 2016;18(1):121.
98. García-Martínez E, Gil GL, Benito AC, González-Billalabeitia E, Conesa MAV, García García T, et al. Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Res BCR*. 2014;16(6):488.
99. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(1):105-13.
100. Garaud S, Buisseret L, Solinas C, Gu-Trantien C, de Wind A, Van den Eynden G, et al. Tumor infiltrating B-cells signal functional humoral immune responses in breast cancer. *JCI Insight*. 2019;5.

101. Lee H, Lee HJ, Song IH, Bang WS, Heo S-H, Gong G, et al. CD11c-Positive Dendritic Cells in Triple-negative Breast Cancer. *Vivo Athens Greece*. 2018;32(6):1561-9.
102. Nederlof I, Horlings HM, Curtis C, Kok M. A High-Dimensional Window into the Micro-Environment of Triple Negative Breast Cancer. *Cancers*. 2021;13(2).
103. Yuan Z-Y, Luo R-Z, Peng R-J, Wang S-S, Xue C. High infiltration of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis. *OncoTargets Ther*. 2014;7:1475-80.
104. Gwak JM, Jang MH, Kim DI, Seo AN, Park SY. Prognostic value of tumor-associated macrophages according to histologic locations and hormone receptor status in breast cancer. *PLoS One*. 2015;10(4):e0125728.
105. Bense RD, Sotiriou C, Piccart-Gebhart MJ, Haanen JBAG, van Vugt MATM, de Vries EGE, et al. Relevance of Tumor-Infiltrating Immune Cell Composition and Functionality for Disease Outcome in Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2016;109(1).
106. Sousa S, Brion R, Lintunen M, Kronqvist P, Sandholm J, Mönkkönen J, et al. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Res BCR*. 2015;17:101.
107. Azizi E, Carr AJ, Plitas G, Cornish AE, Konopacki C, Prabhakaran S, et al. Single-Cell Map of Diverse Immune Phenotypes in the Breast Tumor Microenvironment. *Cell*. 2018;174(5):1293-1308.e36.
108. Keren L, Bosse M, Marquez D, Angoshtari R, Jain S, Varma S, et al. A Structured Tumor-Immune Microenvironment in Triple Negative Breast Cancer Revealed by Multiplexed Ion Beam Imaging. *Cell*. 2018;174(6):1373-1387.e19.
109. Emens LA, Esteva FJ, Beresford M, Saura C, De Laurentiis M, Kim S-B, et al. Trastuzumab emtansine plus atezolizumab versus trastuzumab emtansine plus placebo in previously treated, HER2-positive advanced breast cancer (KATE2): a phase 2, multicentre, randomised, double-blind trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(10):1283-95.
110. Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, Nowecki Z, Im SA, Yusof MM, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet*. 2020;396(10265):1817-28.
111. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2020;382(9):810-21.
112. Mittendorf EA, Zhang H, Barrios CH, Saji S, Jung KH, Hegg R, et al. Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and

- anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with early-stage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2020;396(10257):1090-100.
113. Hao J, Yu H, Zhang T, An R, Xue Y. Prognostic impact of tumor-infiltrating lymphocytes in high grade serous ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ther Adv Med Oncol*. 2020;12:1758835920967241.
  114. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *NEngl J Med*. 2003;348(3):203-13.
  115. Sato A, Kono T, Nakada K, Ishikawa K, Inoue S, Yonekawa H, et al. Gene therapy for progeny of mito-mice carrying pathogenic mtDNA by nuclear transplantation. *Proc Natl Acad Sci US A*. 2005;102(46):16765-70.
  116. Hwang WT, Adams SF, Tahirovic E, Hagemann IS, Coukos G. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *GynecolOncol*. 2012;124(2):192-8.
  117. Ovarian Tumor Tissue Analysis (OTTA) Consortium, Goode EL, Block MS, Kalli KR, Vierkant RA, Chen W, et al. Dose-Response Association of CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Survival Time in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *JAMA Oncol*. 2017;3(12):e173290.
  118. Milne K, Köbel M, Kalloger SE, Barnes RO, Gao D, Gilks CB, et al. Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. *PloS One*. 2009;4(7):e6412.
  119. Nielsen JS, Sahota RA, Milne K, Kost SE, Nesslinger NJ, Watson PH, et al. CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012;18(12):3281-92.
  120. Montfort A, Pearce O, Maniati E, Vincent BG, Bixby L, Böhm S, et al. A Strong B-cell Response Is Part of the Immune Landscape in Human High-Grade Serous Ovarian Metastases. *Clin Cancer Res*. 2017;23(1):250-62.
  121. Biswas S, Mandal G, Payne KK, Anadon CM, Gatenbee CD, Chaurio RA, et al. IgA transcytosis and antigen recognition govern ovarian cancer immunity. *Nature*. 2021;591(7850):464-70.
  122. Webb JR, Milne K, Watson P, Deleeuw RJ, Nelson BH. Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014;20(2):434-44.

