



HAL
open science

La résolution de l'inflammation comme approche thérapeutique innovante contre le cancer

Audrey Wetzel

► **To cite this version:**

Audrey Wetzel. La résolution de l'inflammation comme approche thérapeutique innovante contre le cancer. Biologie cellulaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2021. Français. NNT : 2021UBFCE029 . tel-03889376

HAL Id: tel-03889376

<https://theses.hal.science/tel-03889376>

Submitted on 8 Dec 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'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE à MED'INN'Pharma et à l'UMR1098 RIGHT Interactions Hôte-Greffon-Tumeur,
Ingénierie cellulaire et génique**

Ecole doctorale n°554 – Environnements-Santé

Doctorat de Biologie Cellulaire

Thèse présentée et soutenue le 7 décembre 2021, à Besançon

Par

Audrey Wetzel

**La résolution de l'inflammation
comme approche thérapeutique innovante contre le cancer**

Composition du Jury :

Monsieur Delneste Yves

DR, CRCINA, Nantes-Angers

Rapporteur,
Président du jury

Madame Bendriss-Vermare Nathalie

CR, U1052, Lyon

Rapporteur

Monsieur Perruche Sylvain

CR, MED'INN'Pharma-UMR1098, Besançon

Directeur de thèse

Monsieur Adotévi Olivier

PU-PH, UMR1098, Besançon

Codirecteur de thèse

Monsieur Quéré Ronan

CR, UMR1231, Dijon

Invité

Monsieur Jung Alain

CR, U1113, Strasbourg

Invité

Titre : La résolution de l'inflammation comme approche thérapeutique innovante contre le cancer

Mots clés : Cancer, inflammation, résolution de l'inflammation, facteurs pro-résolutifs

Résumé : Les cancers sont les conséquences d'un dysfonctionnement cellulaire, menant à une multiplication et prolifération anarchique au sein d'un tissu, et à terme pouvant se disséminer pour former des métastases à distance. Ces maladies complexes peuvent avoir des origines et des évolutions diverses, compliquant leur traitement. L'organisme est lui-même le premier acteur de défense face aux lésions précancéreuses. Les stratégies thérapeutiques actuelles ciblent principalement cette réponse de défense naturelle afin de permettre l'élimination des cellules cancéreuses. Cependant cette réponse inflammatoire peut être détournée par les cellules cancéreuses : la présence de cytokines, chimiokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance peuvent permettre aux cellules cancéreuses de croître, se différencier et migrer, favorisant ainsi la formation de métastases. Dans ce contexte, limiter l'inflammation durant la progression cancéreuse, au sein d'un microenvironnement tumoral, semble être une approche innovante pour prévenir l'échappement des cellules cancéreuses. Aussi, cette thèse vise à évaluer l'impact du traitement SuperMApo, médicament bio-identique aux propriétés pro-résolutives développé par la société MED'INN'Pharma, dans le traitement des cancers.

En utilisant différents modèles expérimentaux de cancers, nous avons mis en évidence une réponse différentielle de l'effet de l'injection de facteurs pro-résolutifs sur la progression tumorale.

Les facteurs pro-résolutifs sembleraient induire une réponse anti-tumorale pour des modèles de cancers liquides et caractérisés comme immunogènes. Nous avons ensuite étudié l'impact de l'injection de facteurs pro-résolutifs sur la réponse immunitaire. Nos principaux résultats montrent que :

- *In vitro* en absence de système immunitaire, les facteurs pro-résolutifs n'impactent pas les cellules cancéreuses directement. L'effet anti-tumoral du traitement serait dépendant de la mise en place d'une réponse immunitaire.
- L'injection de facteurs pro-résolutifs *in vivo* permettrait de moduler la réponse inflammatoire sans pour autant induire un environnement immunosuppresseur.
- La modulation de l'inflammation permettrait de réenclencher une veille immunitaire contre les cellules cancéreuses : l'augmentation des cellules immunitaires innées, au profil anti-tumoral, permettrait d'augmenter la réponse spécifique des lymphocytes T en IFN- γ , à l'origine de la réduction de la progression tumorale. L'ensemble de ces données suggère que l'administration de facteurs pro-résolutifs pourrait être une nouvelle stratégie dans certains cas de cancers afin de réduire la progression tumorale.

Title: Inflammation resolution as an innovative therapeutic approach against cancer

Keywords: Cancer, inflammation, inflammation resolution, pro-resolutive factor

Abstract: Cancers are consequences of cellular dysfunction leading to aberrant cellular multiplication and proliferation yielding subsequent metastasis formation. These diseases are complex, mainly due to a variety of origin and evolution, which complicate their treatment. The first step of defense is the immune system reaction against precancerous lesions. Currently, therapeutic strategies target this natural response in order to enhance immunosurveillance mechanisms against cancer cells. Yet, inflammation reaction with mediators, such as cytokines and growth factors, is used by cancer cells to achieve growth, differentiation and migration, therefore encouraging metastasis formation. For this reason, during cancer progression, limiting inflammation appears as an innovative strategy to avoid cancer cells escape. Thus, this thesis aims at investigating the impact of pro-resolutive factors administration, by SuperMApo treatment a bio-identical drug developed by MED'INN'Pharma, within the framework of cancer treatment.

Using different experimental cancer models, we have observed a differential response of the pro-resolutive factors injection effects on cancer progression. The pro-resolutive factors seem to induce anti-tumoral responses for immunogenic liquid cancer models. The impact of pro-resolutive factors administration on immune response has been evaluated. Our main results shown that:

- *In vitro*, without immune system, pro-resolutive factors do not directly impact cancer cells. Anti-tumoral effects seem to depend on the immune response process.
 - Pro-resolutive factors injection may promote the modulation of the inflammatory response without being immunosuppressive.
 - Inflammation modulation seems to restore the immune surveillance against cancer cells: increasing IFN- γ T cells specific response could be at the origin of the tumor regression.
- Alltogether, these results suggest that pro-resolutive factors administration could provide a new strategy in a variety of cancer cases by reducing their progression.

Remerciements

J'exprime mes plus sincères remerciements aux Docteurs Nathalie Bendriss-Vermare et Yves Delneste, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et pour le temps consacré à sa lecture et à son évaluation.

Je tiens également à remercier chaleureusement les Docteurs Ronan Quéré et Alain Jung pour leur accompagnement et leurs précieux conseils tout au long de ma thèse.

Je tiens à exprimer chaleureusement mes remerciements au Docteur Sylvain Perruche pour m'avoir accueilli au sein de la société MED'INN'Pharma et pour m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci pour ton encadrement durant ces années, ton expertise, ton enthousiasme mais surtout ta confiance malgré les différents obstacles rencontrés. Tu as bien souvent eu plus confiance en mon travail et en moi, que moi-même et je t'en suis reconnaissante. Merci à toi.

Je tiens également à remercier sincèrement le Professeur Olivier Adotévi, pour son expertise scientifique, ses précieux conseils et ses encouragements tout au long de ces années de thèse.

Je remercie également le Professeur Philippe Saas pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité RIGHT (UMR1098), pour ses conseils, son expertise scientifique, sa présence, sa gentillesse, sa compréhension et ses encouragements.

Je remercie également MED'INN'Pharma et l'ANRT pour leur soutien financier durant ces quatre années de thèse.

A tous mes collègues de MED'INN'Pharma, merci à vous. J'ai été ravie de partager ces années de thèse avec vous. Merci à toi Francis pour ton expertise à la paillasse, tes précieux conseils mais surtout ton soutien pendant ces 4 années. Mélanie, je te remercie infiniment : merci pour ta compréhension, ta bienveillance, ton accompagnement, tu as toujours eu les mots justes et réconfortants, merci à toi. Amélie, merci à toi, merci pour ta bonne humeur et ta bienveillance.

A toutes les personnes de l'UMR1098, j'adresse de sincères remerciements : merci à vous toutes et tous pour votre soutien et votre bienveillance tout au long de ces années.

Merci Sarah, Justine, Anne-Sophie, Morgane, Myriam et Alphonsine pour votre accompagnement et votre gentillesse.

Merci Jean-René, Sabeha, Laurie, Elodie, Clémentine, Laura, Maxime, Margaux, Mathieu, Benoit pour nos échanges, vos conseils et votre soutien.

Merci aux stagiaires que j'ai pu encadrer et particulièrement Mathieu, j'espère t'avoir transmis la passion pour la recherche. Je te souhaite une très belle réussite.

Et enfin merci à vous, anciens de l'IBCT/nouveaux de BioInnovatin (ou EFS...).

Merci à Omayra et Thierry pour les échanges et leur transmission.

Merci à toi Hanane, pour ta gentillesse et ton accompagnement.

Merci Séverine pour ta bonne humeur quotidienne.

Ines, merci à toi, pour ta bienveillance, ton enthousiasme et ta lucidité.

Merci à toi Mathilde, ravie d'avoir partagée un moment le même bureau, merci pour ton enthousiasme.

Enfin merci aux collègues, devenus ami(e)s, cette grande famille...

Merci Blandine, pour les repas et les discussions (avec une pointe de commérage de ta part, ahah).

Merci Mélissa, ma binome depuis tant d'années, merci à toi pour ton côté passionné, merci pour ton soutien et ta compréhension toutes ces années : un vrai pilier.

Merci à vous, l'autre binome de choc : Ludivine et Camille, sans vous ces années n'auraient pas été les mêmes. Merci à vous pour votre soutien, à Besançon, à Dijon, au laboratoire mais aussi en dehors.

Merci Anaïs, merci mille fois à toi pour ton soutien jusqu'au bout, ta sincérité et ta grande fidélité. J'ai été ravie de partager un bout de cette aventure avec toi et que cette amitié dure au-delà.

Cécile...(et Rémi !) peu de mots pourraient te remercier suffisamment. Merci à ma grande sœur de thèse.

Merci de m'avoir supporté toutes ces années (vraiment !). Tu es un modèle de douceur, de rigueur et de diplomatie. Je suis ravie d'avoir (et de continuer, je l'espère encore longtemps) à partager mon bureau avec toi, mais surtout de partager cette très belle et solide amitié !

Merci à vous les filles, Célosie, Cathy, Chloé, Eloïse. Merci pour votre compréhension et votre bienveillance.

Et Chloé, mille mercis. Merci pour les sessions sports, les sessions apéros, les sessions vacances, merci de m'avoir accompagnée pendant ces années...

Merci Amaury, d'avoir cru en moi et de m'avoir poussé dans mes études.

A ma famille...

Merci à mes grands-mères (merci pour la bienveillance et le suivi),

Merci Cathy pour les échanges, merci pour les discussions qui finalement ont permis une belle aventure. Merci pour ton soutien sans failles,

Merci à mes parents, merci à vous de m'avoir ouvert les portes de la curiosité. Même si vous aviez déjà donné auparavant, je vous remercie pour votre compréhension et votre soutien dans toutes les épreuves. Vous avez su être présents quand il le fallait et je vous en remercierai jamais assez...

Merci mon grand-frère. Là, le rôle de grand frère prend tout son sens. Tu as su être un grand frère exemplaire et... véritablement un exemple. Je ne te remercierai jamais suffisamment d'avoir été aussi présent et bienveillant. Merci mille fois.

A vous, mes grands-pères, j'espère que vous êtes fiers,

Tables des matières

Remerciements	1
Tables des matières	4
Tables des illustrations	6
Figures	6
Tableaux	8
Abréviations	9
Préambule	11
Introduction	14
Partie I.	14
Rôle de l’inflammation et de sa résolution dans le développement des cancers.....	14
1. La réponse inflammatoire : un processus physiologique	15
2. L’Inflammation dans le cancer : un processus physiopathologique	21
3. La résolution de l’inflammation dans le cancer	30
Partie II.	39
La stratégie de cibler l’inflammation dans le traitement du cancer	39
1. Cibler le circuit inflammatoire	39
2. Cibler les cellules immunitaires innées	46
3. Promouvoir la résolution de l’inflammation	48
Partie III.	54
Les thérapies conventionnelles et la nécessité du développement de nouvelles approches anti-cancéreuses	54
1. Les cibles des thérapies anti-cancéreuses conventionnelles	54
2. La proposition d’une nouvelle approche pro-résolutive innovante dans le traitement de cancers : candidat médicament bio-identique, SuperMApo	61
Objectifs	64
Matériel et méthodes	66
1. Modèles expérimentaux.....	66
2. Expérimentations <i>ex vivo</i> et <i>in vitro</i>	68
3. Production de SuperMApo	71

4. Représentation graphique et analyse statistique	71
Résultats	74
Partie I.	74
Etude exploratoire de l'effet du traitement par facteurs pro-résolutifs dans des modèles expérimentaux de cancers	74
1. Modèles de tumeurs solides	74
2. Modèles de tumeurs liquides	93
Partie II.	100
Mécanismes d'actions des facteurs pro-résolutifs comme approche innovante en thérapie anti-cancéreuse.....	100
1. Le traitement SuperMApo limite la progression des cancers liquides.....	100
2. Le traitement SuperMApo n'impacte pas directement les cellules cancéreuses	102
3. L'effet anti-tumoral du traitement nécessite la mise en place d'une immunosurveillance	104
4. Le traitement SuperMApo soutient la réponse anti-tumorale sans être immunosuppresseur	107
5. Le traitement SuperMApo maintient une veille immunitaire anti-tumorale	112
6. ANNEXE : " <i>Pro-resolving factor administration limits cancer progression by enhancing immune response against cancer cells</i> "	115
Discussions et perspectives.....	146
Discussions des principaux résultats	146
1. Impact du traitement SuperMApo suivant les différents modèles expérimentaux de cancers	146
2. Sélection des modalités de traitement SuperMApo	149
3. SuperMApo, soutien de la surveillance immunitaire	152
4. Potentiels mécanismes anti-tumoraux du traitement SuperMApo & cas d'échecs thérapeutiques	155
Résultats complémentaires & perspectives	156
1. Effet dépendant du système immunitaire ?.....	156
2. Origine de la réduction d'inflammation ?	157
3. SuperMApo soutient de l'action anti-tumorale des macrophages ?	158
4. Fonction effectrice des lymphocytes T ?.....	158
Conclusion générale	160
Bibliographie.....	164

Tables des illustrations

Figures

Figure 1. Schéma de la réponse inflammatoire, un processus en deux étapes.	15
Figure 2. La reconnaissance des signaux de dangers par les cellules immunitaires.	17
Figure 3. Recrutement des cellules du système immunitaire lors de la réponse inflammatoire.	21
Figure 4. Les trois phases de l'édition des cancers : l'élimination, l'équilibre et l'échappement.....	23
Figure 5. Rôle de l'inflammation dans le développement tumoral.	25
Figure 6. La mise en place de la résolution de l'inflammation.....	33
Figure 7. Les différents types d'inflammation pro-tumorale.	37
Figure 8. Schéma du ciblage des COX lors de l'utilisation d'anti-inflammatoires.....	41
Figure 9. Le TNF- α dans le cancer et dans l'inflammation.	45
Figure 10. Les cibles thérapeutiques des macrophages.....	48
Figure 11. Les macrophages pro-résolutifs.	49
Figure 12. Les médiateurs lipidiques dans la résolution de l'inflammation.....	51
Figure 13. Les médiateurs pro-résolutifs spécialisés (SPM) dans l'inflammation et dans le cancer.....	53
Figure 14. Infiltration immunitaire induite par les thérapies conventionnelles.	54
Figure 15. L'inflammation induite par les thérapies conventionnelles source d'immunosurveillance et de promotion tumorale.....	57
Figure 16. Les principaux points de contrôles immunitaires.	59
Figure 17. Effet du traitement SuperMApo sur la croissance tumorale des différentes lignées injectées en sous-cutanées.	77
Figure 18. Effet du traitement SuperMApo sur les cellules immunitaires de la tumeur et de la rate..	80
Figure 19. Effet du traitement SuperMApo associé aux thérapies conventionnelles, sur la croissance de tumeurs solides.	83

Figure 20. Effet du traitement SuperMApo sur la croissance tumorale de B16 chez des souris C57Bl/6 injectées en LPS.	86
Figure 21. Effet du traitement SuperMApo sur les cellules immunitaires de la tumeur chez des souris C57Bl/6 injectées en LPS.	88
Figure 22. Effet du traitement SuperMApo sur le développement de tumeurs du côlon de souris BALB/c.	90
Figure 23. Effet du traitement SuperMApo sur les cellules immunitaires 45 jours post traitement chez les souris BALB/c ayant développé spontanément des tumeurs du côlon.	92
Figure 24. Effet du traitement SuperMApo sur la croissance de tumeur liquide (intraveineux).....	95
Figure 25. Effet du traitement SuperMApo sur le nombre de lymphocytes T dans les ganglions inguinaux dans le modèle de tumeur liquide (intraveineux).	97
Figure 26. Effet du traitement SuperMApo sur la croissance de tumeur liquide (intrapéritonéale)....	99
Figure 27. Le traitement SuperMApo limite la progression des cancers liquides.....	101
Figure 28. Effet du traitement SuperMApo sur les cellules EL4 <i>in vitro</i>	103
Figure 29. L'effet anti-tumoral du traitement SuperMApo suivant l'immunogénéicité de la lignée et la mise en place de l'immunosurveillance.	106
Figure 30. Immunorégulation par le traitement SuperMApo.	109
Figure 31. Absence d'immunosuppression suite au traitement SuperMApo.	111
Figure 32. Réponse en IFN- γ spécifique de la tumeur, 13 jours post traitement SuperMApo.	114
Figure 33. Vue d'ensemble des potentiels effets anti-tumoraux du traitement SuperMApo dans des modèles expérimentaux de cancers.....	161

Tableaux

Tableau 1. Rôle des différents types cellulaires lors d'une réponse inflammatoire, et leur fonction anti- et pro-tumorale.....	30
Tableau 2. Tableau non exhaustif de cas d'inflammation chronique et d'infection associées au développement de cancer.....	35
Tableau 3. Description des lignées cancéreuses murines utilisées pour les modèles expérimentaux de cancers.....	67
Tableau 4. Références des anticorps utilisés pour les marquages de cytométrie en flux.	70
Tableau 5. Références des kits de détection pour cytokines et DAMPs.	71

Abréviations

AA :	<i>Arachidonic acid</i>
ADN :	<i>Acide désoxyribonucléique</i>
AOM :	<i>Azoxymethane</i>
APC :	<i>Antigen-presenting cell</i>
ATP :	<i>Adenosine triphosphate</i>
CAR :	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CCL :	<i>C-C chemokine ligand</i>
CD :	<i>Cluster of differentiation</i>
CFSE :	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CLR :	<i>C type lectin receptors</i>
CMH :	<i>Complex major histocompatibility</i>
COX :	<i>Cyclooxygenase</i>
CT :	<i>Chemotherapy</i>
CTLA-4 :	<i>Cytotoxic T lymphocyte associated protein</i>
CXCL :	<i>C-X3-C motif ligand</i>
DAMP :	<i>Damage associated molecular pattern</i>
DSS :	<i>Dextran sulfate Sodium</i>
EDTA :	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FASL :	<i>FAS ligand</i>
FBS :	<i>Fetal bovine serum</i>
Fc :	<i>Fragment crystallizable</i>
FoxP3 :	<i>Forkhead box P3</i>
FVD :	<i>Fixable viability Dye</i>
HBSS :	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HMGB1 :	<i>High mobility group box 1</i>
HSP70 :	<i>Heat Shock Protein</i>
ICAM :	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
ICD :	<i>Immunogenic cell death</i>
IDO :	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IL :	<i>Interleukin</i>
JAK :	<i>Janus Kinase</i>
LPS :	<i>Lipopolysaccharides</i>
MAPK :	<i>Mitogen activated protein kinases</i>
MDSC :	<i>Myeloid derived suppressor cell</i>
MFI :	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MMP :	<i>Matrix metalloproteinase</i>
NETs :	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NF- κ B :	<i>Nuclear factor-kappa B</i>

NK :	<i>Natural killer</i>
NKT :	<i>Natural killer T cell</i>
NSAID :	<i>Nonsteroidal anti-inflammatory drug</i>
PAMP :	<i>Pathogene associated molecular pattern</i>
PD-L1 :	<i>Programmed cell death ligand</i>
PD-1 :	<i>Programmed cell death</i>
PGE2 :	<i>Prostaglandin E2</i>
PMA :	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PMN :	<i>Polymorphonuclear neutrophil</i>
PRR :	<i>Pattern recognition receptor</i>
ROR γ T :	<i>Orphan nuclear receptor</i>
ROS :	<i>Reactive oxygen species</i>
RT :	<i>Radiotherapy</i>
RTCT :	<i>Radiotherapy-Chemotherapy</i>
SEM :	<i>Standard error of the mean</i>
SPM :	<i>Specific pro-resolving mediator</i>
STAT3 :	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SuperMApo [®] :	<i>Supernatant issued from macrophage and apoptotic cell culture</i>
TAM :	<i>Tumor associated macrophages</i>
TCR :	<i>T cell receptor</i>
TGF- β :	<i>Transforming Growth Factor</i>
Th :	<i>T helper</i>
TILs :	<i>Tumor infiltrating lymphocyte</i>
TLR :	<i>Toll like receptors</i>
TNF- α :	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR1 :	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
Treg :	<i>Regulatory T cell</i>
VCAM :	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF :	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
5-FU :	<i>5-fluorouracil</i>

Préambule

L'inflammation est une réponse physiologique de l'organisme pour répondre à une agression. Ce mécanisme de défense naturelle vise à enrichir la réponse inflammatoire, qui au cours du temps s'estompe grâce à la mise en place de la résolution de l'inflammation. Cette dernière étape consiste au retour à l'homéostasie des tissus agressés.