123. Dong HP, Elstrand MB, Holth A, Silins I, Berner A, Trope CG, et al. NK- and B-cell infiltration correlates with worse outcome in metastatic ovarian carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2006;125(3):451-8.
124. Leffers N, Gooden MJ, de Jong RA, Hoogeboom BN, ten Hoor KA, Hollema H, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58(3):449-59.
125. Colvin EK. Tumor-associated macrophages contribute to tumor progression in ovarian cancer. *Front Oncol.* 2014;4:137.
126. Takaishi K, Komohara Y, Tashiro H, Ohtake H, Nakagawa T, Katabuchi H, et al. Involvement of M2-polarized macrophages in the ascites from advanced epithelial ovarian carcinoma in tumor progression via Stat3 activation. *Cancer Sci.* 2010;101(10):2128-36.
127. Hagemann T, Wilson J, Burke F, Kulbe H, Li NF, Plüddemann A, et al. Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2006;176(8):5023-32.
128. Zhang M, He Y, Sun X, Li Q, Wang W, Zhao A, et al. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. *J Ovarian Res.* 2014;7:19.
129. Cui TX, Kryczek I, Zhao L, Zhao E, Kuick R, Roh MH, et al. Myeloid-derived suppressor cells enhance stemness of cancer cells by inducing microRNA101 and suppressing the corepressor CtBP2. *Immunity.* 2013;39(3):611-21.
130. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8(3):151-60.
131. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell.* 2015;28(6):690-714.
132. Toyoda H, Ido M, Hayashi T, Gabazza EC, Suzuki K, Bu J, et al. Impairment of IL-12-dependent STAT4 nuclear translocation in a patient with recurrent *Mycobacterium avium* infection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004;172(6):3905-12.
133. Kodumudi KN, Woan K, Gilvary DL, Sahakian E, Wei S, Djeu JY. A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2010;16(18):4583-94.
134. Zhang L, Dermawan K, Jin M, Liu R, Zheng H, Xu L, et al. Differential impairment of regulatory T cells rather than effector T cells by paclitaxel-based chemotherapy. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2008;129(2):219-29.

135. Zhu Y, Liu N, Xiong SD, Zheng YJ, Chu YW. CD4+Foxp3+ regulatory T-cell impairment by paclitaxel is independent of toll-like receptor 4. *Scand J Immunol.* 2011;73(4):301-8.
136. Mesnage SJL, Auguste A, Genestie C, Dunant A, Pain E, Drusch F, et al. Neoadjuvant chemotherapy (NACT) increases immune infiltration and programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in epithelial ovarian cancer (EOC). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2017;28(3):651-7.
137. Leary A, Genestie C, Blanc-Durand F, Gouy S, Dunant A, Maulard A, et al. Neoadjuvant chemotherapy alters the balance of effector to suppressor immune cells in advanced ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother Cll.* 2021;70(2):519-31.
138. Hamanishi J, Mandai M, Ikeda T, Minami M, Kawaguchi A, Murayama T, et al. Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2015;33(34):4015-22.
139. Varga A, Piha-Paul S, Ott PA, Mehnert JM, Berton-Rigaud D, Morosky A, et al. Pembrolizumab in patients with programmed death ligand 1-positive advanced ovarian cancer: Analysis of KEYNOTE-028. *Gynecol Oncol.* 2019;152(2):243-50.
140. Disis ML, Taylor MH, Kelly K, Beck JT, Gordon M, Moore KM, et al. Efficacy and Safety of Avelumab for Patients With Recurrent or Refractory Ovarian Cancer: Phase 1b Results From the JAVELIN Solid Tumor Trial. *JAMA Oncol.* 2019;5(3):393-401.
141. Matulonis UA, Shapira-Frommer R, Santin AD, Lisyanskaya AS, Pignata S, Vergote I, et al. Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients with advanced recurrent ovarian cancer: results from the phase II KEYNOTE-100 study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2019;30(7):1080-7.
142. Pujade-Lauraine E, Fujiwara K, Ledermann JA, Oza AM, Kristeleit R, Ray-Coquard I-L, et al. Avelumab alone or in combination with pegylated liposomal doxorubicin versus pegylated liposomal doxorubicin alone in platinum-resistant or refractory epithelial ovarian cancer: Primary and biomarker analysis of the phase III JAVELIN Ovarian 200 trial. In *SGO; 2019* [cité 6 juin 2021]. Disponible sur: <https://sgo.confex.com/sgo/2019/meetingapp.cgi/Paper/14228>
143. Moore KN, Bookman M, Sehouli J, Miller A, Anderson C, Scambia G, et al. LBA31 Primary results from IMagyn050/GOG 3015/ENGOT-OV39, a double-blind placebo (pbo)-controlled randomised phase III trial of bevacizumab (bev)-containing therapy +/- atezolizumab (atezo) for newly diagnosed stage III/IV ovarian cancer (OC). *Ann Oncol.* 2020;31:S1161-2.
144. Zamarin D, Burger RA, Sill MW, Powell DJ, Lankes HA, Feldman MD, et al. Randomized Phase II Trial of Nivolumab Versus Nivolumab and Ipilimumab for

Recurrent or Persistent Ovarian Cancer: An NRG Oncology Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2020;38(16):1814-23.

145. Mayor P, Starbuck K, Zsiros E. Adoptive cell transfer using autologous tumor infiltrating lymphocytes in gynecologic malignancies. *Gynecol Oncol*. 2018;150(2):361-9.
146. Macpherson AM, Barry SC, Ricciardelli C, Oehler MK. Epithelial Ovarian Cancer and the Immune System: Biology, Interactions, Challenges and Potential Advances for Immunotherapy. *J Clin Med*. 2020;9(9).
147. Dostert C, Grusdat M, Letellier E, Brenner D. The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond. *Physiol Rev*. 2019;99(1):115-60.
148. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*. 2000;288(5475):2351-4.
149. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, et al. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*. 2000;288(5475):2354-7.
150. Barnhart BC, Legembre P, Pietras E, Bubici C, Franzoso G, Peter ME. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *EMBO J*. 2004;23(15):3175-85.
151. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Möller P, Falk W, et al. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*. 1989;245(4915):301-5.
152. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 1989;169(5):1747-56.
153. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*. 1991;66(2):233-43.
154. Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*. 1993;268(15):10932-7.
155. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*. 1993;74(5):845-53.
156. Poissonnier A, Sans-Nau D, Le GM, Malleter M, Levoïn N, Viel R, et al. CD95-Mediated Calcium Signaling Promotes T Helper 17 Trafficking to Inflamed Organs in Lupus-Prone Mice. *Immunity*. 2016;45(1):209-23.