Dans le cadre des cancers, cette réponse inflammatoire est nécessaire pour lutter contre le développement des cellules cancéreuses. Cependant, cette richesse inflammatoire, au sein d'un microenvironnement tumoral, est utilisée par les cellules cancéreuses pour croître, migrer, se différencier et ainsi échapper à la surveillance immunitaire.

Dans ce contexte, différentes stratégies thérapeutiques ont émergé au cours de ces dernières années dans le but de cibler l'inflammation pour limiter la progression tumorale : (i) cibler le circuit inflammatoire, (ii) les cellules inflammatoires et (iii) promouvoir la résolution de l'inflammation.

Ces différentes stratégies ouvrent une nouvelle fenêtre d'étude dans le traitement des cancers en complément des thérapies anti-cancéreuses conventionnelles comme la radiothérapie, la chimiothérapie ou encore les inhibiteurs de points de contrôles immunitaires.

Les médiateurs issus de l'efferocytose, mimant le processus de résolution de l'inflammation, ont des propriétés pro-résolutives. Ces médiateurs pro-résolutifs constituent le médicament bio-identique SuperMApo® (*Supernatant issued from macrophage and apoptotic cell culture*) et permettent de limiter l'inflammation dans des modèles expérimentaux inflammatoires. Ces travaux visent donc à exploiter ces médiateurs dans le traitement du cancer afin d'étudier l'intérêt de cette approche dans l'amplification d'une réponse anti-tumorale.

INTRODUCTION

Introduction

Partie I.

Rôle de l'inflammation et de sa résolution dans le développement des cancers

L'inflammation est un processus biologique mis en place par le système immunitaire en réponse à une agression de l'organisme. Cette réponse peut être initiée suite à différents types de stimuli, du soi (lésion tissulaire, cellules cancéreuses...) ou du non-soi (pathogènes, composés toxiques ...) et permet à l'organisme une réaction adaptée pour contrôler et éliminer le danger pour ensuite initier la guérison des tissus endommagés. Ainsi, la réponse inflammatoire est définie comme un mécanisme de défense naturel, essentiel au maintien de l'homéostasie de l'organisme¹.

La réponse inflammatoire est définie par deux étapes principales : l'inflammation et sa résolution (Figure 1). Durant la phase inflammatoire, des événements moléculaires et cellulaires se mettent en place afin de contenir et d'éliminer « l'agresseur ». La réaction inflammatoire est initiée par la formation d'un œdème au niveau tissulaire, caractérisée par la rougeur, le gonflement, la chaleur et la douleur. Ces caractéristiques sont dues à une réponse vasculaire (*via* l'augmentation de l'apport sanguin et la perméabilité vasculaire) suivie d'une réponse immunitaire, d'abord locale puis systémique (*via* le recrutement du système immunitaire). Ainsi, au niveau tissulaire, l'apport sanguin et la perméabilité vasculaire permettent le recrutement des cellules immunitaires et la libération de molécules pro-inflammatoires pour lutter contre l'agression. Une fois l'agresseur éliminé, l'arrêt de la phase inflammatoire et la restauration de l'intégrité tissulaire sont nécessaires pour un retour à l'homéostasie, ces dernières étapes représentant la phase de résolution de l'inflammation¹ (Figure 1).

L'absence de résolution de la réaction inflammatoire mène à une inflammation chronique pouvant alors devenir néfaste et peut promouvoir le développement d'une multiplicité de maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes. Ce contexte peut également contribuer au développement de certains cancers¹.

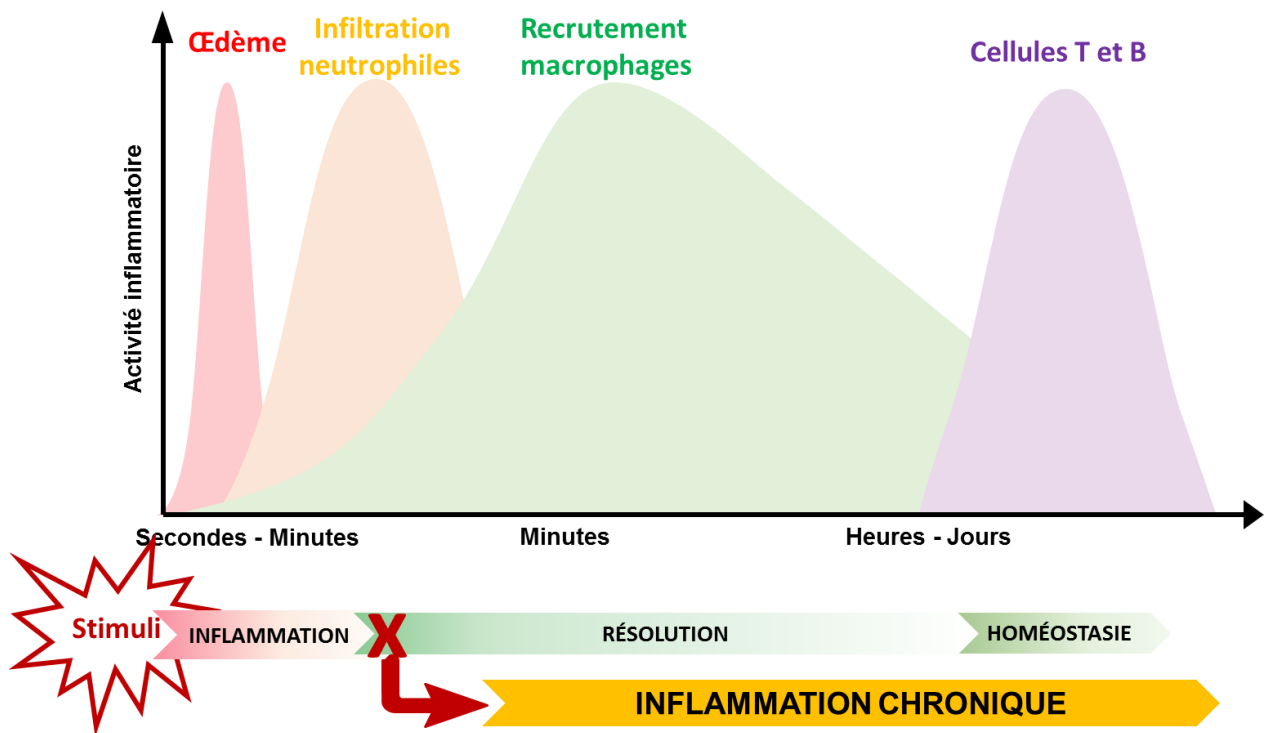


Figure 1. Schéma de la réponse inflammatoire, un processus en deux étapes. La phase précoce de réponse inflammatoire est caractérisée par le recrutement rapide (en quelques minutes) de l'immunité innée avec : (i) la formation d'un œdème, (ii) l'infiltration des neutrophiles (PMN) éliminant l'agresseur puis entrant en apoptose, (iii) l'élimination des corps apoptotiques par la phagocytose des macrophages. La réduction du nombre de neutrophiles et la sécrétion de médiateurs pro-résolutifs par les macrophages signent le début de la résolution de l'inflammation, avec le recrutement de cellules régulatrices et mémoires du système immunitaire adaptatif, pour un retour à l'homéostasie tissulaire au cours des jours suivant la menace. Si la résolution de l'inflammation n'a pas lieu, la phase inflammatoire aiguë mène à une inflammation chronique pouvant être à l'origine de pathologies variées. Figure adaptée de : Serhan et *al.*, 2005, Serhan, 2014 et Fullerton et *al.*, 2016²⁻⁴.

1. La réponse inflammatoire : un processus physiologique

A. La mise en place de la réponse inflammatoire

La réponse inflammatoire se met en place suite à une agression interne ou externe de l'organisme. Les tissus agressés libèrent alors des molécules chimiotactiques (histamine, prostaglandines, leucotriènes) qui, pour certaines, vont activer les cellules endothéliales locales et ainsi favoriser la vasodilatation des vaisseaux et l'apport sanguin. Ce processus permet en particulier le recrutement de cellules immunitaires innées. Les cellules endothéliales activées expriment à leur surface des molécules d'adhérence permettant aux cellules du système immunitaire de migrer au foyer inflammatoire. Ce recrutement cellulaire se déroule en trois étapes : (1) Le roulement, permis par l'interaction faible entre les sélectines exprimées à la membrane des cellules endothéliales activées et des leucocytes ; (2) L'adhérence et l'arrêt des leucocytes grâce à leur forte interaction avec les intégrines

endothéliales ; (3) La transmigration des cellules dans le foyer grâce aux molécules ICAM (*Intercellular adhesion molecule*) et VCAM (*Vascular cell adhesion molecule*)⁵.

Les premières cellules intervenant dans la réponse inflammatoire sont les cellules immunitaires innées (neutrophiles, monocytes circulants). Les monocytes sont recrutés par les cellules résidentes (cellules non immunitaires résidentes, macrophages résidents et mastocytes), pour être activées. Les monocytes se différencient à leur tour sur site en macrophages ou cellules dendritiques. Les cellules immunitaires innées expriment à leur surface membranaire des récepteurs PRR (*Pattern recognition receptor*) permettant la reconnaissance des signaux de danger du soi, les DAMPs (*Damage associated molecular patterns*), ou dérivés de pathogènes, les PAMPs (*Pathogene associated molecular patterns*)⁶. Les DAMPs sont des molécules de dangers issues du soi telles que les antigènes tumoraux, HMGB1 (*High group box 1 protein*), HSP (*Heat shock protein*) ou l'ATP (*Adenosine triphosphate*), alors que les PAMPs sont des molécules dérivées de pathogènes incluant notamment les acides nucléiques microbiens ou les LPS (*Lipopolysaccharides*). Les récepteurs PRR, tels que les TLR (*Toll like receptors*) et les CLR (*C type lectin receptors*), sont pourvus d'une partie protéique transmembranaire. Lors de l'activation des PRR, la signalisation intracellulaire induit la transcription de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, gènes codant pour des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires⁶ (Figure 2). Cette signalisation est à l'origine de l'amplification de la réponse inflammatoire. Par exemple, l'IFN (*Interferon*) de type I induit le recrutement des neutrophiles, des phagocytes mais également l'activation des cellules dendritiques, conduisant ainsi la continuité de la réponse inflammatoire avec l'activation de la réponse immunitaire adaptative. La présence de mutation, ou l'absence de régulateurs négatifs au sein des interactions entre les PRR et leur ligand, entraîne une réponse pro-inflammatoire accrue, notamment à l'origine du développement de maladies (inflammatoires, auto-immunes, mais également de cancers)⁶.

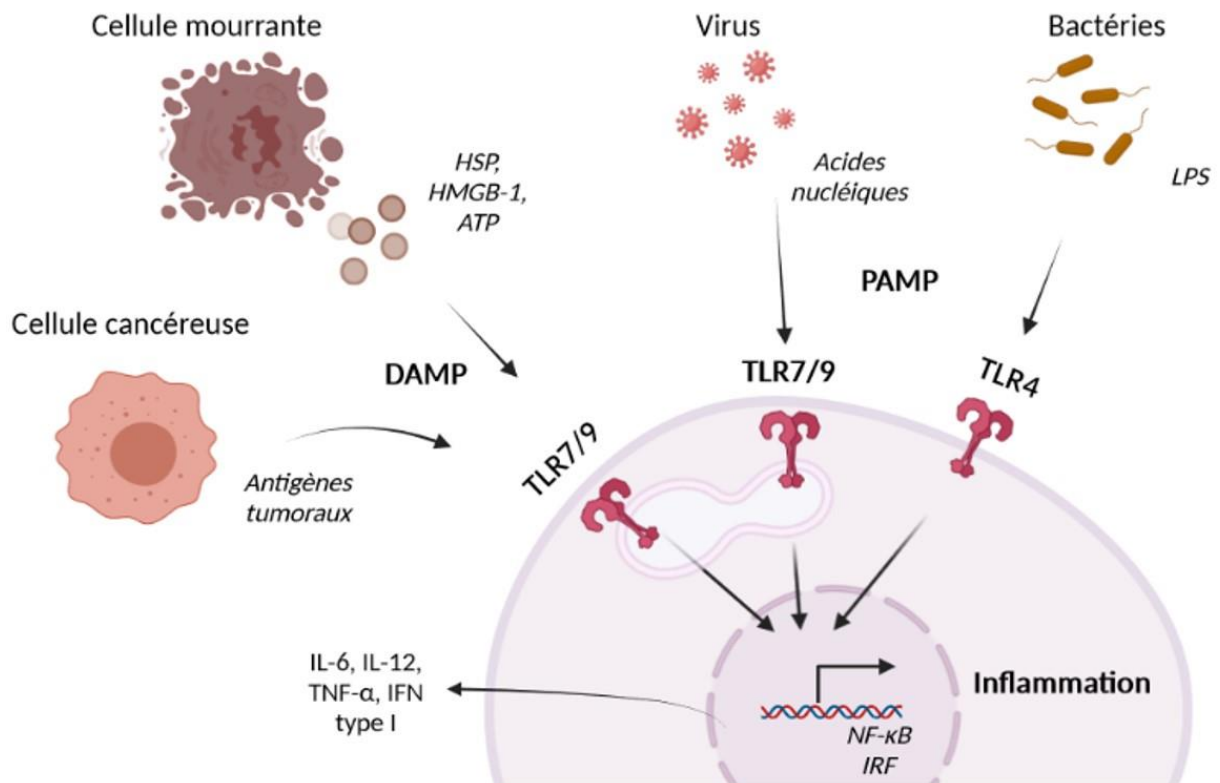


Figure 2. La reconnaissance des signaux de dangers par les cellules immunitaires. Les PRR présents à la surface des cellules immunitaires innées reconnaissent les signaux de danger issus du soi, les DAMPs (HSP, HMGB1, ATP, antigènes tumoraux) et les signaux de danger issus du non soi, les PAMPs (LPS, acides nucléiques viraux). La liaison de ces ligands au niveau des PRR active les voies inflammatoires, telle que la voie NF-κB, au sein de la cellule immunitaire, pour induire la transcription des gènes pro-inflammatoires à l'origine de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-12, IFN-γ, IL-6). Figure adaptée de : Takeuchi et *al.*, 2010⁶.

▪ Les neutrophiles

Les neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants de la circulation sanguine chez l'Homme, malgré leur courte durée de vie (environ 6 à 8 h)⁸. Les neutrophiles jouent un rôle primordial dans la réponse inflammatoire puisque ce sont les premières cellules à être recrutées au site inflammatoire. En effet, les neutrophiles guident la première étape de défense de l'hôte contre les dommages tissulaires après la détection d'un danger. Ce sont des cellules capables d'induire une réponse effectrice robuste puisqu'ils expriment de nombreux récepteurs nécessaires à la reconnaissance des molécules pro-inflammatoires. Les neutrophiles sont dotés de récepteurs Fc (*Fragment crystallizable*), de récepteurs d'adhérence, de PRR et de récepteurs aux cytokines. Ces récepteurs leur permettent de migrer au sein du site inflammatoire, notamment en réponse au gradient de cytokines et chimiokines produites par les monocytes circulants et les macrophages résidents⁸. Une fois sur site, les neutrophiles vont exercer leur fonction permettant d'éliminer l'élément agresseur mais également de recruter d'autres cellules du système immunitaire par la production de molécules et médiateurs pro-

inflammatoires comme par exemple le TNF- α (*Tumor necrosis factor*), l'interleukine (IL)-8 et les ROS (*Reactive oxygen species*). De plus, les neutrophiles libèrent leurs granules comme la cathepsine G capable de recruter les monocytes, et synthétisent des NETs (*Neutrophil extracellular traps*) constitués de chromatine et de peptides antimicrobiens, permettant l'inhibition du danger. En plus de ces mécanismes, les neutrophiles sont également capables d'ingérer les éléments menaçants par phagocytose⁸. La phagocytose est un processus naturel capable de protéger l'hôte contre une agression par l'adhérence, l'internalisation et la dégradation de l'élément agresseur. Le neutrophile va entourer l'élément de danger pour l'internaliser, phénomène facilité par la présence de Fc récepteurs à la membrane et de l'opsonisation par des anticorps et les molécules du complément. Ensuite, un phagosome se forme dans lequel les enzymes hydrolytiques et les ROS permettent l'élimination de la menace^{1,4,8} (Figure 3).

- Les monocytes circulants et les macrophages résidents

De manière similaire aux neutrophiles, les monocytes circulants sont recrutés rapidement après l'agression. Ils représentent environ 3 % des leucocytes circulants. Les monocytes sont recrutés très précocement grâce aux produits issus de la coagulation et aux facteurs issus de la dégranulation des plaquettes. Leur recrutement se perpétue grâce à leur interaction avec les cellules endothéliales et aux facteurs chimio-attractants libérés au niveau du site inflammatoire⁹. Au sein du foyer inflammatoire, les monocytes se différencient en macrophages et permettent une action de soutien aux macrophages résidents. Ces cellules sont caractérisées comme des cellules phagocytaires, mais aussi présentatrices de l'antigène (APC - *Antigen presenting cell*), à l'origine de la réponse inflammatoire. Ainsi recrutés, les macrophages sont sous l'influence des facteurs pro-inflammatoires de l'environnement (comme les cytokines pro-inflammatoires, les interférons et les DAMPs) et mènent à la polarisation du macrophage en macrophage pro-inflammatoire de type 1 (M1). Les M1 secrètent de nombreux médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12 et également des chimiokines maintenant la réponse inflammatoire^{1,9} (Figure 3). En effet, ces médiateurs pro-inflammatoires sont à l'origine d'une transduction de signal intracellulaire par l'activation des voies de signalisation NF- κ B (*Nuclear factor-kappa B*) et MAPK (*Mitogen activated protein kinases*) chez les cellules immunitaires, à l'origine de leur prolifération, leur différenciation, mais également leur survie et leur migration (favorisant ainsi l'amplification de la réaction inflammatoire). Il en est de même pour les médiateurs appelés alarmines, comme par exemple HMGB1 : lorsque celles-ci se trouvent au niveau extracellulaire, la réponse inflammatoire est soutenue par ces voies de signalisation^{1,9,10}.

- Les cellules dendritiques

Tout comme les macrophages les cellules dendritiques (DC) peuvent être résidentes du tissu lésé par la menace, ou recrutées à partir des monocytes sentinelles. De manière analogue aux macrophages, ces cellules permettent la présentation de l'antigène et ainsi amplifient la réponse immunitaire permettant le lien entre réponse innée et adaptative¹¹ (Figure 3). Ces cellules reconnaissent les signaux de danger, à l'origine de leur maturation. Elles expriment des molécules de co-stimulation et des cytokines inflammatoires permettant leur migration au niveau des organes lymphoïdes secondaires et la présentation de l'antigène aux lymphocytes¹¹. C'est grâce à leur complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) que les DC présentent l'antigène aux cellules du système immunitaire (Figure 3). Parmi celles-ci, les lymphocytes T (LT) reconnaissent les peptides antigéniques grâce à leur TCR (*T cell receptor*).