157. Poissonnier A, GuNgan JP, Nguyen HT, Best D, Levoïn N, Kozlov G, et al. Disrupting the CD95-PLCy1 interaction prevents Th17-driven inflammation. *NatChem Biol.* 2018;14(12):1079-89.
158. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell.* 1993;75(6):1169-78.
159. Holler N, Tardivel A, Kovacsovics-Bankowski M, Hertig S, Gaide O, Martinon F, et al. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol.* 2003;23(4):1428-40.
160. Oshimi Y, Oda S, Honda Y, Nagata S, Miyazaki S. Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J Immunol.* 1996;157(7):2909-15.
161. Saas P, Walker PR, Hahne M, Quiquerez AL, Schnuriger V, Perrin G, et al. Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain? *J Clin Invest.* 1997;99(6):1173-8.
162. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science.* 1995;270(5239):1189-92.
163. Sanberg PR, Saporta S, Borlongan CV, Othberg AI, Allen RC, Cameron DF. The testis-derived cultured Sertoli cell as a natural Fas-L secreting cell for immunosuppressive cellular therapy. *Cell Transplant.* 1997;6(2):191-3.
164. Xerri L, Devilard E, Hassoun J, Mawas C, Birg F. Fas ligand is not only expressed in immune privileged human organs but is also coexpressed with Fas in various epithelial tissues. *Mol Pathol.* 1997;50(2):87-91.
165. Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med.* 1997;186(12):2045-50.
166. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, et al. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med.* 1998;187(8):1205-13.
167. Matsuno H, Yudoh K, Watanabe Y, Nakazawa F, Aono H, Kimura T. Stromelysin-1 (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound Fas ligand. *J Rheumatol.* 2001;28(1):22-8.
168. Vargo-Gogola T, Crawford HC, Fingleton B, Matrisian LM. Identification of novel matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) cleavage sites in murine and human Fas ligand. *Arch Biochem Biophys.* 2002;408(2):155-61.

169. Kiaei M, Kipiani K, Calingasan NY, Wille E, Chen J, Heissig B, et al. Matrix metalloproteinase-9 regulates TNF-alpha and FasL expression in neuronal, glial cells and its absence extends life in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. 2007;205(1):74-81.
170. Kirkin V, Cahuzac N, Guardiola-Serrano F, Huault S, LÖckerath K, Friedmann E, et al. The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells. *Cell Death Differ*. 2007;14(9):1678-87.
171. Schulte M, Reiss K, Lettau M, Maretzky T, Ludwig A, Hartmann D, et al. ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death Differ*. 2007;14(5):1040-9.
172. Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J*. 1995;14(6):1129-35.
173. Mariani SM, Matiba B, Bäumler C, Krammer PH. Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur J Immunol*. août 1995;25(8):2303-7.
174. O' Reilly LA, Tai L, Lee L, Kruse EA, Grabow S, Fairlie WD, et al. Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature*. 2009;461(7264):659-63.
175. Fouqué A, Debure L, Legembre P. The CD95/CD95L signaling pathway: a role in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1846(1):130-41.
176. Tauzin S, Chaigne-Delalande B, Selva E, Khadra N, Daburon S, Contin-Bordes C, et al. The naturally processed CD95L elicits a c-yes/calcium/PI3K-driven cell migration pathway. *PLoS Biol*. 2011;9(6):e1001090.
177. Guégan JP, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Ducret T, Quignard JF, Vacher P, et al. CD95/Fas and metastatic disease: What does not kill you makes you stronger. *Semin Cancer Biol*. 2020;60:121-31.
178. Guégan JP, Legembre P. Nonapoptotic functions of Fas/CD95 in the immune response. *FEBS J*. 2018;285(5):809-27.
179. Scott FL, Stec B, Pop C, Dobaczewska MK, Lee JJ, Monosov E, et al. The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature*. 2009;457(7232):1019-22.
180. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 1995;14(22):5579-88.

181. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998;17(6):1675-87.
182. Algeciras-Schimmich A, Pietras EM, Barnhart BC, Legembre P, Vijayan S, Holbeck SL, et al. Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs. *Proc Natl Acad Sci US A.* 2003;100(20):11445-50.
183. Chaigne-Delalande B, Mahfouf W, Daburon S, Moreau JF, Legembre P. CD95 engagement mediates actin-independent and -dependent apoptotic signals. *Cell Death Differ.* 2009;16(12):1654-64.
184. Bénéteau M, Pizon M, Chaigne-Delalande B, Daburon S, Moreau P, De Giorgi F, et al. Localization of Fas/CD95 into the lipid rafts on down-modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Mol Cancer Res.* 2008;6(4):604-13.
185. Peacock JW, Palmer J, Fink D, Ip S, Pietras EM, Mui AL, et al. PTEN loss promotes mitochondrially dependent type II Fas-induced apoptosis via PEA-15. *Mol Cell Biol.* mars 2009;29(5):1222-34.
186. Chen JJ, Sun Y, Nabel GJ. Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science.* 1998;282(5394):1714-7.
187. Buonocore S, Flamand V, Claessen N, Heeringa P, Goldman M, Florquin S. Dendritic cells overexpressing Fas-ligand induce pulmonary vasculitis in mice. *Clin Exp Immunol.* 2004;137(1):74-80.
188. Dupont PJ, Warrens AN. Fas ligand exerts its pro-inflammatory effects via neutrophil recruitment but not activation. *Immunology.* 2007;120(1):133-9.
189. Rescigno M, Piguet V, Valzasina B, Lens S, Zubler R, French L, et al. Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med.* 2000;192(11):1661-8.
190. Stranges PB, Watson J, Cooper CJ, Choisy-Rossi CM, Stonebraker AC, Beighton RA, et al. Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity.* 2007;26(5):629-41.
191. Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K, et al. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med.* 1993;178(6):2231-5.
192. Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, Budd RC. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med.* 1999;190(12):1891-6.

193. Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, et al. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature*. 1995;373(6513):444-8.
194. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 2000;407(6805):789-95.
195. Yamada A, Arakaki R, Saito M, Kudo Y, Ishimaru N. Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance. *Front Immunol*. 2017;8:403.
196. Hennino A, Bérard M, Krammer PH, DeFrance T. FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J Exp Med*. 2001;193(4):447-58.
197. Butt D, Chan TD, Bourne K, Hermes JR, Nguyen A, Statham A, et al. FAS Inactivation Releases Unconventional Germinal Center B Cells that Escape Antigen Control and Drive IgE and Autoantibody Production. *Immunity*. 2015;42(5):890-902.
198. Klebanoff CA, Scott CD, Leonardi AJ, Yamamoto TN, Cruz AC, Ouyang C, et al. Memory T cell-driven differentiation of naive cells impairs adoptive immunotherapy. *J Clin Invest*. 2016;126(1):318-34.
199. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(6):652-7.
200. Yosef N, Shalek AK, Gaublomme JT, Jin H, Lee Y, Awasthi A, et al. Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature*. 2013;496(7446):461-8.
201. Lu H, Chen I, Shimoda LA, Park Y, Zhang C, Tran L, et al. Chemotherapy-Induced Ca(2+) Release Stimulates Breast Cancer Stem Cell Enrichment. *Cell Rep*. 2017;18(8):1946-57.
202. Rovere P, Clementi E, Ferrarini M, Heltai S, Sciorati C, Sabbadini MG, et al. CD95 engagement releases calcium from intracellular stores of long term activated, apoptosis-prone gammadelta T cells. *J Immunol*. 1996;156(12):4631-7.
203. Khadra N, Bresson-Bepoldin L, Penna A, Chaigne-Delalande B, S`ngui B, Levade T, et al. CD95 triggers Orai1-mediated localized Ca<sup>2+</sup> entry, regulates recruitment of protein kinase C (PKC)  $\beta$ 2, and prevents death-inducing signaling complex formation. *Proc Natl Acad Sci US A*. 2011;108(47):19072-7.
204. Gao L, G`l`ler GS, Golbach L, Block H, Zarbock A, Martin-Villalba A. Endothelial cell-derived CD95 ligand serves as a chemokine in induction of neutrophil slow rolling and adhesion. *Elife*. 2016;5.