- Les lymphocytes T

Lorsque la source de l'agression n'a pas été complètement éliminée par les cellules innées, les tissus en périphérie du site inflammatoire sont sollicités. Le flux sanguin étant plus important lors d'une phase inflammatoire, les organes lymphoïdes secondaires sont plus irrigués. Les DC matures favorisent, au niveau des organes lymphoïdes secondaires, l'activation des LT naïfs qui vont se polariser en LT CD8+ et LT CD4+ effecteurs. Ce processus est permis grâce au peptide présenté par les DC aux TCR des LT¹². L'expansion d'un lymphocyte T CD4+ spécifique de l'antigène est de l'ordre de 5 000 fois, et pour le lymphocyte T CD8+ spécifique de l'antigène, 50 000 fois¹³. Une fois activés, les LT éliminent la source inflammatoire grâce à leur fonction effectrice, suite à leur migration au sein des tissus cibles lésés. Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL) exercent une fonction de cytotoxicité directe vis-à-vis de l'agresseur. Cette cytotoxicité peut être induite par deux voies à l'origine de la neutralisation de l'agression. D'une part, les CTL induisent l'exocytose de granules contenant granzymes et perforines. Ces molécules permettent la formation de pores au sein de la membrane plasmique des cellules cibles pour y pénétrer et générer leur mort par apoptose. L'apoptose est une mort cellulaire dite programmée, suite à un signal, un type de mort cellulaire physiologique nécessaire à l'homéostasie. Cette mort par « autodestruction » induit une diminution du volume de la cellule et la formation de bourgeonnements par la membrane plasmique, avec l'expression à la surface de signaux de type « *eat-me* ». Ces signaux permettent leur reconnaissance par les cellules phagocytaires pour leur élimination. Cette mort est dite propre car aucun contenu cytoplasmique n'est libéré, limitant

ainsi une inflammation supplémentaire. L'apoptose peut également être déclenchée par une seconde voie, la voie FAS/FASL (*FAS ligand*)¹⁴. En plus de l'action des CTL, d'autres cellules immunitaires sont à l'origine d'une augmentation de cette réponse cytotoxique vis-à-vis des cellules cibles, puisque ces cellules viennent en soutien des CTL. En effet, les lymphocytes T CD4+, une fois activés, prolifèrent et se différencient en lymphocytes T effecteurs (Th1, Th2, Th9, Th17). Ainsi, suivant leur profil (et notamment la sécrétion de cytokines telles que l'IFN- γ , IL-2, IL-9, IL-17), les LT effecteurs induisent l'amplification de la réponse lymphocytaire pour lutter contre l'agresseur. Par exemple, les Th1 sont des cellules polarisées grâce à l'action de l'IL-12 par les APC. Les Th1 secrètent de l'IFN- γ à l'origine de l'augmentation de la présentation de l'antigène et de la capacité phagocytaire des macrophages. Ainsi, l'IFN- γ permet d'augmenter la réponse des CTL, grâce à la présentation antigénique^{1, 14, 15}. En revanche, la cytokine IL-2 permet la polarisation des LT régulateurs responsable de l'inhibition de l'activité des CTL et des cellules NK (*Natural killer*)¹⁴.

D'un point de vue global, la réponse lymphocytaire, suite à la présentation antigénique, est caractérisée par une expansion clonale et promeut la formation de LT mémoires, permettant ainsi à la réaction inflammatoire de persister dans le temps. Durant ce processus, les LT acquièrent des fonctions de surveillance spécifique vis-à-vis d'une nouvelle agression potentielle. Les cellules mémoires sont renouvelées 3 à 4 fois plus vite que les lymphocytes T naïfs. De plus, ces cellules ont la capacité à réagir rapidement en produisant des cytokines et en éliminant la cible une fois reconnue^{1, 12-14}.

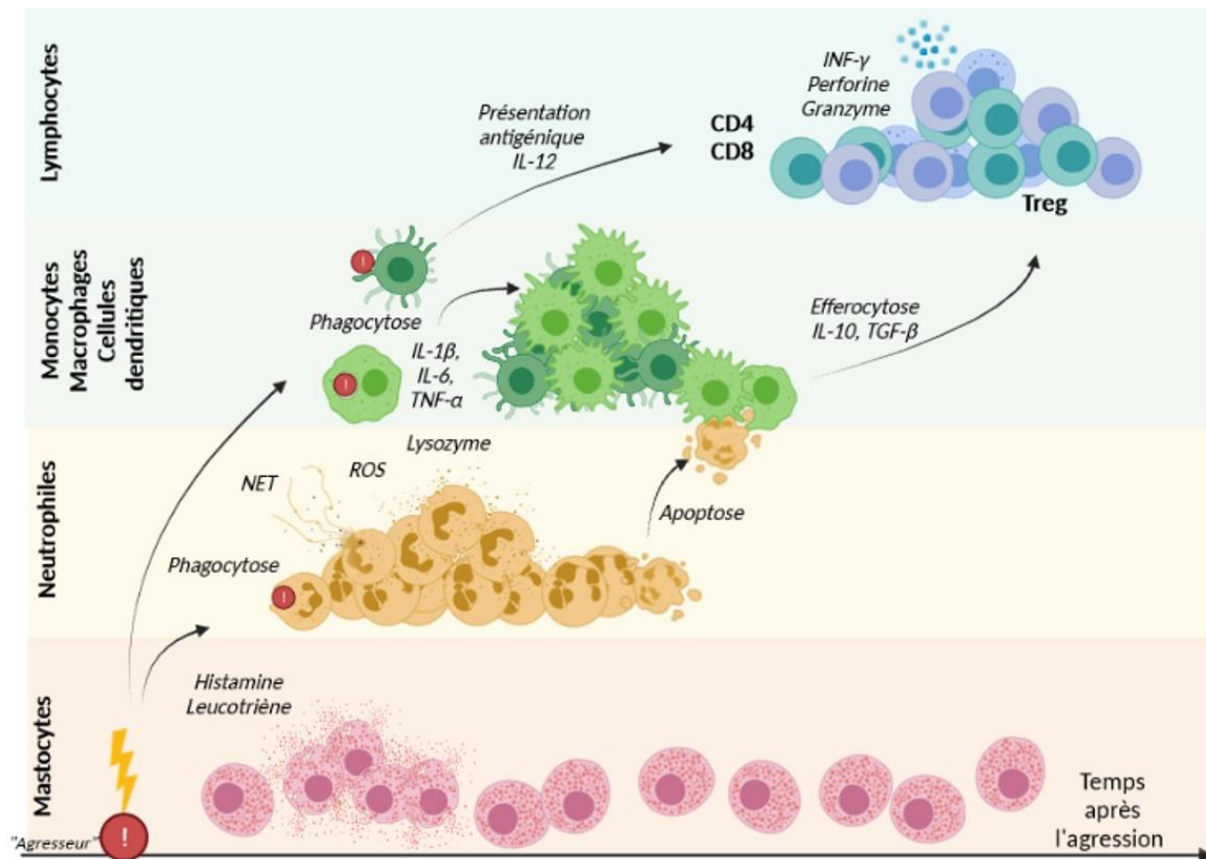


Figure 3. Recrutement des cellules du système immunitaire lors de la réponse inflammatoire. Durant la phase précoce de la réponse inflammatoire, les mastocytes sont à l'origine de médiateurs (histamines, leucotriènes) qui permettent le recrutement de neutrophiles. Les neutrophiles phagocytent la menace et induisent la production de NET, ROS et de lysozyme. Une fois le danger éliminé, les neutrophiles entrent en apoptose. Les monocytes sont également recrutés par l'environnement inflammatoire et se différencient en macrophages et cellules dendritiques. Les cellules dendritiques vont capter les antigènes de l'élément agresseur pour les présenter aux lymphocytes T. Cette présentation permet d'activer la réponse adaptative par la polarisation des lymphocytes T effecteurs (CD4+ et CD8+) à l'origine de la production de molécules permettant d'éliminer la menace (INF- γ , perforine, granzyme). Les macrophages phagocytent également les éléments de danger et sont à l'origine de la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL1- β , IL-6 et TNF- α) qui permettent le recrutement de nouvelles cellules immunitaires innées sur site. Les macrophages éliminent les neutrophiles entrés en apoptose. Ce nettoyage permet l'arrêt du recrutement des neutrophiles et le changement du phénotype pro-inflammatoire des macrophages vers un profil anti-inflammatoire avec l'induction de lymphocytes T régulateurs (Treg). Figure adaptée de : Koh et al. 2011⁹.

2. L'Inflammation dans le cancer : un processus physiopathologique

L'inflammation est une réponse immunitaire de l'organisme dont le but est de se protéger contre des stimuli du soi mais également du non soi. L'inflammation joue donc un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme lorsque celui-ci subit une agression. Lors du développement de pathologies telles que les cancers, la mise en place d'une phase inflammatoire et sa résolution sont indispensables pour limiter la progression des cellules cancéreuses. C'est au début du 20^{ème} siècle qu'il a été proposé que la réponse inflammatoire joue un rôle prépondérant dans la surveillance anti-tumorale, à l'origine de l'éradication des cellules cancéreuses, avant d'être détectée et vérifiée

cliniquement. Des expérimentations chez des souris ont montré le potentiel du système immunitaire dans le rejet de greffes cancéreuses¹⁶. Ainsi le système immunitaire, par l'induction d'une réponse inflammatoire, permet le maintien de l'élimination des cellules cancéreuses. Toutefois, certaines cellules immunitaires peuvent également être néfastes pour la surveillance immunitaire.

A. Le principe des 3 E : Elimination, Equilibre et Echappement

L'édition des cancers est caractérisée par 3 phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement, mettant en relation les cellules du système immunitaire et les cellules cancéreuses¹⁶⁻¹⁹. Les cellules du système immunitaire permettent dans un premier temps d'éliminer les cellules cancéreuses grâce à l'immunosurveillance. Cependant, au cours du temps, les cellules cancéreuses prennent le pas sur les réactions du système immunitaire. Ainsi, un équilibre entre ces deux types cellulaires s'installe, de manière transitoire, puisque les cellules cancéreuses acquièrent de multiples stratégies pour ne plus être reconnues par le système immunitaire. Cet équilibre se voit donc rompu, et les cellules cancéreuses prolifèrent, au détriment de la surveillance immunitaire.

L'élimination des cellules cancéreuses est un point clé du concept de surveillance immunitaire pour l'éradication des cellules cancéreuses. L'immunosurveillance est un processus dynamique mettant en jeu la réaction inflammatoire du système immunitaire vis-à-vis de la progression des cellules cancéreuses. L'immunosurveillance est définie comme la phase où les cellules cancéreuses sont éliminées par les cellules immunitaires (Figure 4). Cette lutte s'orchestre grâce au recrutement des cellules innées, mais également par les cellules du système immunitaire adaptatif¹⁶. L'immunosurveillance se déroule au sein du site tumoral ; les cellules cancéreuses, exprimant des antigènes tumoraux et des cytokines pro-inflammatoires, permettent le recrutement du système immunitaire. Ces signaux sont reconnus comme éléments de danger par le système immunitaire. Ce phénomène engendre alors l'initiation de la réaction inflammatoire¹⁶.

Cependant, au cours du temps, les cellules cancéreuses deviennent résistantes aux cellules immunitaires effectrices¹⁶. En effet, les cellules tumorales ont la capacité d'acquérir de nouvelles caractéristiques ne permettant plus au système immunitaire de les reconnaître pour les éliminer. Ce processus mène à la sélection des cellules tumorales réduisant ainsi l'immunogénéicité de la tumeur¹⁶. Ces cellules sélectionnées sont plus à même de survivre dans des modèles immunocompétents, expliquant le paradoxe de la formation tumorale chez ces individus¹⁶. L'accumulation de ces stratégies par les cellules tumorales face au système immunitaire, induit alors la progression du cancer (Figure 4).

Les cellules cancéreuses utilisent le système immunitaire en leur faveur, et notamment l'environnement pro-inflammatoire « riche » pour progresser. En effet, les cellules cancéreuses, au sein de ce microenvironnement, vont puiser cette richesse inflammatoire pour croître, migrer, et se différencier²⁰⁻²². Ainsi, l'équilibre dynamique entre système immunitaire et cellules cancéreuses préalablement installé se voit rompu. Lors de cette phase, le système immunitaire est dépassé et l'inflammation ne permet plus de contenir la progression tumorale (Figure 4). Ce processus permet à la tumeur de se développer pleinement, tout en freinant et en stoppant l'action inflammatoire, n'ayant plus aucun pouvoir dans son rôle d'immunosurveillance anti-tumorale^{20, 23}.

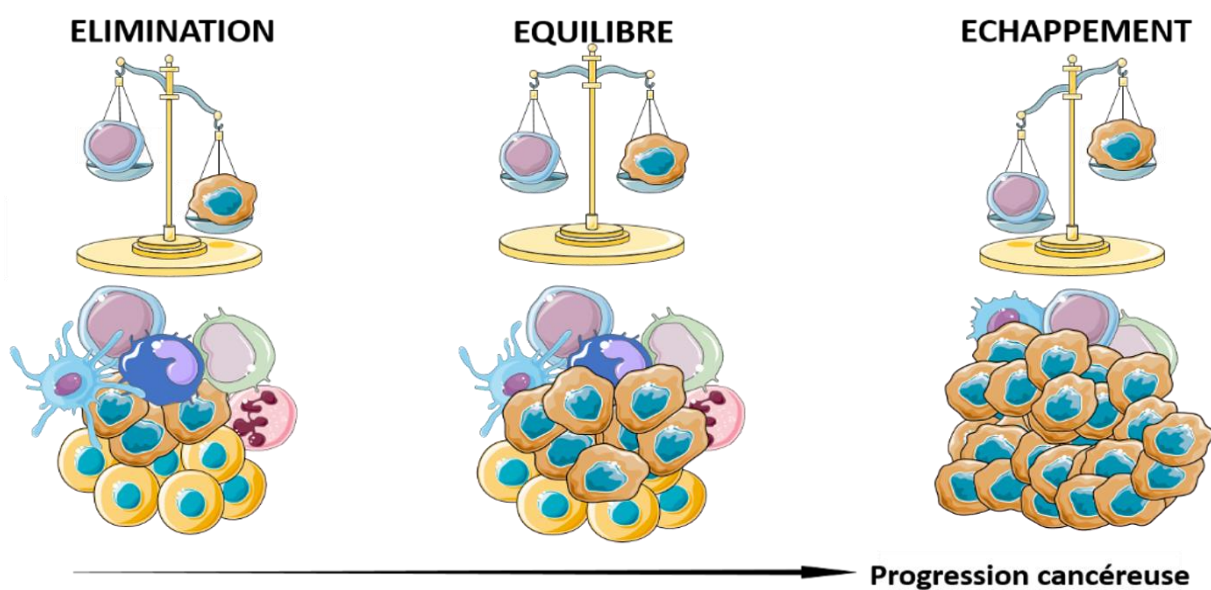


Figure 4. Les trois phases de l'édition des cancers : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. Les cellules du système éliminent les cellules cancéreuses par la mise en place de la veille immunitaire. Ainsi l'équilibre s'installe entre la réponse du système immunitaire et le développement des cellules cancéreuses, de manière transitoire. Au cours du temps les cellules cancéreuses acquièrent des caractéristiques permettant leur invisibilité face au système immunitaire. L'équilibre se voit donc rompu et les cellules cancéreuses prolifèrent au détriment de la surveillance immunitaire. Figure adaptée de : Dunn et *al.*, 2004¹⁷.

B. L'immunosurveillance source d'élimination

La présence de leucocytes au sein de la tumeur, observée au 19^{ème} siècle par le Professeur Virchow, montre pour la première fois un lien entre l'inflammation et le cancer^{22, 24}. C'est au milieu du 20^{ème} siècle que la notion d'immunosurveillance voit le jour, avec la mise en avant de la fonction sentinelle du système immunitaire et plus particulièrement des lymphocytes dans leur action de reconnaissance et d'élimination de cellules cancéreuses^{17, 18, 25}. Le microenvironnement tumoral est défini par la

présence de cellules immunitaires innées (macrophages, neutrophiles, MDSC [*Myeloid derived suppressor cell*], cellules dendritiques, NK) et adaptatives (cellules T et B) en plus des cellules cancéreuses et des cellules stromales (fibroblastes, cellules endothéliales et mésenchymateuses)²⁶. Cette diversité cellulaire entraîne une communication qui peut être directe (par contact) ou indirecte (par l'action de cytokines et de chimiokines). L'expression de ces divers médiateurs immuns dicte l'équilibre de la balance pro- et anti-tumorale²³.

Pour une réponse immunitaire anti-tumorale, la réponse adaptée doit être la mort de la cellule cancéreuse. Au sein de la tumeur, les cellules cancéreuses libèrent des antigènes tumoraux et des signaux de danger (cytokines pro-inflammatoires par exemple). Ces signaux de danger, à fort pouvoir immunogène, sont pris en charge par les APC (macrophages, cellules dendritiques). Ces dernières, grâce à leur fonction de phagocytose, éliminent les éléments cancéreux et présentent les antigènes tumoraux à leur surface, par leur CMH²⁷. Les cellules dendritiques activées migrent alors au sein des organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions) (Figure 5). Ce mécanisme est permis grâce aux cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β et des molécules immunogènes telles que l'ATP et HMGB1²⁷. Une fois au sein des organes lymphoïdes secondaires, les APC activent les cellules adaptatives : les lymphocytes T. Cette reconnaissance est permise grâce à l'expression à leur surface de récepteurs TCR et par l'expression de co-récepteurs CD28 et CD27, mais également par la libération de cytokines telles que l'IL-2 et l'IL-12^{27, 28}.

Les lymphocytes T activés par les APC dans les organes lymphoïdes migrent alors au sein du site tumoral, grâce aux molécules CXCL1 (*C-X3-C motif ligand*), CXCL9, CXCL10 et CCL5 (*C-C chemokine ligand*), afin d'accomplir leur fonction effectrice anti-tumorale (Figure 5). Les lymphocytes T infiltrent la tumeur grâce aux protéines ICAM-1 et aux selectines. Ainsi, au sein de la tumeur, les cellules cancéreuses sont reconnues par les lymphocytes T activés^{25, 27}. Ces cellules activées peuvent avoir un effet cytotoxique direct sur les cellules tumorales grâce à la sécrétion de granules cytotoxiques (perforine et granzymes) ou alors par l'expression des ligands des récepteurs de mort cellulaire (voie FasL et Trail)²⁷ (Figure 5). En plus de leur activité cytotoxique, ces cellules secrètent également des cytokines à activité anti-tumorale, comme l'IFN- γ . Cette cytokine joue un rôle contre la prolifération des cellules cancéreuses et pour l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses²⁷. Elle permet également d'augmenter la reconnaissance des cellules cancéreuses par le système immunitaire puisqu'elle permet d'augmenter l'expression des molécules de CMH I des cellules cancéreuses facilitant ainsi la reconnaissance par les T cytotoxiques. L'IFN- γ permet également une action sur les T pour permettre leur polarisation en Th1 eux-mêmes producteurs d'IFN- γ ^{20, 25, 27, 29, 30}.

Les cellules NK, et plus particulièrement les NKT (*Natural killer T cell*), sont également des cellules lymphoïdes participant à la fois à la réponse innée mais également à la réponse adaptative contre les cellules cancéreuses. En effet, tout comme les lymphocytes T, les cellules NK sont dotées de récepteurs de type TCR permettant d'être activées par les APC. Les NK sont également équipées de récepteurs inhibiteurs (NKG2A) et de récepteurs activateurs (NKp30, NKp44 et NKp46) de leur activité cytotoxique. Ce sont ces récepteurs qui permettent d'initier l'activité cytotoxique des cellules NK³¹. Les cellules NK sont capables d'induire, suite au stimulus des cellules cancéreuses, la sécrétion d'IFN- γ , de TNF- α et de perforines et de granzymes. Comme les CD8+, les cellules NK font partie des cellules cytotoxiques, et vont induire une réponse cytotoxique au niveau des cellules cancéreuses pour induire leur mort³².