205. Duffy MJ, McGowan PM, Harbeck N, Thomssen C, Schmitt M. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res.* 2014;16(4):428.
206. Bajou K, Peng H, Laug WE, Maillard C, Noel A, Foidart JM, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis. *Cancer Cell.* 2008;14(4):324-34.
207. Gagnoux-Palacios L, Awina H, Audebert S, Rossin A, Mondin M, Borgese F, et al. Cell polarity and adherens junction formation inhibit epithelial Fas cell death receptor signaling. *J Cell Biol.* 2018;217(11):3839-52.
208. Desbarats J, Newell MK. Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *NatMed.* 2000;6(8):920-3.
209. Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality? *NatMed.* 2009;15(9):1010-2.
210. Corsini NS, Sancho-Martinez I, Laudenklos S, Glagow D, Kumar S, Letellier E, et al. The death receptor CD95 activates adult neural stem cells for working memory formation and brain repair. *Cell Stem Cell.* 2009;5(2):178-90.
211. Peter ME, Hadji A, Murmann AE, Brockway S, Putzbach W, Pattanayak A, et al. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ.* 2015;22(5):885-6.
212. Herrero R, Kajikawa O, Matute-Bello G, Wang Y, Hagimoto N, Mongovin S, et al. The biological activity of FasL in human and mouse lungs is determined by the structure of its stalk region. *J Clin Invest.* 2011;121(3):1174-90.
213. Söderström TS, Nyberg SD, Eriksson JE. CD95 capping is ROCK-dependent and dispensable for apoptosis. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 10):2211-23.
214. Igney FH, Behrens CK, Krammer PH. Tumor counterattack--concept and reality. *Eur J Immunol.* 2000;30(3):725-31.
215. O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med.* 1996;184(3):1075-82.
216. Igney FH, Krammer PH. Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer Immunol Immunother.* 2005;54(11):1127-36.
217. Restifo NP. Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nat Med.* 2000;6(5):493-5.
218. Legembre P, Barnhart BC, Peter ME. The relevance of NF-kappaB for CD95 signaling in tumor cells. *Cell Cycle.* 2004;3(10):1235-9.

219. Bivona TG, Hieronymus H, Parker J, Chang K, Taron M, Rosell R, et al. FAS and NF- $\kappa$ B signalling modulate dependence of lung cancers on mutant EGFR. *Nature*. 2011;471(7339):523-6.
220. Kleber S, Sancho-Martinez I, Wiestler B, Beisel A, Gieffers C, Hill O, et al. Yes and PI3K bind CD95 to signal invasion of glioblastoma. *Cancer Cell*. 2008;13(3):235-48.
221. Steller EJ, Ritsma L, Raats DA, Hoogwater FJ, Emmink BL, Govaert KM, et al. The death receptor CD95 activates the cofilin pathway to stimulate tumour cell invasion. *EMBO Rep*. 2011;12(9):931-7.
222. Teodorczyk M, Kleber S, Wollny D, Sefrin JP, Aykut B, Mateos A, et al. CD95 promotes metastatic spread via Sck in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Death Differ*. 2015;22(7):1192-202.
223. Chen L, Park SM, Tumanov AV, Hau A, Sawada K, Feig C, et al. CD95 promotes tumour growth. *Nature*. 2010;465(7297):492-6.
224. Zheng HX, Cai YD, Wang YD, Cui XB, Xie TT, Li WJ, et al. Fas signaling promotes motility and metastasis through epithelial-mesenchymal transition in gastrointestinal cancer. *Oncogene*. 2013;32(9):1183-92.
225. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-15.
226. Ceppi P, Hadji A, Kohlhapp FJ, Pattanayak A, Hau A, Liu X, et al. CD95 and CD95L promote and protect cancer stem cells. *NatCommun*. 2014;5:5238.
227. Qadir AS, Stults AM, Murmann AE, Peter ME. The mechanism of how CD95/Fas activates the Type I IFN/STAT1 axis, driving cancer stemness in breast cancer. *Sci Rep*. 2020;10(1):1310.
228. Hadji A, Ceppi P, Murmann AE, Brockway S, Pattanayak A, Bhinder B, et al. Death induced by CD95 or CD95 ligand elimination. *Cell Rep*. 2014;7(1):208-22.
229. Karray S, Kress C, Cuvellier S, Hue-Beauvais C, Damotte D, Babinet C, et al. Complete loss of Fas ligand gene causes massive lymphoproliferation and early death, indicating a residual activity of gld allele. *J Immunol*. 2004;172(4):2118-25.
230. Peter ME. DICE: A novel tumor surveillance mechanism-a new therapy for cancer? *Cell Cycle Georget Tex*. 2014;13(9):1373-8.
231. Putzbach W, Gao QQ, Patel M, van Dongen S, Haluck-Kangas A, Sarshad AA, et al. Many si/shRNAs can kill cancer cells by targeting multiple survival genes through an off-target mechanism. *eLife*. 2017;6.