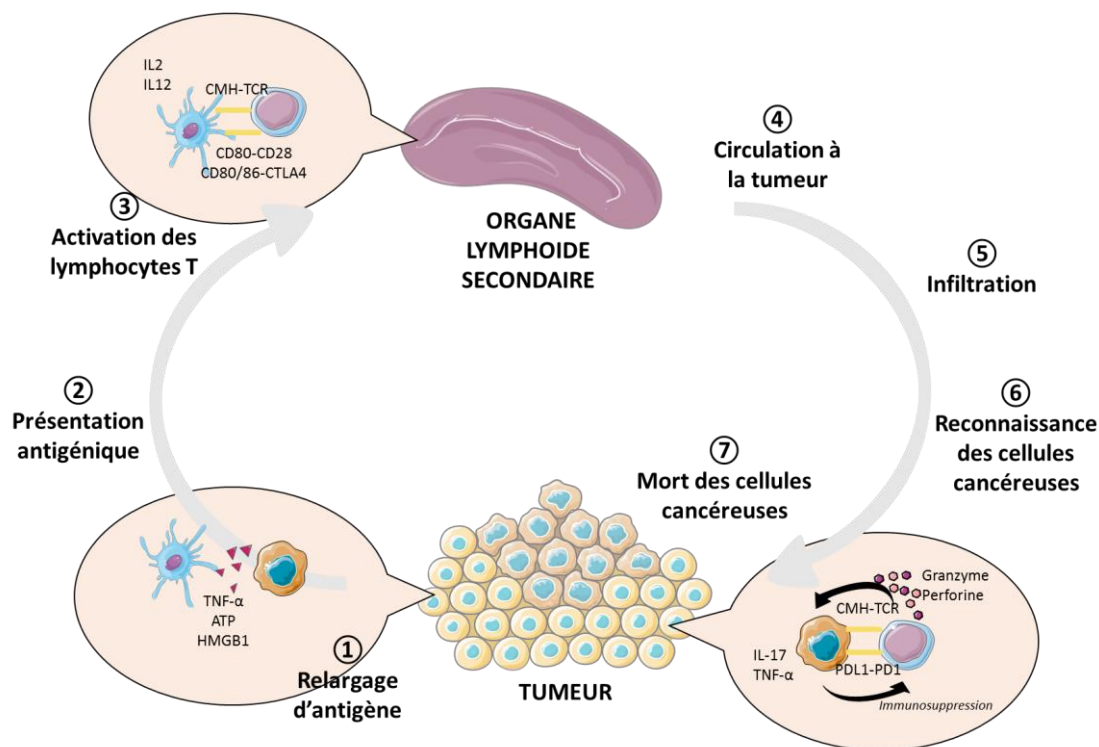


Figure 5. Rôle de l'inflammation dans le développement tumoral. Au sein du microenvironnement tumoral, les cellules cancéreuses sécrètent des antigènes tumoraux, captés et présentés par les cellules présentatrices de l'antigène. Ces cellules spécialisées migrent au sein des organes lymphoïdes pour présenter ces antigènes tumoraux aux cellules adaptatives, pour les activer. Une fois activés, les lymphocytes T migrent par la circulation au sein du site tumoral pour inhiber la croissance tumorale. Figure adaptée de : Chen *et al.*, 2013, Pluhar *et al.*, 2015 et Cogdill *et al.*, 2017^{27, 31, 33}.

C. Les cellules immunosuppressives

Même si le système immunitaire use de son rôle pour induire la mort des cellules cancéreuses, ces dernières vont pourtant mettre en place, au sein du microenvironnement tumoral, une stratégie immunosuppressive²⁷. Les cellules cancéreuses vont exprimer des médiateurs permettant de dévier l'immunosurveillance en faveur de leur développement²⁷. Ce processus, à l'origine d'une réduction de la surveillance immunitaire, est également rendu possible par la présence de cellules immunitaires immunosuppressives, principalement des Treg (*Regulatory T cell*), des Th17, des TAM (*Tumor associated macrophages*) et des MDSC (*Myeloid derived suppressor cell*)³⁴.

- Les macrophages

Dans le microenvironnement tumoral, les cellules immunitaires innées ont des phénotypes diversifiés. Les macrophages sont les cellules immunitaires les plus fréquentes parmi l'infiltrat leucocytaire des tumeurs³⁴. Les macrophages associés aux tumeurs, appelés TAM, se différencient à partir des monocytes du sang circulant, issus de la moelle osseuse²⁴. Ces monocytes sont attirés au sein du tissu cancéreux par des cytokines et des chimiokines, comme CCL2 (*C-C chemokine ligand 2*) et CCL5 (*C-C chemokine ligand 5*) et les cytokines pro-inflammatoires³⁴. Deux types de macrophages constituent le microenvironnement tumoral, des macrophages de « type » pro-inflammatoires (M1) et pro-résolutifs (M2)³⁵⁻³⁷. Pendant les premières phases du développement du cancer, ces cellules se comportent comme des cellules à fonction anti-tumorale (macrophage anti-tumoral type M1). Les macrophages présentent les néo-antigènes aux CD8+ pour détruire les cellules cancéreuses. Cette réponse des macrophages et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β) sont également à l'origine d'une activité tumoricide en plus des ROS générés^{38, 39}. Cependant cette inflammation peut générer des mutations somatiques et favoriser la progression tumorale³⁴. Ces mécanismes inflammatoires changent alors l'environnement tumoral favorisant la myélopoeïse à l'origine du recrutement de nouvelles cellules innées avec également des cellules immunosuppressives³⁴. Souvent cette augmentation d'infiltration est décrite comme associée à un mauvais pronostic dans le cancer⁴⁰. En effet, les TAM présentent également un phénotype pro-tumoral (macrophage pro-tumoral type M2) de par leur faible activité, associée à une faible capacité de présentation de l'antigène (Tableau 1). Ces macrophages secrètent peu de molécules pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF- α) mais des molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF- β (*Transforming Growth Factor*), décrites comme inhibant les réponses Th1 anti-tumorales^{24, 29, 41, 42} (Tableau 1). Les TAM au profil pro-tumoral sont donc généralement associés aux macrophages de type M2 connus pour leur capacité de

cicatrisation. Ainsi, les TAM au sein de la tumeur, permettent la prolifération, l'angiogenèse et la migration des cellules tumorales assurant leur survie^{24, 29, 36, 40, 41, 43} (Tableau 1).

- Les MDSC

Les MDSC sont des cellules décrites comme immunosuppressives. Elles sont issues, comme les macrophages de la myélopoeïse, en conséquence de la réponse inflammatoire. Ces cellules peuvent être à la fois d'origine monocyttaire (M-MDSC) ou granulocytaire (G-MDSC). Chez la souris, le phénotype des G-MDSC se rapproche des neutrophiles pro-tumoraux (CD11b+Ly6G+Ly6C-) alors que les M-MDSC se rapprochent des monocytes (CD11b+Ly6G-Ly6C+)^{34, 44}. Ces précurseurs issus de la moelle osseuse circulent dans le sang, et sont recrutés au niveau du site tumoral comme les macrophages, par l'environnement inflammatoire (CCL3, CCL4, CCL5). Les MDSC sont des cellules décrites comme immatures, car elles sont fonctionnellement différentes des autres cellules myéloïdes³⁴. Au sein du microenvironnement tumoral, les M-MDSC peuvent se différencier en TAM par l'inhibition de facteurs de transcription. Ce processus suggère que les MDSC sont des précurseurs des cellules myéloïdes immunosuppressives, comme les macrophages ou les neutrophiles pro-tumoraux. Les MDSC sont caractérisées comme immunosuppressives car elles ont la capacité d'inhiber la prolifération des cellules cytotoxiques (CD8+) et des cellules tueuses (NK+), la production de certaines cytokines comme l'IFN- γ et l'IL-12, et également d'induire une augmentation de la régulation des gènes impliqués dans l'apoptose et l'inflammation. L'étude des MDSC reste complexe puisque cette population cellulaire a été découverte récemment et leur phénotype, comme leur activité au sein d'un microenvironnement, se rapproche de très près des autres cellules myéloïdes classiques comme les macrophages, les neutrophiles et les monocytes³⁴. Même si leur rôle n'est pas encore clairement défini, leur implication dans la progression tumorale et la formation de métastases reste néanmoins importante⁴⁵. En effet, les MDSC maintiennent un environnement immunosuppressif *via* la sécrétion de TGF- β , IL-10, Arginase-1, et IDO (*Indoleamine 2,3-dioxygenase*)^{34, 44}. Ces molécules, et notamment le TGF- β , permettent l'expansion de Treg induisant alors une tolérance du système immunitaire permettant la progression tumorale. Par exemple, chez la souris, l'inhibition de l'inflammation par une inhibition du TNF- α permet de limiter l'activité immunosuppressive des MDSC corrélée à une diminution de la croissance tumorale⁴⁴. Ces cellules induisent une tolérance immunitaire vis-à-vis de la tumeur. En condition non cancéreuse, ces cellules sont à l'origine du développement des cellules immunitaires innées et notamment les cellules dendritiques ayant un rôle fondamental dans la surveillance tumorale.

- Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC), cellules de l'immunité innée, permettent d'induire une réponse immunitaire spécifique. Leur activation permet de stimuler l'apprêtement et la présentation des antigènes tumoraux, l'expression de molécules de co-stimulation (CD80, CD86, CD40) et la sécrétion de cytokines polarisantes (IL-12, IL-23) nécessaires pour l'activation des LT naïfs.

Bien que la présence de DC au sein du microenvironnement tumoral est en faveur de la surveillance immunitaire, ces cellules associées à la tumeur peuvent également avoir une faible capacité de différenciation et d'activation engendrant une faible activation des LT à l'origine d'une faible réponse immunitaire vis-à-vis de la tumeur⁴⁶. L'environnement immunosuppresseur et hypoxique au sein de la tumeur déstabilise la fonction des DC. Par exemple, il a été montré chez la souris que l'IL-10 diminue la production d'IL-12 des DC, pouvant ainsi modifier la capacité de réponse spécifique des LT. Lorsque l'IL-10 est bloqué, le taux d'IL-12 est restauré⁴⁶. Dans les tumeurs, la surexpression de l'enzyme COX-2 (*Cyclo-oxygenase*), catalysant la formation de PGE2 (*Prostaglandin E2*), favorise la production d'IL-10 par les cellules dendritiques et la diminution de l'IL-12⁴⁷. Ce processus engendre une différenciation des LT vers un profil tolérogène (Treg) eux-mêmes producteurs d'IL-10 et de TGF- β ²⁹ (Tableau 1). De plus, la fonction tolérogène des DC est également augmentée par l'expression de marqueurs de surface. En effet, les DC expriment à leur surface des molécules inhibitrices comme PD-L1 (*Programmed cell death ligand*) contribuant à la faible capacité fonctionnelle des DC. Les DC peuvent également se lier à la molécule inhibitrice CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte associated protein 4*) limitant leur activation par une faible présentation antigénique^{20, 27} (Tableau 1).

- Les lymphocytes T

Les lymphocytes T sont des cellules capables d'induire une réponse spécifique anti-tumorale, suite à l'activation par les DC. Trois types de lymphocytes T CD4+ sont à l'origine d'une immunosuppression. Le premier type est celui des lymphocytes T régulateurs (Treg). Ces cellules expriment le récepteur à l'IL-2 nommé CD25 ainsi que le facteur de transcription FoxP3 (*Forkhead box P3*). Ces cellules sont à l'origine d'une tolérance immunitaire afin d'éviter toute réaction auto-immune. Dans un contexte de cancer, les Treg se multiplient et se localisent au niveau du site tumoral où ils exercent leur fonction

suppressives. Ces Treg, induits par l'environnement inflammatoire tumoral à partir des CD4+, vont dans un premier temps limiter la disponibilité de l'IL-2 nécessaire à la prolifération des T effecteurs, mais également sécréter différentes cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β), limitant l'action anti-tumorale des lymphocytes T^{20, 27, 48} (Tableau 1). Ces cellules permettent également de limiter l'inflammation au sein de la tumeur et de limiter l'effet de Th17. Les Th17 sont des LT CD4+ qui expriment le facteur de transcription ROR γ T (*Orphan nuclear receptor*) et qui secrètent de l'IL-17. Les Th17 sont soutenues par la présence de TGF- β , d'IL-6 et d'IL-1 β . Leur rôle est encore mal connu dans le cancer, mais leur grande plasticité leur permettrait de se différencier en Treg. De plus, l'IL-17 est une cytokine qui permet l'augmentation de facteurs de croissance comme le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) à l'origine de néo-vascularisation conduisant à l'angiogenèse, et par la formation de vaisseaux lymphatiques permettant la colonisation des ganglions lymphatiques par les cellules cancéreuses⁴⁸. De manière plus générale les cellules T expriment de manière constitutive des récepteurs inhibiteurs permettant le blocage d'une réponse inflammatoire. Les protéines PD-1 (*Programmed cell death 1*) et CTLA-4 sont ainsi exprimées sur les lymphocytes T. Les cellules cancéreuses utilisent ce processus afin d'épuiser le système immunitaire, grâce à l'expression du ligand PD-L1. L'interaction entre PD-1 et PD-L1 limite la fonction effectrice des lymphocytes T bloquant ainsi l'activité du système immunitaire^{25, 27}.

Ainsi, au sein du microenvironnement tumoral et de l'organisme entier, les cellules cancéreuses acquièrent des stratégies permettant d'utiliser les réactions inflammatoires du système immunitaire en leur faveur pour générer un environnement immunosuppresseur. L'ensemble de ces mécanismes immunosuppresseurs agissent en synergie pour neutraliser la réponse immunitaire anti-tumorale, accélérant la progression tumorale.

Type cellulaire	Fonction anti-tumorale	Fonction pro-tumorale
Macrophages Cellules dendritiques MDSC	Présentation de l'antigène Production de cytokines (IL-12, IFN)	Immunosuppression Production de cytokines, chimiokines, protéases, facteurs de croissance, facteurs angiogénique
Mastocytes		Production de cytokines
Cellules B	Production d'anticorps	Production de cytokines Activation des mastocytes Immunosuppression
CD8+ (CTL)	Lyse des cellules cancéreuses Production de cytokines cytotoxiques	Production de cytokines
CD4+ (Th2)		Macrophages Production de cytokines Activation des cellules B
CD4+ (Th1)	Aide pour la réjection tumorale des LT cytotoxiques	Production de cytokines
CD4+ (Th17)	Activation des LT cytotoxiques	Production de cytokines
CD4+ (Treg)	Suppression de l'inflammation (cytokines suppressives)	Immunosuppression Production de cytokines
NK	Cytotoxicité directe sur les cellules cancéreuses Production de cytokines cytotoxiques	
Neutrophiles	Cytotoxicité directe Régulation de la réponse des LT cytotoxiques	Production de cytokines, protéases et ROS

Tableau 1. Rôle des différents types cellulaires lors d'une réponse inflammatoire, et leur fonction anti- et pro-tumorale.
Tableau adapté de : Grivnenikov et al., 2010²³.

3. La résolution de l'inflammation dans le cancer

Bien que l'inflammation au sein du microenvironnement tumoral soit un processus essentiel de la lutte anti-tumorale, l'inflammation peut également contribuer au développement des cancers. Ces dernières années, un réel lien entre inflammation et promotion tumorale a émergé d'hypothèses et d'expérimentations nouvelles²³. C'est au milieu du 20^{ième} siècle que le développement de cancers a été décrit comme une conséquence des agents viraux ou chimiques induisant des changements somatiques²². Le Professeur Virchow émettait dès 1863 l'hypothèse que les patients, atteints d'un fort infiltrat de leucocytes lors d'infections, avaient de forts risques de développer des cancers²⁴. Les mécanismes d'une inflammation pro-tumorale peuvent être la cause de l'initiation tumorale, comme des mutations, des dommages à l'ADN (Acide désoxyribonucléique), des instabilités génomiques, des

dérégulations épigénétiques et des déficiences dans la réparation de l'ADN. Ces différents mécanismes initient et/ou soutiennent le développement cancéreux^{20, 24}. Dans les tumeurs, la balance d'une inflammation anti-tumorale et d'une inflammation pro-tumorale est profondément modifiée²³. En effet, l'inflammation peut également favoriser la croissance tumorale et la formation de métastases.

A. La résolution de l'inflammation et l'homéostasie tissulaire

La réaction inflammatoire a ainsi un rôle bivalent ; permet la surveillance anti-tumorale ou promeut le développement de cancers²⁴. Afin d'éviter cette conséquence, un retour à l'homéostasie tissulaire est nécessaire : c'est la phase de la résolution de l'inflammation. Pour cela plusieurs conditions doivent être remplies : (1) la suppression de la cause de l'inflammation, (2) la neutralisation des médiateurs chimiques inflammatoires, (3) le retour à l'état physiologique du flux sanguin ainsi que de la perméabilité vasculaire, (4) l'arrêt de la migration leucocytaire, (5) l'apoptose des neutrophiles et leur phagocytose par les macrophages, (6) le drainage du système lymphatique, et enfin (7) la régénération des tissus. En effet, le processus d'inflammation aiguë est complet et efficace lorsque les tissus endommagés sont réparés. Si la résolution et/ou la réparation sont incomplètes, les risques sont nombreux et la déficience de ces tissus accrue².

▪ Les acteurs clés de la résolution de l'inflammation

Lors de la phase inflammatoire, les monocytes et les macrophages inflammatoires qui ont infiltré le site d'inflammation lié au site tumoral sont à l'origine de l'élimination de la source inflammatoire. Lorsque cette dernière est éliminée, le processus inflammatoire peut s'arrêter. La phase de résolution de l'inflammation va se mettre en place. La résolution de l'inflammation est définie comme un processus actif. Ce processus est guidé par un *switch* du profil lipidique, la libération de molécules décrites comme pro-résolutives et l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires².

L'étape essentielle à la mise en place de la résolution de l'inflammation est l'entrée en apoptose des neutrophiles et des monocytes recrutés au niveau du site inflammatoire, pour contrôler l'agression². Ce type de mort cellulaire programmée permet de ne pas induire plus d'inflammation qu'escompté puisque cette mort est dite « propre ». En effet, la cellule meurt par bourgeonnement et n'induit pas de signaux de danger, à l'inverse de la nécrose. Grâce à la rapide réponse des phagocytes et plus particulièrement des macrophages, ces cellules apoptotiques sont éliminées et ne génèrent pas

d'inflammation prolongée (**Figure 6**). L'arrêt du recrutement des neutrophiles et la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages, signalent l'arrêt de la phase inflammatoire et le début de la résolution de l'inflammation^{4, 49}. Les macrophages ont une fonction indispensable à la résolution de l'inflammation. Lors du processus d'efferocytose les macrophages acquièrent un phénotype dit pro-résolutif, à l'origine de la production de facteurs supprimant l'inflammation et permettant la restauration de l'intégrité tissulaire^{9, 50}.

- **Les acteurs moléculaires de la résolution de l'inflammation**

L'apoptose cellulaire et la clairance des cellules apoptotiques jouent un rôle crucial dans la résolution de l'inflammation^{4, 49, 50}. Le processus d'efferocytose permet la sécrétion de nombreux facteurs immuno-modulateurs et pro-résolutifs. Ces molécules immuno-modulatrices inhibent le recrutement des leucocytes et leur activation, comme les neutrophiles, et favorisent ainsi l'élimination des cellules apoptotiques.

Parmi ces molécules, les médiateurs lipidiques ont un rôle majeur dans l'initiation du processus de résolution de l'inflammation². En effet, l'élimination par les macrophages des cellules apoptotiques est à l'origine de la synthèse de médiateurs lipidiques pro-résolutifs spécialisés (SPM) comme la résolvine, les lipoxines et les marésines. Ces lipides qui en sont issus vont agir en synergie et de manière autocrine puisqu'ils permettent d'augmenter le processus d'efferocytose (**Figure 6**). Plus généralement, les SPM sont biosynthétisés à partir du catabolisme des acides gras poly-insaturés par l'action des lipoxygénases. Les acides gras peuvent altérer l'expression de gènes inflammatoires. Ils permettent donc de diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires et l'expression de molécules d'adhérence. Ainsi, les SPM restreignent l'infiltration de neutrophiles au site inflammé et induisent un phénotype de macrophages anti-inflammatoires (**Figure 6**). Ainsi, les SPM ont des propriétés anti-inflammatoires et pro-résolutives. L'action protectrice des SPM a été démontrée dans différentes pathologies liées à l'inflammation, notamment les sepsis (inflammation aiguë) et l'asthme (inflammation chronique). Dans le cancer, les SPM permettent la diminution de la croissance, de la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses^{20, 50, 51}.

De plus, à l'issue de l'efferocytose les macrophages reprogrammés en macrophages dits pro-résolutifs ne sont plus à l'origine de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires mais secrètent des molécules au profil anti-inflammatoire comme l'IL-10 et le TGF- β ^{2, 50} (**Figure 6**). Parmi ces facteurs, le TGF- β est une cytokine anti-inflammatoire majeure, régulant notamment la tolérance au soi à travers son rôle

dans la différenciation des LT CD4+ et notamment la génération des Treg connus pour leur fonction immunosuppressive et garants de la tolérance au soi. D'autres molécules comme l'Annexine 1 sont libérées lors de la résolution de l'inflammation. L'Annexine 1 est responsable de l'inhibition du recrutement de neutrophiles dans les tissus inflammatoires notamment par l'inhibition de l'interaction avec les cellules endothéliales⁵². L'inhibition de cytokines et chimiokines inflammatoires se fait également grâce aux molécules MMP (*Matrix metalloproteinase*) qui limitent l'infiltration de neutrophiles.

La résolution de l'inflammation fait partie intégrante du processus inflammatoire. Un défaut de cette phase de résolution de l'inflammation peut être à l'origine de maladies inflammatoires, mais également promouvoir la croissance tumorale.

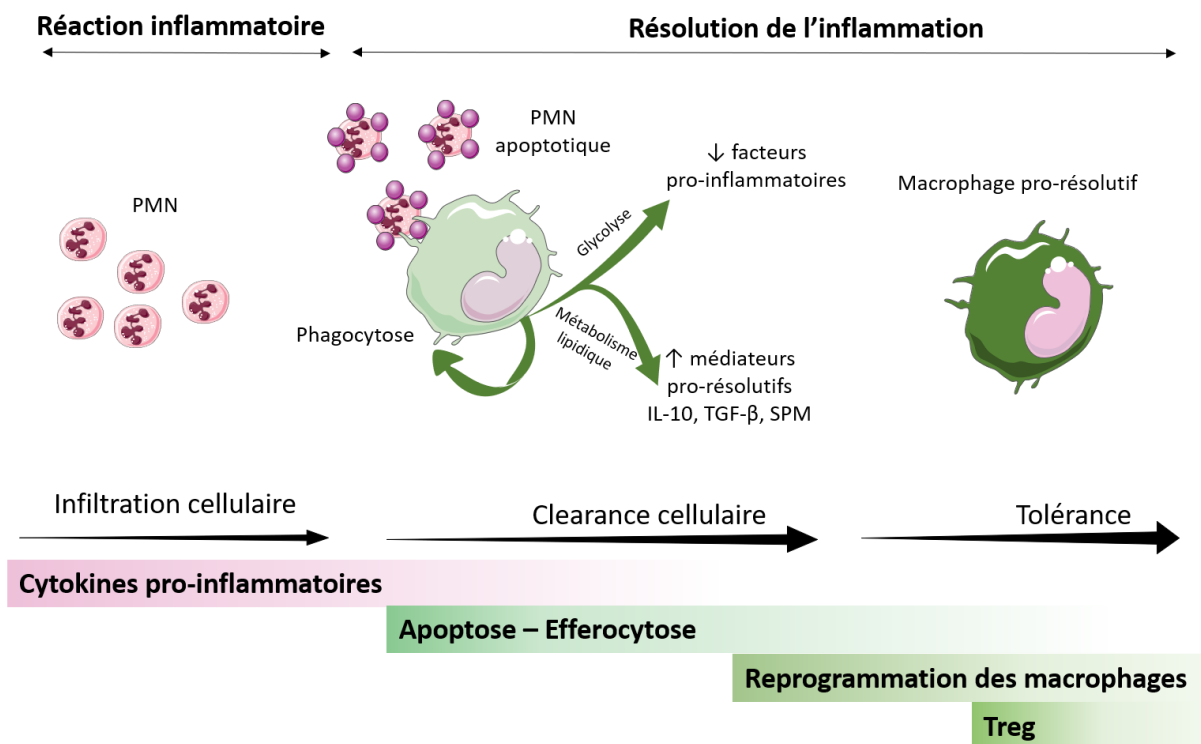


Figure 6. La mise en place de la résolution de l'inflammation. Suite à une agression, la réaction inflammatoire se met en place avec le recrutement des neutrophiles et des monocytes infiltrant le site agressé. Une fois l'agresseur éliminé par les neutrophiles, les monocytes phagocytent les neutrophiles entrants en apoptose. Cette phagocytose engendre la libération de molécules pro-résolutives. Figure adaptée de : Serhan et *al.*, 2005, Fullerton et *al.*, 2016 et Kourtzelis et *al.*, 2020^{2, 4, 50}.

B. L'inflammation chronique : responsable du développement tumoral

La résolution de l'inflammation est un processus physiologique permettant à l'organisme un retour à l'homéostasie à la suite d'une agression. Lorsque ces conditions ne sont pas remplies, la réaction

inflammatoire persiste. L'inflammation est alors dite chronique, perdurant dans le temps, conduisant à diverses pathologies, avec de graves conséquences et notamment le développement de cancers^{22, 32, 53} (Figure 1). Cette inflammation dite chronique peut être due à des facteurs environnementaux, des maladies inflammatoires mais également provenir d'une inflammation intrinsèque à la tumeur résultante des thérapies anti-cancéreuses.

- Inflammation chronique extrinsèque : facteurs environnementaux & maladies inflammatoires

L'initiation tumorale est un processus qui engendre un changement des cellules normales par des mutations, leur confère des fonctions tumorales, ayant pour conséquence une croissance et une survie supérieures aux autres cellules. Dans la plupart des cas, une seule mutation n'est pas suffisante pour induire un changement des cellules en cellules cancéreuses. En effet, pour ce changement phénotypique, il est nécessaire que la cellule subisse plusieurs mutations. Généralement, ce sont les cellules souches qui deviennent cancéreuses. En effet, les cellules différenciées ne survivent pas suffisamment longtemps pour subir autant des mutations et que celles-ci soient transmises aux cellules filles. Ces mutations peuvent également survenir pour des cellules épithéliales différenciées qui sont capables de proliférer et de vivre suffisamment longtemps pour être affectées par plusieurs mutations²³. En ce sens, il est assez rare que seules les mutations génétiques soient à l'origine du développement de cancers. Même si les facteurs génétiques peuvent être à l'origine de pathologies comme le cancer, peu de cancers en sont la conséquence directe. Ce sont principalement les mutations somatiques et les facteurs environnementaux qui entraînent la majorité des cas de cancers et peuvent, bien entendu soutenir les mutations génétiques (Figure 7).

La plupart des causes environnementales, associées à des cancers et aux facteurs de risque de développer un cancer, est liée à une inflammation chronique. Parmi les cancers liés à une inflammation chronique (Tableau 2), environ 1/3 est dû au tabagisme et aux polluants, 1/3 attribué aux régimes alimentaires et notamment lié à l'obésité²³. Les facteurs environnementaux peuvent donc être à l'origine d'inflammation chronique. Lors d'inflammation chronique les tissus ne sont pas régénérés. La non-régénération des tissus, associée à une nécrose tissulaire et une cicatrisation anormale, peut générer le développement de fibroses (cutanées, pulmonaires). Les fibroses sont associées à de lourdes conséquences sur les organes impactés, avec une diminution, suivie d'une perte totale de leur fonctionnalité. En plus des fibroses, l'inflammation chronique est à l'origine de maladies cardiovasculaires (athérosclérose, insuffisance cardiaque, hypertension artérielle), auto-immunes

(maladie de Crohn, diabète, colite, sclérose), métaboliques (insuffisance rénale, obésité), articulaires et osseuses (arthrites, ostéoporose), pulmonaires (asthme, bronchite, allergie) et neurologiques (sclérose, dépression)^{21, 24, 32, 54, 55}. Près d'environ 20 % des cas de cancers sont recensés à la suite d'une infection, d'une inflammation chronique, et/ou de maladies auto-immunes^{21, 23} (Tableau 2 et Figure 7).

Pathologie	Agent de causalité	Cancer associé
Bronchite	Tabac	Carcinome du poumon
Cystite	Pathogène gram-, irradiation, carcinogène	Carcinome de la vessie
Gastrite, ulcère	<i>Helicobacter pylori</i>	Cancer gastrique
Hépatite	Virus de l'hépatite B et de l'hépatite C	Cancer du foie
Inflammation de la peau, exposition soleil	Ultraviolet	Mélanome
Maladie inflammatoire de l'intestin, maladie de Crohn, colite chronique	Pathogènes, perméabilité	Carcinome colorectal
Mononucléose	Virus Epstein-Barr	Lymphome
Pancréatite chronique	Tabac, facteurs génétiques	Carcinome du pancréas
SIDA	VIH	Lymphome, sarcoma, carcinome

Tableau 2. Tableau non exhaustif de cas d'inflammation chronique et d'infection associées au développement de cancer. Figure adaptée de : Coussens et al., 2002 et Vakkila et al., 2004^{22, 32}.

L'inflammation peut également soutenir la progression tumorale. La promotion tumorale est un processus de croissance tumorale à partir d'une seule cellule cancéreuse, menant au développement d'une tumeur primaire. La croissance tumorale initiale va dépendre de la prolifération cellulaire ainsi que de la diminution de la mort cellulaire. La prolifération et la mort cellulaire sont deux processus induits par les mécanismes d'inflammation. L'inflammation peut induire la promotion tumorale au début du processus tumoral mais également plus tardivement. En effet, l'inflammation peut engendrer un *switch* pro-angiogénique, augmentant la vascularisation de la tumeur, lui permettant de recevoir l'irrigation nécessaire pour sa croissance et la formation de métastases²³ (Figure 7). Les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF- α et l'IFN- γ et les facteurs de croissance comme le VEGF, permettent quant à eux le développement des cancers dits « liquides » de types myéloïdes et lymphoïdes^{23, 32}.

Ainsi l'inflammation chronique induite par des facteurs environnementaux et/ou des pathologies inflammatoires va permettre d'initier le développement des cancers mais également de promouvoir leur développement. Ce type d'inflammation est extrinsèque au processus propre de la carcinogenèse mais peut l'induire. De plus, le processus de carcinogenèse peut lui-même générer de l'inflammation, dite intrinsèque.

- Inflammation chronique intrinsèque : associée à la tumeur

Le développement des cancers provoque une réponse inflammatoire. Le remodelage du microenvironnement tumoral suite à la réaction inflammatoire génère une nécrose tissulaire au sein de la tumeur à l'origine de la sécrétion de produits inflammatoires comme l'IL-1 β , le TNF- α , les ROS et HMGB1²³. Ces médiateurs, activent différentes voies de signalisation de chimiokines par la voie Pi3K/Akt aboutissant à la production de VEGF (*Vascular endothelial growth factor*)⁵⁴. Le VEGF favorise la néo-vascularisation. Les nouveaux vaisseaux sanguins formés permettent aux cellules cancéreuses de coloniser les tissus périphériques²³. L'angiogenèse est un processus crucial dans le développement des cancers et notamment dans le développement des tumeurs solides mais également « liquides »^{23, 32, 54, 56-58}. Ces mécanismes suggèrent que l'inflammation associée à la tumeur peut être décrite comme une « blessure qui ne cicatrise jamais »²³ (Figure 7). De plus, l'inflammation associée à la tumeur peut également être promue par les thérapies anti-cancéreuses comme la radiothérapie et la chimiothérapie (Figure 7). Ces thérapies sont à l'origine d'un fort taux de nécrose cellulaire qui entretient la réponse inflammatoire. Même si ces thérapies permettent la réponse antigénique nécessaire à la réponse anti-tumorale, celles-ci augmentent également une réponse inflammatoire pro-tumorale²³. Cette partie concernant l'inflammation associée aux thérapies sera développée plus tardivement (*cf.* Partie III. 1.).

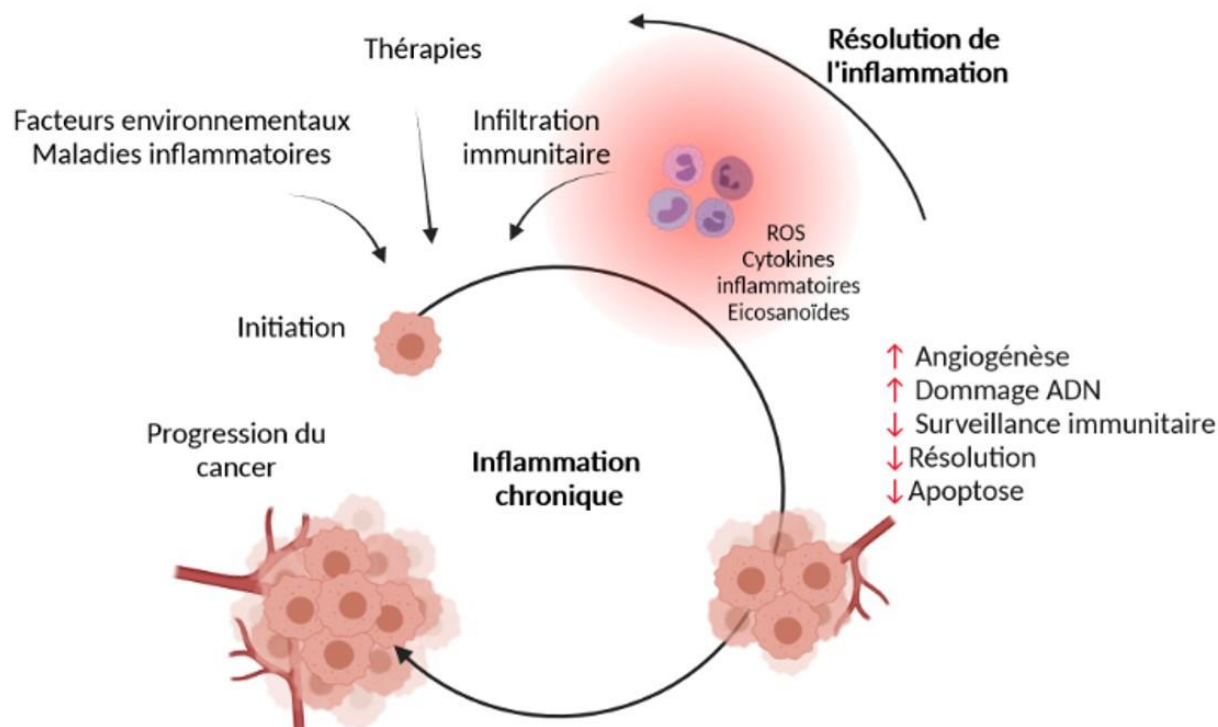


Figure 7. Les différents types d'inflammation pro-tumorale. L'inflammation chronique associée aux infections et maladies auto-immunes peut contribuer à l'induction du processus oncogénique par l'induction de mutations, mais également à la progression tumorale avec la promotion de l'angiogénèse. L'exposition prolongée aux facteurs environnementaux peut également favoriser les mutations à l'origine de l'initiation tumorale mais également promouvoir le développement des cancers avec le soutien de l'angiogénèse. L'inflammation associée à la tumeur peut également contribuer à l'angiogénèse et permettre au cancer de progresser par la formation de métastases, mais également induire une immunosuppression. Les thérapies anti-cancéreuses permettent quant à elles d'induire une forte inflammation locale mais peuvent favoriser les rechutes et les résistances aux traitements. Figure adaptée de : Grivennikov et *al.*, 2010, Fishbein et *al.*, 2021 et Porta et *al.*, 2009^{23, 24, 53}.

Conclusion Partie I.

L'inflammation joue un rôle prépondérant dans le contrôle des cancers, notamment dans leur édition. Le processus de surveillance anti-tumorale permet de limiter la croissance tumorale, par le recrutement de cellules de l'immunité innée et adaptative. Cette sollicitation du système immunitaire reste continue jusqu'à l'élimination de la source d'agression. Dans le cas des cancers, ce processus prend une toute autre tournure car les cellules cancéreuses usent de stratégies pour contourner la surveillance immunitaire. Le cancer peut donc être assimilé à une blessure qui ne se cicatrise jamais. En effet, l'inflammation nécessite d'être stoppée afin d'éviter des dommages tissulaires. Dans le cancer, l'inflammation n'est pas stoppée mais effacée face aux cellules cancéreuses. Ces dernières vont puiser dans les ressources mobilisées par l'inflammation pour contourner le système immunitaire et l'utiliser en leur faveur pour croître, se différencier et migrer. En conséquence, l'inflammation peut constituer une cible thérapeutique à part entière. En effet, jusqu'à récemment, les cellules

cancéreuses étaient les seules cibles des thérapies anti-cancéreuses. Toutefois, les effets sur la composition cellulaire et moléculaire du microenvironnement tumoral doivent également être pris en compte dans l'évaluation de l'efficacité de ces traitements.

Partie II.

La stratégie de cibler l'inflammation dans le traitement du cancer

L'inflammation extrinsèque à la tumeur est causée par de nombreux facteurs environnementaux mais également par des pathogènes, ou même des pathologies auto-immunes. Cette inflammation soutient l'initiation tumorale mais également sa progression. L'inflammation intrinsèque, associée à la tumeur, peut quant à elle contribuer à la progression tumorale par le recrutement de cellules inflammatoires⁵⁹. Ainsi, l'inflammation est reconnue comme un facteur participant au développement de cancers. Dans les cancers établis, l'évidence est que la réponse inflammatoire locale et l'inflammation systémique augmentent la progression tumorale et impactent la survie des patients⁶⁰. Les cellules de l'immunité innée qui infiltrent un tissu tumoral promeuvent la prolifération des cellules cancéreuses et leur dissémination. Les TAM sont abondamment présents dans les tissus cancéreux et sont à l'origine d'une inflammation chronique soutenant le développement de la pathologie tout en contribuant à la mise en place d'un environnement immunosuppresseur⁶¹. Ces connaissances ont permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dont la modulation vise à rendre cette réponse inflammatoire bénéfique pour le pronostic des patients atteints de cancers. En effet, les stratégies pour limiter l'inflammation montrent de réels intérêts thérapeutiques dans la lutte anti-cancéreuse⁶⁰.

1. Cibler le circuit inflammatoire

La connaissance des mécanismes complexes du circuit inflammatoire au sein du processus tumoral donne de nouvelles pistes sur les approches anti-inflammatoires potentielles dans le traitement des cancers. En effet, cibler non sélectivement l'inflammation ainsi que cibler directement les éléments sources de l'inflammation peuvent se montrer des voies intéressantes dans la lutte contre le cancer.

A. Cibles non sélectives : l'exemple des anti-inflammatoires

L'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (incluant les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase) ont un fort potentiel thérapeutique dans le cancer⁶⁰. Les anti-inflammatoires sont des molécules luttant contre les phénomènes inflammatoires locaux ou généralisés. Il existe 2 types de molécules anti-inflammatoires : les stéroïdiens (ou corticoïdes) et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)^{20, 62}. Les anti-inflammatoires sont des médicaments qui n'agissent pas directement sur la cause de

l'inflammation mais sur les symptômes. Généralement, ils sont indiqués lorsque l'inflammation n'est pas supportable en raison de la douleur qu'elle engendre⁶².

Les anti-inflammatoires stéroïdiens possèdent un mécanisme d'action similaire au cortisol. Le cortisol est une hormone stéroïde, sécrétée naturellement par les glandes surrénales, à partir du cholestérol. Cette hormone limite l'action inflammatoire et permet de maintenir l'homéostasie. Elle diminue l'action des facteurs pro-inflammatoires (prostaglandines et leucotriènes) grâce à l'inhibition de la voie NF- κ B et de la voie MAPK^{24, 60, 62, 63}. Les prostaglandines, également appelées prostanoides, font partie d'une grande famille de molécules régulatrices du groupe des acides gras polyinsaturés dérivés de l'acide arachidonique (AA). L'AA libre est métabolisé par deux voies enzymatiques : COX (cyclo-oxygénase) et LOX (lypoxigénase) (Figure 8). La COX-1 est exprimée de manière constitutive dans la plupart des tissus. Cette enzyme est responsable de la production basale de prostaglandines. A l'opposé, la COX-2 est inductible et régulée par les cytokines, chimiokines inflammatoires et par les facteurs de croissance. La COX-2 est principalement retrouvée chez les cellules endothéliales^{22, 54, 62, 63}. Dans des conditions physiologiques, l'expression de la COX-2 est limitée, alors qu'en condition physiopathologique, au cours de l'inflammation, l'expression de la COX-2 augmente considérablement. Dans ce contexte, les anti-inflammatoires diminuent la biosynthèse de cyclo-oxygénase au niveau des tissus^{22, 62, 63}. Les anti-inflammatoires permettent l'acétylation du domaine catalytique de l'enzyme, inhibant l'action de la cyclooxygénase³. D'autres actions des anti-inflammatoires peuvent accompagner l'arrêt de la biosynthèse des lipides inflammatoires. Les anti-inflammatoires peuvent également permettre d'induire l'apoptose par la libération du cytochrome c de la mitochondrie, à l'origine de l'activation de la caspase 9 et 3, interférant alors avec le cycle cellulaire^{22, 54, 63}. Ainsi ces différents mécanismes d'actions permettraient de limiter la croissance et l'évasion tumorale^{20, 24}.