232. Mottolese M, Buglioni S, Bracalenti C, Cardarelli MA, Ciabocco L, Giannarelli D, et al. Prognostic relevance of altered Fas (CD95)-system in human breast cancer. *Int J Cancer*. 2000;89(2):127-32.
233. Reimer T, Herrnring C, Koczan D, Richter D, Gerber B, Kabelitz D, et al. FasL:Fas ratio--a prognostic factor in breast carcinomas. *Cancer Res*. 2000;60(4):822-8.
234. Müllauer L, Mosberger I, Grusch M, Rudas M, Chott A. Fas ligand is expressed in normal breast epithelial cells and is frequently up-regulated in breast cancer. *J Pathol*. 2000;190(1):20-30.
235. Blok EJ, van den Bulk J, Dekker-Ensink NG, Derr R, Kanters C, Bastiaannet E, et al. Combined evaluation of the FAS cell surface death receptor and CD8+ tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic biomarker in breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(9):15610-20.
236. Bewick M, Conlon M, Parissenti AM, Lee H, Zhang L, Glöck S, et al. Soluble Fas (CD95) is a prognostic factor in patients with metastatic breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *J HematotherStem Cell Res*. 2001;10(6):759-68.
237. Abrahams VM, Straszewski SL, Kamsteeg M, Hanczaruk B, Schwartz PE, Rutherford TJ, et al. Epithelial ovarian cancer cells secrete functional Fas ligand. *Cancer Res*. 2003;63(17):5573-81.
238. Munakata S, Enomoto T, Tsujimoto M, Otsuki Y, Miwa H, Kanno H, et al. Expressions of Fas ligand and other apoptosis-related genes and their prognostic significance in epithelial ovarian neoplasms. *Br J Cancer*. 2000;82(8):1446-52.
239. Taylor DD, Lyons KS, Gerçel-Taylor C. Shed membrane fragment-associated markers for endometrial and ovarian cancers. *Gynecol Oncol*. 2002;84(3):443-8.
240. Chaudhry P, Srinivasan R, Patel FD, Gopalan S, Majumdar S. Serum soluble Fas levels and prediction of response to platinum-based chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2008;122(8):1716-21.
241. De La Motte Rouge T, Corné J, Cauchois A, Le Boulch M, Poupon C, Henno S, et al. Serum CD95L Level Correlates with Tumor Immune Infiltration and Is a Positive Prognostic Marker for Advanced High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Mol Cancer Res MCR*. 2019;17(12):2537-48.
242. Le Gallo M, de la Motte Rouge T, Poissonnier A, Lavoué V, Tas P, Leveque J, et al. Tumor analysis: freeze-thawing cycle of triple-negative breast cancer cells alters tumor CD24/CD44 profiles and the percentage of tumor-infiltrating immune cells. *BMC Res Notes*. 2018;11(1):401.

## Remerciements

Je tiens à remercier tous les membres du jury qui ont accepté de juger ces travaux de thèse.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur Benoit You d'avoir accepté d'être rapporteur malgré de nombreuses sollicitations et un emploi du temps chargé.

Je remercie Madame le Docteur Hélène Le Buanec d'avoir accepté d'être rapporteur et de juger ces travaux.