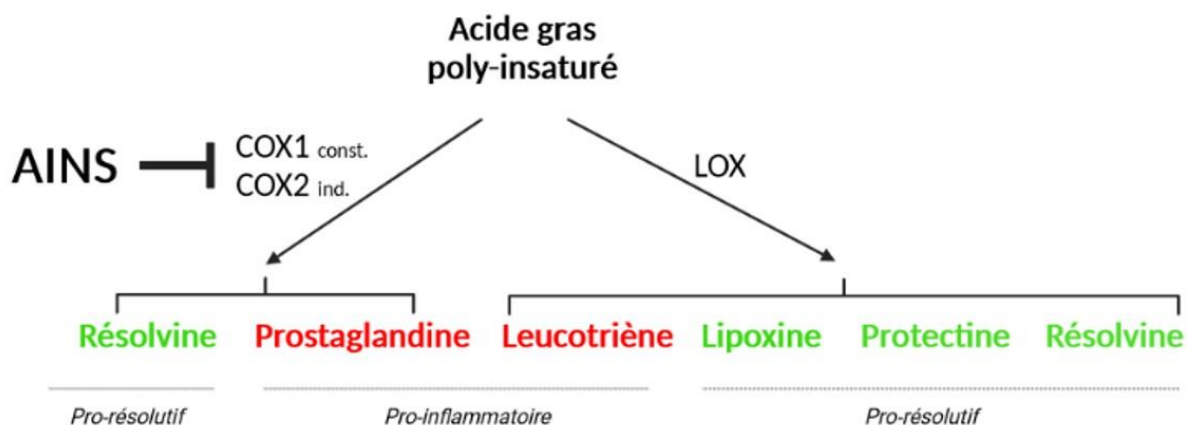


Figure 8. Schéma du ciblage des COX lors de l'utilisation d'anti-inflammatoires. Les lipides pro-inflammatoires et pro-résolutifs sont bio-synthétisés à partir d'acides gras insaturés, par les enzymes COX et LOX. Les anti-inflammatoires ciblent l'enzyme COX limitant à la fois la biosynthèse de lipides pro-inflammatoires mais également pro-résolutifs. Figure adaptée de : Greene et al., 2011⁶⁴.

- Les anti-inflammatoires et leurs applications dans le cancer

Du fait de l'implication de l'inflammation dans le processus tumoral (*cf.* Partie I. 3.), celle-ci est devenue au cours des années une cible potentielle dans la thérapie anti-cancéreuse⁶⁰⁻⁶². Depuis longtemps, les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont utilisés dans la prévention des risques cardiovasculaires. Ce sont ces études épidémiologiques qui ont permis d'établir un lien entre l'utilisation d'anti-inflammatoires et l'incidence des cancers et notamment la mortalité associée^{60, 61}. De plus, les anti-inflammatoires ont un rôle inévitable dans la prise en charge de la douleur chez les personnes atteintes de cancers, et notamment dans le support de l'administration de chimiothérapies. C'est à partir de ces données épidémiologiques et expérimentales que l'utilisation d'anti-inflammatoires dans les pathologies cancéreuses montre des effets bénéfiques contre le développement de tumeurs^{61, 62}. Les anti-inflammatoires inhibent l'activité de la cyclo-oxygénase et de ce fait réduisent la synthèse de prostaglandines. Cette utilisation dans le cancer serait à l'origine d'une diminution de prolifération et d'invasion des cellules cancéreuses, d'une induction d'apoptose et d'une inhibition de l'angiogenèse^{59, 61, 62, 65}.

- Utilisation en prophylaxie et chimio-prévention

La chimio-prévention consiste en l'utilisation d'une molécule pharmacologique, ou naturelle, pour réduire le risque de développement de cancers. Le potentiel de cette approche est de pouvoir réduire

la mortalité associée au cancer^{24, 61, 62}. Depuis la fin du 20^{ème} siècle, l'utilisation à long terme de l'aspirine ainsi que d'autres anti-inflammatoires, permet de limiter l'incidence des cancers gastro-intestinaux (colorectaux, gastriques et de l'œsophage) mais également du sein, du poumon, de la vessie et des mélanomes^{20, 22, 59-61, 63}. En effet, des études montrent que les anti-inflammatoires permettraient de réduire le risque de développement de cancers du côlon de près de 40 à 50 %^{22, 60-63}. D'autres molécules anti-inflammatoires peuvent également être source de chimio-prévention, comme l'ibuprofène ou l'acétaminophène. Cependant ces molécules sont moins utilisées et sur de moins longues périodes, ne permettant pas d'obtenir des données suffisantes pour permettre des observations similaires à l'utilisation d'anti-inflammatoires comme l'aspirine⁶¹. Les statines semblent également réduire le risque de cancers colorectaux associés à des maladies inflammatoires du côlon, avec une diminution de près de 90 % des risques⁶⁰.

- Utilisation d'anti-inflammatoires en association de thérapies conventionnelles

Bien que les anti-inflammatoires réduisent les risques de développement de cancers, leur utilisation en monothérapie n'est pas suffisante pour éradiquer les lésions cancéreuses. En revanche, les anti-inflammatoires semblent être de bons adjuvants pour les thérapies classiques comme la chimiothérapie (en améliorant le pronostic des patients), et la radiothérapie (en réduisant le risque de radiorésistance et en améliorant la sensibilité)^{20, 60, 62}. Par exemple, la dexaméthasone améliore la sensibilité d'un inhibiteur de lymphome (Venetoclax) et permet également le traitement de cancer de la prostate réfractaire. Dans le cancer du côlon, la dexaméthasone supprime l'effet néfaste du TGF- β (induisant les voies Akt et Erk), inhibant les transitions épithélio-mésenchymateuses à l'origine de la formation de métastases^{20, 66}. De plus, les statines sont également utilisées en adjuvants de thérapies et permettent un effet sur la prolifération cellulaire, l'inflammation, l'angiogenèse^{60, 67}. Ainsi les anti-inflammatoires semblent agir en synergie des thérapies conventionnelles en permettant de réduire leur cytotoxicité mais également d'améliorer leur sensibilité et d'éviter leurs effets indésirables⁶².

- Les effets indésirables associés à l'utilisation d'anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont utilisés actuellement dans le cas d'infections symptomatiques et dans le cancer. Cependant leur utilisation peut se voir restreinte face au rapport bénéfice/risque. Au-delà des effets bénéfiques de l'utilisation des anti-inflammatoires dans le cancer, l'inhibition prolongée de la cyclo-oxygénase peut induire de graves complications, avec une augmentation de la morbidité voire

une mortalité chez les patients. L'utilisation d'anti-inflammatoires génère une agrégation des plaquettes à l'origine d'hémorragies. De plus l'inhibition de COX dans les voies digestives peut conduire à des troubles digestifs (ulcères ou saignements gastro-intestinaux). Leur utilisation, en chimio-prévention chez des personnes présentant des polypes, augmente également les risques cardiovasculaires (infarctus du myocarde et accidents vasculaires cérébraux), lorsqu'ils sont prescrits sur le long terme. Les anti-inflammatoires peuvent également conduire à des œdèmes et de l'hypertension artérielle, mais également des rhinites, éruptions cutanées^{20, 24, 62, 63}.

Plus récemment, l'utilisation de l'aspirine a récemment démontré son effet anti-cancéreux par la production endogène de médiateurs anti-inflammatoires et pro-résolutifs, tels que la résolvine, à l'origine de l'inhibition de croissance tumorale. Ces observations suggèrent l'effet bénéfique de cibler l'inflammation dans le cancer, et l'utilisation de médiateurs anti-inflammatoires et pro-résolutifs⁶⁸ (cf. Partie II. 3.).

B. Cibles sélectives : l'exemple des anti-IL-6 et anti-TNF- α

Les anti-inflammatoires ont la propriété de limiter l'inflammation de manière non sélective et préviennent des risques de cancers ainsi que leur progression. Cependant leurs effets indésirables restreignent leur utilisation. L'utilisation d'approches anti-inflammatoires plus ciblées permet également de limiter les cancers. Dans le but de cibler les médiateurs inflammatoires présents au sein de la tumeur, mais également en systémique, certaines approches ont pour but de cibler directement ces molécules. En effet, l'environnement inflammatoire devient une cible thérapeutique intéressante puisque les cellules inflammatoires et leurs médiateurs sont plus stables génétiquement que les cellules cancéreuses, limitant d'autant plus la possibilité d'une acquisition de résistance⁶⁰. Cette stratégie cible directement les cytokines et les chimiokines pro-inflammatoires, dans le but d'induire une immunomodulation⁶⁰.

▪ Les anti-IL-6

L'IL-6 est une protéine produite par les cellules infiltrant la tumeur mais également les cellules du microenvironnement tumoral comme les cancéreuses elles-mêmes et les cellules stromales⁶⁹. Cette protéine se fixe au niveau de son récepteur pour induire les voies de signalisation JAK/STAT (*Janus Kinase/Signal transducer and activator of transcription*) à l'origine de l'augmentation de la réponse

inflammatoire, par le recrutement des leucocytes et l'activation des cellules inflammatoires du microenvironnement tumoral⁶⁹.

Un taux d'IL-6 élevé est retrouvé chez les patients atteints de cancers (sein, colon, poumon, œsophage, pancréas et myélome) et est corrélé à la réponse aux chimiothérapies et au taux de survie^{69, 70}. L'inflammation engendrée par la signalisation de l'IL-6 serait à l'origine d'un fort taux d'immunosuppression mais également de la capacité métastatique du cancer^{69, 71-75}.

Les thérapies ciblant les cytokines sont couramment utilisées contre les maladies inflammatoires et moins pour les thérapies anti-cancéreuses⁶⁰. Cependant, les anticorps ciblant l'IL-6 sont de plus en plus étudiés et font l'objet de nombreux essais cliniques^{69, 73, 74, 76}. Les anticorps ciblés contre l'IL-6 (Siltuximab) sont utilisés dans certains carcinomes et montrent de réels intérêts dans l'inhibition de la production cytokinique, l'angiogenèse tumorale et l'infiltration de cellules immunitaires innées comme les macrophages. Le tocilizumab, un anticorps ciblant le récepteur à l'IL-6 démontre un intérêt dans le traitement du cancer puisqu'il permet d'améliorer l'état général du patient pour permettre l'administration de chimiothérapies^{60, 77, 78}.

- Les anti-TNF- α

Identifié au 20^{ème} siècle, le TNF- α a été décrit comme un facteur capable d'induire une mort cellulaire par nécrose. La nécrose est une mort cellulaire caractérisée par l'augmentation du volume de la cellule et d'une perte de l'intégrité membranaire. Ce phénomène induit alors l'exposition au niveau extracellulaire du contenu cytoplasmique, permettant localement de générer une réponse inflammatoire. Le système immunitaire est ainsi recruté. C'est plus tardivement que cette cytokine a été associée à la capacité d'induction de l'apoptose chez les cellules tumorales^{59, 79}. Le TNF- α est une cytokine de la phase aigüe de l'inflammation. Elle est sécrétée par les macrophages lors de la phase inflammatoire et persiste lors d'une inflammation chronique. Le TNF- α se fixe à deux récepteurs membranaires, le TNFR1 (*Tumor necrosis factor receptor*) exprimé de manière ubiquitaire, et le TNFR2 exprimé principalement par les cellules immunitaires. Ces récepteurs ont la capacité d'activer les cascades de signalisation de la voie NF- κ B et MAPK à l'origine de la mort cellulaire (apoptose et nécrose) et d'IL-8, VEGF et HGF (Figure 9). La liaison au récepteur du TNF permet également l'activation des voies de prolifération, de survie et de différenciation cellulaire^{1, 54, 59, 79-81} (Figure 9).

Des études ont associé forte concentration en TNF- α et traitement contre le cancer. Ces études ont été réalisées pour les mélanomes et certains sarcomes. La stratégie était d'induire une forte toxicité

vis-à-vis des cellules cancéreuses tout en maintenant une forte infiltration lymphocytaire au sein de la tumeur⁷⁹ (Figure 9). Cependant la forte production de TNF- α au sein de la tumeur, à l'origine de l'infiltration lymphocytaire, génère un microenvironnement fortement inflammatoire, pouvant promouvoir le développement du cancer⁷⁹. La première observation, mettant en lien le TNF- α et la promotion tumorale a été décrite par l'équipe du Pr. Balkwill⁷⁹. La déficience du récepteur au TNF, dans des modèles expérimentaux, est associée à une diminution marquée de développement de cancers. Ces observations suggèrent également un effet pro-tumoral du TNF- α ⁷⁹. Ainsi, le TNF- α est également associé à un facteur de risque élevé dans le développement de cancer. En effet, il a été observé que cette cytokine est présente en forte concentration chez de nombreux patients atteints de cancer. Elle est associée à une augmentation de la croissance et de la progression tumorale, inhibe la réponse immunitaire anti-tumorale et favorise l'invasion des cellules cancéreuses pour la formation de métastases^{1, 22, 34, 79-81}.

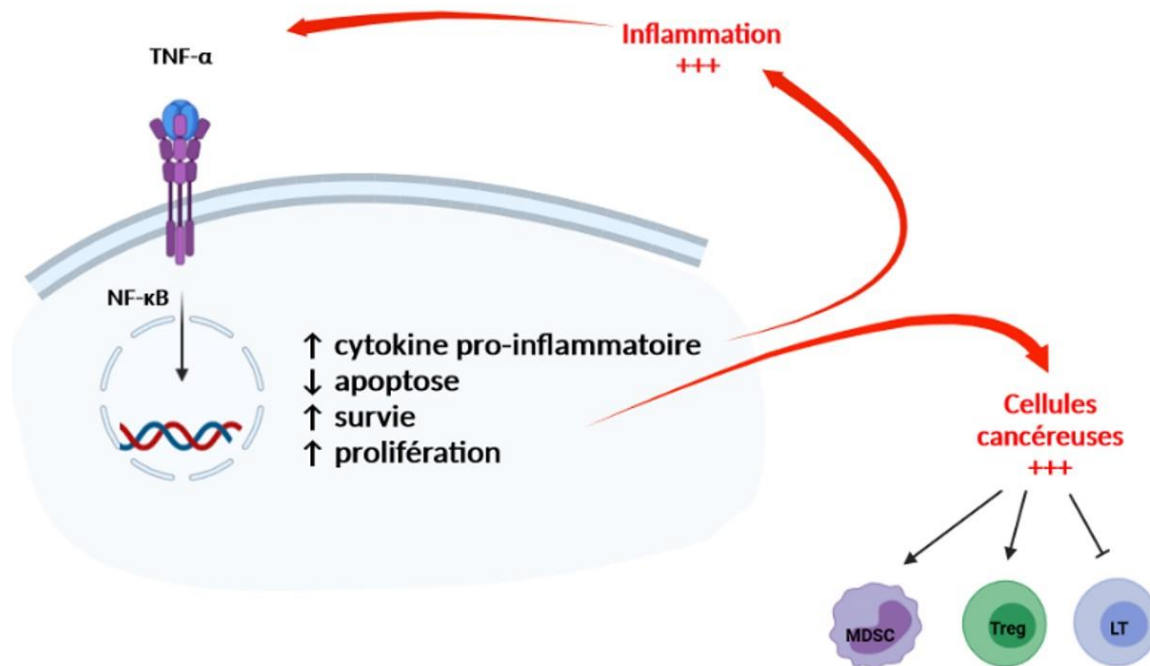


Figure 9. Le TNF- α dans le cancer et dans l'inflammation. Le TNF- α , cytokine de phase aiguë de l'inflammation, sécrétée majoritairement par les macrophages pro-inflammatoires, se fixe sur son récepteur pour induire la voie NF- κ B, et l'expression de gènes impliqués dans l'expression de cytokines pro-inflammatoires, fonction anti-apoptotique, et dans la survie et la prolifération cellulaire. Ainsi le TNF- α permet d'augmenter la réponse inflammatoire mais également de promouvoir le développement des cellules cancéreuses. Figure adaptée de : Atrekhany et *al.*, 2016 et Wang et *al.*, 2008^{44, 80}.

Différentes stratégies anti-cancéreuses s'articulent autour de l'action du TNF- α notamment avec le développement d'anticorps ciblant le TNF- α . Les anti-TNF- α servent principalement dans le traitement

de lymphomes, de carcinomes et de mélanomes. Les mélanomes représentent 1 % des cancers de la peau, mais sont responsables d'une partie importante de la mortalité⁷⁹. Parmi ces stratégies, l'Infliximab, une première génération d'anticorps anti-TNF- α , est utilisé dans certains cas de complications liés au cancer (inflammation telle que les colites)⁶⁰. Son utilisation peut également être associée à l'emploi d'immunothérapies (anti-PD-1 et anti-CTLA-4)^{79, 82}. Récemment, l'équipe du Pr. Segui a observé que l'utilisation d'anti-TNF couplé à l'anti-PD-1, dans le mélanome, engendrait une régression tumorale de 75 % contre seulement 20 % lorsque l'anti-PD-1 est utilisé en monothérapie^{79, 82}. Il a été observé que l'utilisation d'anti-TNF était associée à l'augmentation de CD8+ intra-tumoraux et à une diminution de l'expression de protéines inhibitrices (TIM-3 et PD-L1). Ces résultats démontrent que l'utilisation de régulateurs inflammatoires permet de rétablir une activité anti-tumorale⁷⁹.

Malgré les bénéfices des anti-TNF- α , leur utilisation est à l'origine d'effets indésirables, limitant leur exploitation (toxicité systémique, complications cardiaques et infections sévères)⁶⁰. Ainsi, les études visant à cibler le cycle inflammatoire démontrent un réel intérêt bénéfique dans la prévention contre le développement des cancers, mais également dans la diminution de leur progression et en soutenant l'action anti-cancéreuse des radio-chimiothérapies. Cependant, cibler l'inflammation directement ou indirectement démontre de fort taux d'effets indésirables liés ou non à la pathologie. Il existe d'autres manières de cibler l'inflammation en utilisant les mécanismes anti-tumoraux mis en place par le système immunitaire et plus particulièrement le recrutement des cellules immunitaires innées.

2. Cibler les cellules immunitaires innées

Les cellules immunitaires innées comme les neutrophiles, les macrophages et les MDSC, jouent un rôle prépondérant dans le développement des cancers, notamment dans le processus métastatique (*cf.* Partie I. 2.). Le fait de cibler ces populations cellulaires permet de réduire leur impact sur le processus tumoral.

A. Les neutrophiles et les MDSC

Les neutrophiles sont les cellules recrutées lors de la phase aigüe de l'inflammation. Dans le cancer, le fait de cibler l'infiltration des neutrophiles par le blocage de la voie CXCR2/CXCL1 permet d'augmenter l'efficacité d'immunothérapie et permet une infiltration lymphocytaire beaucoup plus importante. De

plus, les NETs sont à l'origine de la circulation des cellules tumorales et de leur dissémination pour la formation de métastases chez des modèles animaux. En diminuant l'infiltration de neutrophiles, le risque métastatique serait limité³⁴. De plus, du fait de la forte homologie phénotypique entre les G-MDSC et les neutrophiles, le blocage du recrutement des neutrophiles permettrait également de réduire l'infiltration des MDSC. Ces cellules peuvent également être reprogrammées d'un phénotype pro-tumoral à un phénotype anti-tumoral. Par exemple, bloquer le TGF- β permet d'augmenter les cytokines pro-inflammatoires et favorise le *switch* entre un neutrophile pro-tumoral et un neutrophile anti-tumoral³⁴. Tout comme les neutrophiles, les macrophages possèdent également un phénotype pro- et anti-tumoral permettant leur étude comme cible thérapeutique dans le cancer.

B. Les macrophages

Les macrophages sont les cellules immunitaires les plus présentes dans les tumeurs et sont associés à une progression tumorale et à une résistance aux thérapies anti-cancéreuses. Plusieurs études démontrent que le fait de cibler ces cellules en stratégie anti-cancéreuse permettrait de limiter l'effet pro-tumoral de ces cellules innées, en évitant les processus d'immunosuppression. Il existe actuellement trois grandes voies pour cibler ces cellules : inhiber leur recrutement, les repolariser en macrophages anti-tumoraux (activité tumoricide) ou même induire leur mort.

Les macrophages comme les neutrophiles sont recrutés par la voie CXCR2/CXCL1^{34, 61, 83} (Figure 10). Le blocage de leur recrutement en inhibant cette voie permet d'augmenter les effets bénéfiques des chimiothérapies. L'augmentation du bénéfice des chimiothérapies a également été démontrée en bloquant la voie CSFR1^{34, 61, 83-86}. Ces mécanismes permettraient d'augmenter le ratio CD8+/CD4+. La seconde stratégie, ne bloquant plus le recrutement des macrophages mais induisant leur mort, montre également un intérêt thérapeutique^{34, 83}. D'autres études visent à reprogrammer les macrophages vers des phénotypes anti-tumoraux (activité tumoricide se rapprochant du phénotype M1). L'IFN permet ces mécanismes mais également de faire exprimer aux macrophages des molécules de co-stimulation. Cette activité a montré un intérêt dans les cancers ovariens et la diminution de l'ascite malin dans des modèles expérimentaux. D'autres stratégies permettent également de réenclencher le processus de phagocytose des macrophages. En effet, les macrophages peuvent être pourvus d'une molécule de surface, nommée SIRP α , responsable de l'inhibition de la phagocytose lorsque celle-ci est liée au CD47 (Figure 10). Le CD47 agit comme un signal « *don't eat me* ». Des anticorps antagonistes de la molécule CD47 montrent une augmentation de la phagocytose des cellules cancéreuses dans des modèles expérimentaux de cancers^{61, 83, 87}. Enfin la dernière stratégie est plus radicale, avec l'induction de la mort de ces macrophages^{34, 83}. En effet, l'utilisation de liposomes chargés en clodronate permet

l'élimination des macrophages. Dans des modèles expérimentaux, l'inhibition des macrophages permet d'augmenter la survie^{34, 83} (Figure 10).

Cependant, bloquer totalement les macrophages s'avère démontrer également des effets négatifs dans la réponse anti-tumorale. En effet, les macrophages sont responsables d'une induction de la réponse inflammatoire mais également de sa résolution (inhibant le recrutement des neutrophiles, induisant leur apoptose et favorisant la tolérance). Ainsi, ces mécanismes pourraient également être à l'origine de résistances aux thérapies conventionnelles avec également une augmentation de la formation de métastases^{34, 40, 61}.

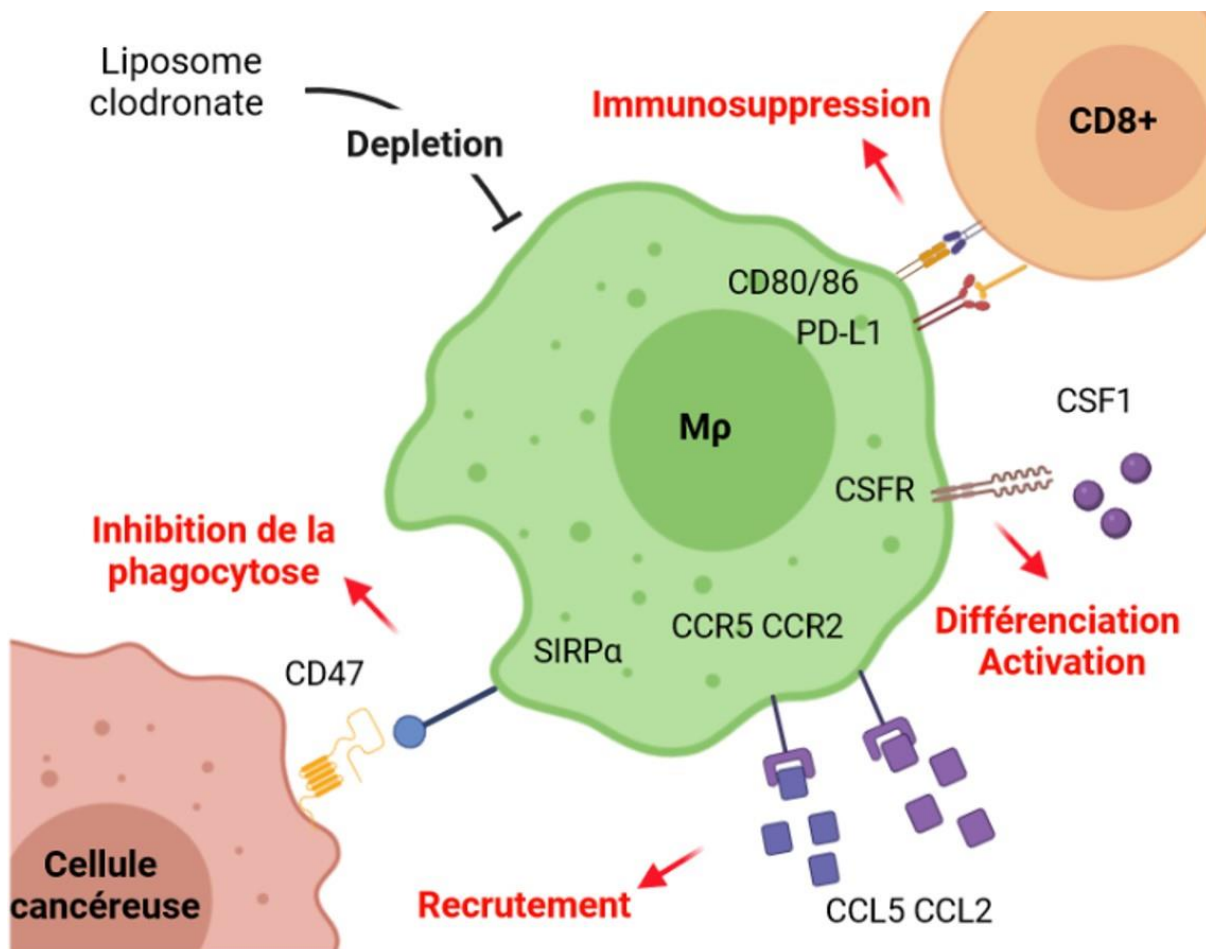


Figure 10. Les cibles thérapeutiques des macrophages. Différentes approches peuvent être ciblées pour réduire l'impact des macrophages lors de la croissance tumorale. L'une des stratégies est la déplétion des macrophages, les autres consistent à inhiber l'immunosuppression en bloquant PD-L1, inhiber la différenciation et l'activation en bloquant le récepteur CSF, inhiber le recrutement des macrophages en inhibant les récepteurs à CCL5 et CCL2, et en inhibant le complexe SIRPα-CD47 limitant la phagocytose. Figure adaptée de : Marelli et al., 2017⁶¹.

3. Promouvoir la résolution de l'inflammation

A. Les médiateurs issus de l'efferocytose

L'inflammation aiguë est un processus physiologique finement régulé. Les médiateurs lipidiques pro-inflammatoires comme les prostaglandines et les leucotriènes sont les premiers sécrétés pendant l'initiation de la phase inflammatoire⁴. Les neutrophiles sont ainsi recrutés induisant leur activité tumoricide, éliminant les débris par phagocytose, puis entrant en apoptose. Les monocytes sont ensuite recrutés par chimiotactisme, se différencient sur site en macrophages et permettent la clairance des débris cellulaires et notamment des neutrophiles apoptotiques⁴. Ce processus d'élimination est appelé efferocytose. Les macrophages qui éliminent les PMN sont dit pro-résolutifs et secrètent des SPM, des cytokines anti-inflammatoires et diminuent la production de cytokines pro-inflammatoires⁴¹ (Figure 11).

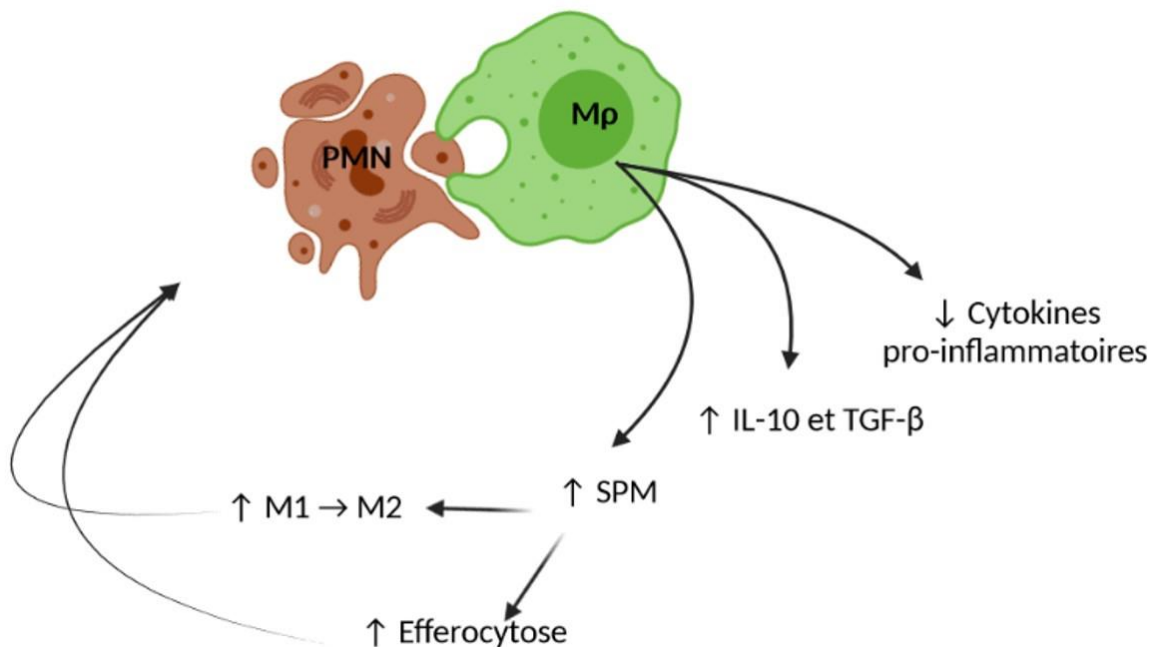


Figure 11. Les macrophages pro-résolutifs. Pendant l'efferocytose des cellules apoptotiques, les macrophages acquièrent un phénotype pro-résolutif. Le processus d'efferocytose est augmenté par la production des médiateurs pro-résolutifs et notamment les SPM. Les macrophages pro-résolutifs restreignent l'expression de cytokines pro-inflammatoires en faveur des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF-β) participant à la résolution de l'inflammation. Figure adaptée de : Lavy et al., 2021⁴¹.

L'IL-10 est peu connue et étudiée dans le traitement des cancers, mais cette cytokine intervient dans la phase de réparation tissulaire et a été décrite comme pouvant promouvoir les cancers métastatiques⁸⁸. Pour ce qui est du TGF-β, cette cytokine appartient au groupe de cytokines qui permettent la croissance et la différenciation cellulaire. Elle joue un rôle anti-inflammatoire similaire à l'IL-10⁸⁸. Le TGF-β active les cellules possédant son récepteur et permet, par l'action des Treg, une extinction des autres cellules immunitaires comme les LT effecteurs. Dans les tumeurs, le TGF-β,

comme l'IL-10, favorise le développement tumoral⁸⁸. Bien que ces cytokines soient connues comme de mauvais pronostic dans le cancer, le processus d'efferocytose diminue la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et permet la synthèse de médiateurs pro-résolutifs²⁴. Les médiateurs lipidiques pro-résolutifs sont bio-synthétisés à partir d'acide gras poly-insaturés (acide arachidonique, acide eicosapentaénoïque et acide docosahexaénoïque), tout comme les prostaglandines et les leucotriènes lors de la réaction inflammatoire^{3, 24, 41}. Ces SPM sont produits grâce à l'action des enzymes COX (cyclo-oxygénase) et LOX (lypoxigénase)^{3,41}. Ainsi ces médiateurs sont dit pro-résolutifs, car ils permettent, dès leur biosynthèse, d'entrer en compétition directe avec l'acide arachidonique également à l'origine des prostaglandines et des leucotriènes. Ainsi la résolution de l'inflammation n'apparaît pas comme un processus anti-inflammatoire mais autacoïde^{3, 24}. Ces médiateurs pro-résolutifs spécialisés regroupent les lipoxines, protectines, résolvines et marésines²⁴. Ils ont la capacité de limiter l'infiltration des neutrophiles lors de la réaction inflammatoire et d'augmenter la fonction phagocytaire (Figure 12). Ils limitent également la production de TNF- α , mais surtout stimulent le processus d'efferocytose par les macrophages^{3,24, 41}. Ainsi, les SPM contrôlent l'amplitude et la durée de l'inflammation³. Par exemple, les SPM contrôlent le passage d'un phénotype de macrophage pro-inflammatoire (M1) à un phénotype anti-inflammatoire (M2), et de ce fait l'amplification de la résolution de l'inflammation³. Ces mécanismes sont permis grâce à la liaison des SPM au niveau des récepteurs de la lipoxine A4 (ALX/FPR) activant la voie PKC³. Au-delà de l'augmentation de la phagocytose, les SPM exprimés par les cellules immunitaires et notamment les macrophages, permettent également une capacité de réguler l'immunité adaptative. Les SPM sont à l'origine d'une régulation sélective de cytokines, grâce à l'expression des récepteurs spécifiques à la surface des cellules lymphoïdes innées, mais également pour les cellules NK, T et B. Les propriétés cytotoxiques des cellules NK permettent d'activer l'apoptose des granulocytes, et ceci est augmenté par l'action des SPM. De plus, les résolvines permettent le contrôle de la différenciation des CD4+ par la diminution des cytokines IFN- γ et IL-17, des facteurs de transcription T-bet et RORc, et par la génération *de novo* de FoxP3. En plus des CD4+, les SPM modulent également les CD8 par une diminution de production d'IL-2, d'IFN- γ et de TNF- α ^{3, 89}. Les SPM ne sont pas anti-inflammatoires, ils stimulent la clairance de l'inflammation sans être immunosuppresseurs²⁴. Les SPM auraient ainsi, de nombreux effets bénéfiques, notamment dans les infections, l'inflammation chronique, la réparation tissulaire, la douleur et surtout dans les cancers³.

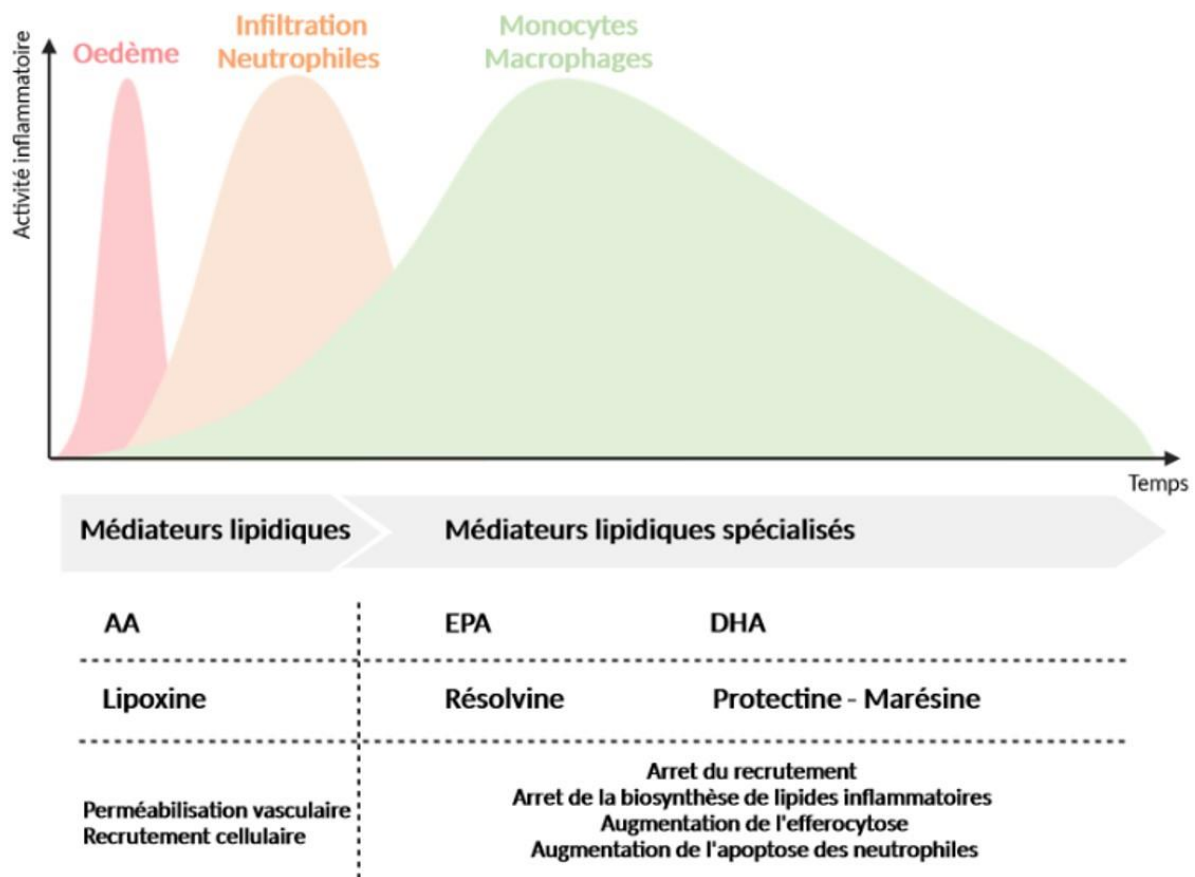


Figure 12. Les médiateurs lipidiques dans la résolution de l'inflammation. Les médiateurs lipidiques sont produits à partir d'enzymes. Les lipides pro-inflammatoires (leucotriènes et prostaglandines) sont les premiers lipides à être bio-synthétisés lors de la réaction inflammatoire. Lors de la résolution de l'inflammation le *switch* lipidique engendre la biosynthèse de SPM (résolvine, protectine et marésine). Figure adaptée de : Serhan et al., 2018 et Lavy et al., 2021^{41,89}.

B. L'utilisation des médiateurs pro-résolutifs dans le cancer

L'utilisation d'anti-inflammatoires montre de réels intérêts bénéfiques dans le traitement ou même l'incidence des cancers. Cependant l'utilisation d'anti-inflammatoires peut également inhiber le processus de résolution de l'inflammation. En effet, bloquer les enzymes responsables de la biosynthèse de chimio-attractants (prostaglandines, leucotriènes) bloquerait également la biosynthèse des médiateurs de la résolution de l'inflammation³. En ce sens, l'utilisation de SPM pour cibler l'inflammation pro-tumorale semble une approche pertinente.

L'inhibition des cytokines pro-inflammatoires par les SPM, permet de lutter contre l'apparition de lésions précancéreuses²⁰. Dans le côlon, la résolvine a été décrite comme capable de réduire les colites pouvant être à l'origine de cancers du côlon. Par exemple, la résolvine permet l'inhibition de la production de TNF- α , réduisant ainsi l'expression de l'oncogène c-myc au sein de l'épithélium intestinal normal. Ce processus est donc à l'origine de la protection contre l'initiation de cancers coliques. Les

SPM ont également été démontrés comme fort réducteurs d'initiation tumorale dans les leucémies, les cancers du sein, gastriques, pancréatiques, de la prostate et du poumon²⁰.