Je remercie Madame le Professeur Nathalie Riou-Leclerc d'avoir accepté de juger ce travail, après m'avoir aidé à en assurer la continuité au cours des différents comités de suivi que nous avons eu ensemble.

Je remercie Madame le Professeur Marie-Dominique Gallibert d'avoir accepté de faire partie du mon jury de thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Vincent Lavoué de m'avoir proposé ce travail et de m'avoir encadré au cours de ces années passées. Merci pour ce soutien constant, à travers les difficultés rencontrées.

Je remercie Monsieur le Docteur Patrick Legembre d'avoir co-dirigé ce travail.

Finalement, je remercie ma famille, particulièrement mon épouse Aurélie qui m'a soutenu constamment, libéré le temps nécessaire et remotivé lors des moments difficiles pour accomplir ce travail.

Une dernière pensée pour toutes les patientes atteintes de cancers de l'ovaire et du sein, notamment à celles qui m'ont fait confiance pour les suivre dans ces parcours de soins difficiles. Ces travaux tentent d'apporter une contribution aux progrès thérapeutiques dans ces pathologies pour lesquelles il reste encore beaucoup à accomplir. Ils vous sont dédiés.

---

**Titre :** Rôle de CD95/CD95L dans les cancers du sein triple négatifs et de l’ovaire

**Mots clés :** Cancers du sein triple négatifs ; Organes génitaux femelles – Cancer ; Antigènes CD95

**Résumé :** Les cancers du sein triple négatifs et les cancers de l’ovaire séreux de haut grade partagent des caractéristiques biologiques communes, et le système immunitaire joue un rôle important dans le contrôle de l’évolution tumorale dans ces 2 maladies. Initialement caractérisée par son rôle dans l’apoptose des cellules immunitaires, la signalisation activée par l’interaction CD95/CD95L et son ligand soluble sCD95L est impliquée dans de nombreux rôles biologiques au-delà de l’apoptose, notamment dans les processus d’oncogénèse. Notre équipe avait montré le rôle pronostic négatif du sCD95L, favorisant l’invasion tumorale et les métastases chez les patientes atteintes de cancer du sein triple négatif.

Dans les cancers de l’ovaire, le niveau de sCD95L est un facteur pronostic positif corrélé à l’infiltrat immunitaire, soulevant l’hypothèse d’une régulation de cet infiltrat par la signalisation CD95/CD95L. Dans les cancers du sein triple négatifs, la signalisation CD95 impacte la réponse immune anti-tumorale. Ces travaux montrent qu’une meilleure compréhension des mécanismes biologiques activés par la voie CD95/CD95L dans les cancers de l’ovaire séreux de haut grade et dans les cancers du sein triple négatif pourrait permettre de mieux sélectionner les patientes pour des traitements modulant la réponse immune. Le ciblage de cette voie pourrait permettre d’améliorer la prise en charge thérapeutiques.

---

**Title :** Role of CD95/CD95L in triple negative breast and ovarian cancers

**Keywords :** Triple negative breast cancer; Ovarian cancer; CD95 antigens

**Abstract :** Triple-negative breast cancer and high-grade serous ovarian cancer share common biological features, and the immune system plays an important role in controlling tumor progression in both diseases. Initially characterized by its role in immune cell apoptosis, the signaling activated by the CD95/CD95L interaction and its soluble ligand sCD95L is involved in many biological roles beyond apoptosis, notably in oncogenesis processes. Our team had shown the negative prognostic role of sCD95L, promoting tumor invasion and metastasis in patients with triple negative breast cancer. In ovarian cancer, the level of sCD95L is a positive prognostic factor correlated with the immune infiltrate, raising the hypothesis that this infiltrate is regulated by CD95/CD95L signaling. In triple-negative breast cancer, CD95 signaling impacts the anti-tumor immune response.

This work shows that a better understanding of the biological mechanisms activated by the CD95/CD95L pathway in high-grade serous ovarian cancer and in triple-negative breast cancer could allow better selection of patients for treatments modulating the immune response. Targeting this pathway could lead to improved therapeutic management..