En plus de leur rôle dans l'initiation des cancers, les SPM agissent également en inhibant leur progression. En effet, les SPM limitent l'invasion des cellules cancéreuses en diminuant l'angiogenèse et la transition épithélio-mésenchymateuse (Figure 13). Ces observations ont été réalisées dans différents types de cancers tels que les cancers gastriques, pulmonaires mais également hépatiques^{20, 57}. Par exemple, dans les cancers gastriques, les SPM permettent aux cellules cancéreuses de restaurer l'expression des récepteurs spécifiques aux SPM et inhibent la production de facteurs angiogéniques comme le VEGF⁵⁷ (Figure 13). De la même manière, la prévention contre le développement de métastases dans le cancer du poumon est permise par les SPM, grâce à la suppression de l'effet du TGF- β sur la transition épithélio-mésenchymateuse²⁰. Ainsi dans différents types de cancers, les SPM permettent de prévenir le développement et l'invasion des cellules cancéreuses.

Lors de l'utilisation de thérapies conventionnelles, des débris cellulaires sont générés et contribuent à produire de l'inflammation au sein de la tumeur. Les SPM, de manière générale, visent à augmenter la clairance des débris cellulaires. La résolvine a été montrée comme pouvant stimuler la phagocytose des débris générés par la chimiothérapie et diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et le TNF- α , par les macrophages. Ainsi, la résolvine limite la progression tumorale et augmente l'efficacité de la chimiothérapie en stimulant les macrophages pro-résolutifs⁸⁹ (*cf.* Partie III.1.B).

La bio-action des SPM joue un rôle prépondérant dans l'atténuation du cancer en ciblant l'inflammation pro-tumorale, grâce à leurs propriétés immunomodulatrices²⁰. Ces différents résultats démontrent le potentiel anti-tumoral de la phagocytose par les macrophages, des débris cellulaires dans le cancer. L'effet anti-tumoral de cette stratégie thérapeutique met en avant le potentiel de cibler l'inflammation pro-tumorale. Ainsi la stratégie de cibler l'inflammation semble une approche pertinente dans le traitement des cancers.

SPM				
	Lipoxine	Résolvine	Protectine	Marésine
Fonction dans l'inflammation	↑ M2 ↓ Neutrophile ↓ Angiogénèse	↓ Migration des APC ↓ Activation des T	↑ Réparation tissulaire ↓ NF-κB ↓ Migration des T	↑ Réparation tissulaire ↑ Treg ↑ M2
Fonction dans le cancer	↑ TAM → M1 ↓ Croissance tumorale ↓ Prolifération/Invasion cellules tumorales ↓ Angiogénèse		?	

Figure 13. Les médiateurs pro-résolutifs spécialisés (SPM) dans l'inflammation et dans le cancer. La fonction des différents médiateurs pro-résolutifs lors de l'inflammation et dans le cancer. Figure adaptée de : Fishbein et al., 2021 et Lavy et al., 2021^{24, 41}.

Conclusion Partie II.

Ces dernières années, l'inflammation est devenue une cible thérapeutique, ouvrant une nouvelle voie dans le traitement des cancers. En effet, la croissance tumorale est étroitement liée à l'inflammation. Ce processus, liant inflammation et développement tumoral, dépend du contexte tumoral et immunitaire. En effet, la plasticité des cellules immunitaires se révèle à la fois être promotrice et inhibitrice de la croissance tumorale. Les cibles thérapeutiques de l'inflammation dans les cancers ouvrent de nouvelles portes dans le traitement des cancers. Actuellement, les cellules cancéreuses ne sont plus les seules cibles, mais le microenvironnement tumoral entier est pris pour cible. Bien souvent les thérapies conventionnelles induisent une inflammation résiduelle notamment à causes des mécanismes de mort cellulaire, la libération massive de cytokines pro-inflammatoires, et impliquent des résistances thérapeutiques²⁰.

Partie III.

Les thérapies conventionnelles et la nécessité du développement de nouvelles approches anti-cancéreuses

1. Les cibles des thérapies anti-cancéreuses conventionnelles

A l'heure actuelle, les principales thérapies anti-cancéreuses, telles que la chimiothérapie, la radiothérapie, et les immunothérapies visent à restaurer un état d'immunosurveillance. Cette stratégie consiste au « réchauffement » de la tumeur, c'est-à-dire de passer d'une tumeur dite « froide » : faiblement immunogène caractéristique de l'échappement tumoral, à une tumeur dite « chaude » : fortement immunogène caractéristique de la phase d'immunosurveillance (Figure 14).

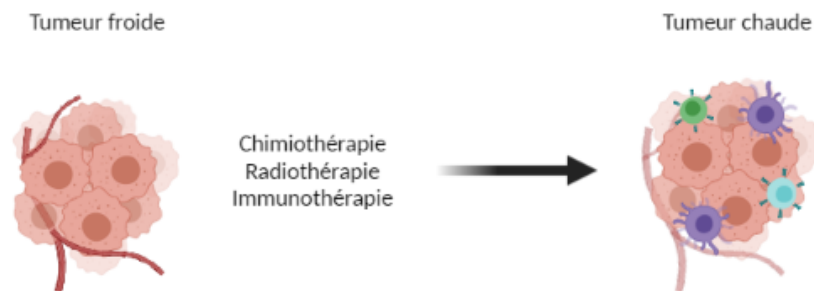


Figure 14. Infiltration immunitaire induite par les thérapies conventionnelles. Les tumeurs froides contiennent peu d'infiltration immunitaire avec une forte vascularisation. Les thérapies conventionnelles visent à restaurer une infiltration immunitaire dans le but de passer d'une tumeur dite froide à une tumeur dite chaude. Figure adaptée de : Zhang et al., 2019⁹⁰.

A. L'induction de la mort immunogène

La stratégie actuelle majeure, visant à « réchauffer » la tumeur, se fonde sur le principe de mort cellulaire immunogène. En effet, les approches thérapeutiques, comme les chimiothérapies et la radiothérapie, visent à générer la mort immunogène des cellules cancéreuses^{23, 91, 92}. La mort immunogène est un mécanisme de mort cellulaire facilitant la réponse spécifique de l'immunité adaptative vis-à-vis de l'antigène des cellules mourantes⁹³.

- Le principe de mort immunogène

Lors de l'édition d'un cancer, les cellules cancéreuses sont reconnues par le système immunitaire pour être éliminées. Cependant au cours du temps, les cellules cancéreuses prennent le pas sur les cellules immunitaires limitant leur élimination, à l'origine de la progression tumorale. Cette invisibilité des cellules cancéreuses face au système immunitaire est caractérisée par une faible présentation antigénique. Au début du processus tumoral, les cellules cancéreuses expriment des antigènes tumoraux captés et présentés par les cellules dendritiques afin d'activer, dans les organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes T. Ce recrutement du système immunitaire est également permis grâce au microenvironnement inflammatoire ; aux signaux de danger (ATP, la calréticuline, HMGB1) et aux cytokines pro-inflammatoires (cf. Partie I. 3.). La présence de ces signaux de dangers au sein de la tumeur, permet de stimuler la présentation antigénique par les cellules dendritiques pour activer la réponse lymphocytaire. Ainsi, les DAMPs génèrent une réponse inflammatoire permettant de lutter contre les cellules cancéreuses. Ce processus permet donc de restaurer une phase d'immunosurveillance vis-à-vis de la tumeur^{23, 29, 91, 92}. Cependant au cours de la progression tumorale, ce processus devient de moins en moins actif, du fait de l'ignorance des cellules cancéreuses, notamment par leur domination vis-à-vis du système immunitaire par les inhibiteurs comme PD-1 et PD-L1, par exemple. L'induction d'une mort cellulaire immunogène au sein du microenvironnement permet au processus de surveillance d'être restauré. L'induction d'une mort cellulaire importante corrobore une augmentation de la nécrose tissulaire. Ainsi les signaux de dangers associés à la cellule se retrouvent en dehors de la cellule, permettant localement de générer une inflammation. Dans ce cas, les signaux de dangers et les cytokines pro-inflammatoires dans la matrice extracellulaire permettent le recrutement du système immunitaire, à l'origine d'une forte inflammation locale^{23, 29, 91, 92}.

- Les acteurs et les mécanismes de la mort immunogène

Parmi les traitements agissant en tant qu'inducteurs de morts immunogènes, les chimiothérapies et les radiothérapies sont les principaux traitements. Il s'agit des agents ICD (*Immunogenic cell death*) de types I et les ICD de type II²³. Les agents ICD de types I regroupent les chimiothérapies cytotoxiques comme par exemple la doxorubicine et l'oxaliplatine, permettant d'induire une réponse anti-tumorale²³. Les chimiothérapies utilisées sont des agents qui agissent sur les mécanismes de la réplication cellulaire (métabolisme de l'ADN et microtubule). Ainsi, les cellules mourantes vont libérer différents DAMPs comme l'exposition de la calréticuline, la libération d'ATP, d'HMGB1, d'Annexine A1

et d'IFN^{93, 94}. Ces DAMPs, en plus des antigènes associés à la tumeur, vont permettre le recrutement des cellules présentatrices de l'antigène, notamment les DC, pour faciliter l'élimination des cellules mourantes. Les DC stimulent à leur tour les LT CD8+ et CD4+, permettant de répondre spécifiquement vis-à-vis de la tumeur^{93, 94}. Alors que la radiothérapie, elle, est une thérapie qui s'appuie sur les cassures double brins de l'ADN, les agents ICD de types II reposent sur le principe de méthodes physiques²⁹. Ces agents induisent la production de ROS (*Reactive oxygen species*) à l'origine d'un stress cellulaire (stress du réticulum endoplasmique)²³. Cette méthode permet également d'induire la sécrétion des DAMPs (HSP70 [*Heat Shock Protein*], HMGB1, IL-1 β), permettant le recrutement du système immunitaire et l'activation des LT CD8+ cytotoxique⁹⁴. Ces thérapies visent donc à induire la mort des cellules cancéreuses en ciblant l'ADN de manière irréversible. Toutefois, ces traitements agissent également de la même manière sur les cellules non cancéreuses environnantes.

- Les effets indésirables des thérapies ciblant la mort immunogène

Les thérapies anti-cancéreuses conventionnelles sont donc à l'origine du recrutement de cellules inflammatoires ainsi que la sécrétion des facteurs inflammatoires au sein du microenvironnement tumoral permettant le maintien d'un équilibre entre les cellules cancéreuses et le système immunitaire^{22, 82}. Les thérapies anti-cancéreuses qui génèrent des débris de cellules tumorales peuvent stimuler la croissance tumorale par l'orage cytokinique pro-inflammatoire qui en découle. Alors que la mort cellulaire est bénéfique pour prévenir contre l'accumulation des cellules et des dommages à l'ADN, elle peut également permettre une inflammation proliférative et stimuler la croissance tumorale²⁴.

Les thérapies anti-cancéreuses, et plus précisément la radiothérapie, ont été mises en évidence comme potentiellement promotrices des cancers, l'effet Révész^{95, 96}. En effet, il a été démontré que les radiations induisent une réaction inflammatoire locale intense. Cette réaction a été décrite comme un effet « d'alimentation » pour la croissance tumorale par la réponse inflammatoire, avec un effet positif sur la vascularisation⁹⁶. Par sa réponse inflammatoire, le système immunitaire peut également promouvoir le développement de cancer. En enrichissant l'environnement tumoral par des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires (comme le TNF- α) la réponse inflammatoire favorise la croissance, la migration, et la différenciation des cellules du microenvironnement tumoral et plus particulièrement des cellules cancéreuses^{22, 82} (cf. Partie I. 3. et Figure 15). Ces dernières années, l'étude de l'inflammation induisant la progression tumorale et notamment induite par les thérapies conventionnelles, émerge davantage. Ces observations sont généralement associées aux thérapies à

l'origine de mort cellulaire immunogène et plus particulièrement de nécrose. En effet, la mort immunogène génère la libération de DAMPs comme l'ATP, HSP70, HMGB1, des médiateurs inflammatoires qui vont à leur tour stimuler la production d'IL-1 α , d'écicosanoïdes, de cytokines immuno-stimulatrices favorisant une inflammation chronique et de ce fait augmentant les néo-antigènes tumoraux^{21, 23, 24, 93}. De plus la mort cellulaire induit également la production de TNF- α , d'EGF, et d'IL-6 à l'origine du recrutement de cellules immunosuppressives^{21, 93}. En plus de l'induction de cellules immunosuppressives, la nécrose induit un environnement hypoxique, qui, avec la génération de facteurs de croissance, va favoriser l'angiogenèse^{23, 58}.

Ainsi, les thérapies, comme la chimiothérapie et la radiothérapie, sont à l'origine de l'induction de la mort cellulaire provoquant une inflammation locale et systémique (effet abscopal) augmentant le risque de progression tumorale^{21, 23, 29} (Figure 15). De plus, les cellules du système immunitaire lors du développement de cancer, ont un fort taux de prolifération et donc sont également sensibles aux thérapies anti-cancéreuses classiques. Les protocoles de thérapies anti-cancéreuses actuelles sont très lourds. Les patients recevant de la chimiothérapie et/ou exposés aux radiothérapies souffrent bien souvent de neutropénie et/ou lymphopénie. Ainsi, au vu de la forte toxicité des chimiothérapies, des thérapies ciblées se sont développées, au cours des années.

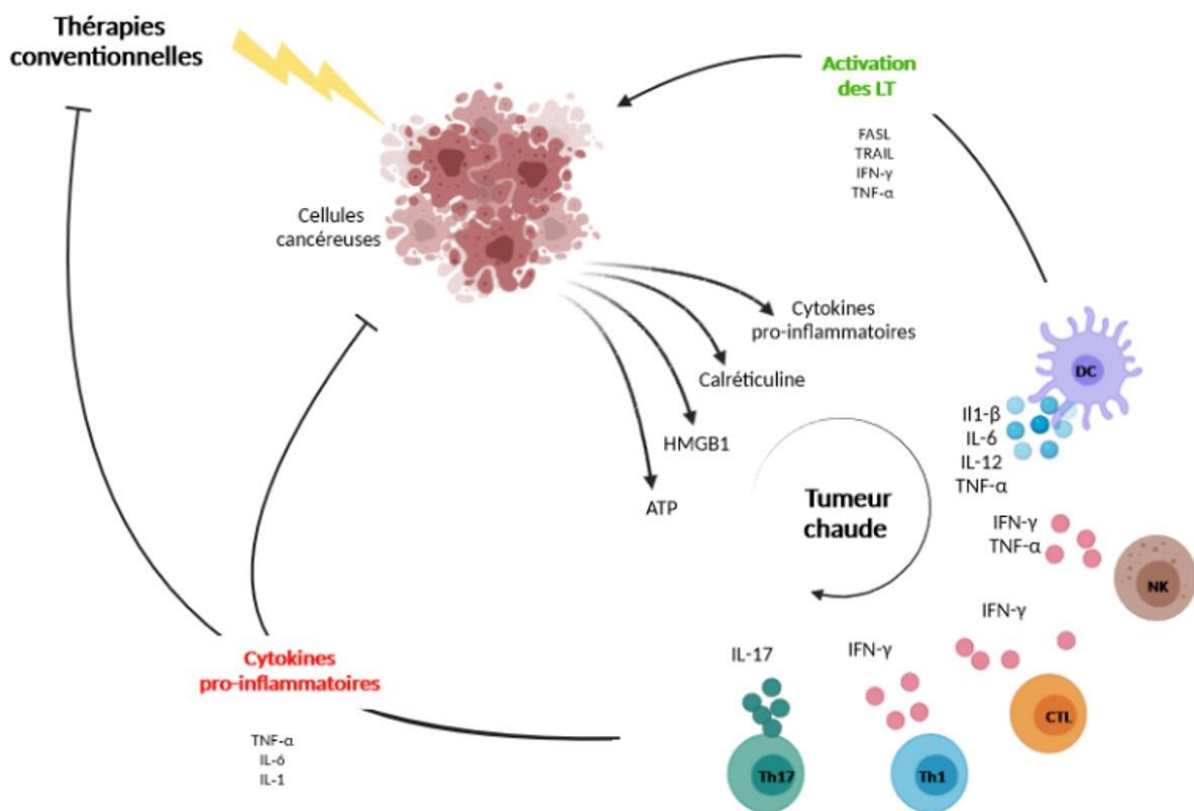


Figure 15. L'inflammation induite par les thérapies conventionnelles source d'immunosurveillance et de promotion tumorale. Les ICD induisent la libération de DAMPs (HMGB1, Calréticuline, ATP) et des cytokines pro-inflammatoires par les cellules cancéreuses. Les DAMPs et les cytokines vont activer les cellules dendritiques qui sécrètent des cytokines effectrices.

Ainsi les cellules dendritiques vont permettre aux lymphocytes T de se différencier et de s'activer pour acquérir notamment une fonction cytotoxique vis à vis de la tumeur. Mais ces cytokines pro-inflammatoires peuvent également être captées par les cellules cancéreuses pour croître, se différencier et migrer. Figure adaptée de : Grivnikov et *al.*, 2010 et Showalter et *al.*, 2017^{23, 92}.

B. La rééducation du système immunitaire : les immunothérapies

Les radiothérapies et les chimiothérapies sont les thérapies conventionnelles les plus connues dans le traitement du cancer. Ces thérapies visent à induire la mort des cellules cancéreuses pour une meilleure reconnaissance par le système immunitaire. Au vu des dernières connaissances sur l'immunologie de la tumeur, de nouvelles approches thérapeutiques émergent : l'immunothérapie. En effet, jusqu'à récemment, la cible thérapeutique dans le cancer était les cellules cancéreuses, l'immunothérapie, elle, ne se focalise pas que sur les cellules tumorales mais aide le système immunitaire à les reconnaître pour les détruire.

▪ La levée des points de contrôles immunitaires : les inhibiteurs *checkpoint*

Afin de restaurer l'immunosurveillance des cancers, les immunothérapies ciblent des points de contrôles du système immunitaire. Ces stratégies font l'objet de nombreuses études ces dernières années avec l'émergence de plusieurs cibles à fort pouvoir thérapeutique.

Parmi ces stratégies, deux cibles principales sont abondamment étudiées et utilisées en thérapies anti-cancéreuses. Les antigènes CTLA-4 et PD-1 sont fortement exprimés chez les lymphocytes T dans les mélanomes, les cancers du poumon et du rein⁹⁷. L'antigène CTLA-4 ou CD152 est un récepteur exprimé par les lymphocytes T et de manière constitutive par les Treg (Figure 16). Cet antigène a pour rôle de limiter la réponse inflammatoire, par son interaction avec son ligand B7.1 ou B7.2 (respectivement CD80 et CD86). Ce processus est largement exploité par les cellules cancéreuses pour échapper à l'immunosurveillance. Ainsi l'utilisation d'antagoniste de ce récepteur, tels que les anticorps anti-CTLA-4 (comme l'ipilimumab), permet de limiter cette interruption de réponse inflammatoire au sein de la tumeur et de restaurer la veille immunitaire^{27, 97}. La seconde voie d'immunothérapie majoritairement étudiée est celle de PD-1 (ou CD279) et PD-L1. La molécule PD-1 est exprimée à la surface des lymphocytes T, alors que le ligand de ce récepteur, PD-L1, est exprimé à la surface des cellules cancéreuses⁹⁷ (Figure 16). Encore une fois, ce processus est fortement exploité lors de l'édition des cancers pour échapper à la surveillance du système immunitaire. En effet, la liaison de PD-L1 des cellules tumorales au niveau du récepteur PD-1 des lymphocytes, va générer le blocage de la réponse

des lymphocytes vis-à-vis des cellules cancéreuses. La stratégie consiste donc à l'emploi d'antagoniste d'anti-PD-1 (comme le nivolumab) ou d'anti-PD-L1 afin de prévenir l'extinction de la surveillance des lymphocytes T. Ainsi la présentation antigénique aux lymphocytes T et leur activation sont désinhibées^{27, 97}. Ces deux stratégies de ciblage de CTLA-4 et PD-1/PD-L1 montrent également de réels intérêts bénéfiques dans le traitement des cancers lorsqu'ils sont utilisés en combinaison, permettant une synergie dans la réponse anti-tumorale du système immunitaire^{27, 30, 98}.

En plus de l'effet de la radiothérapie et de certaines chimiothérapies sur la promotion tumorale, les inhibiteurs *checkpoint* peuvent également induire des effets néfastes. En effet, il a été observé que l'utilisation des anti-CTLA-4 génère une immunité toxique. De plus l'étude de la combinaison d'anti-PD-1 et d'anti-CTLA-4 en parallèle de leur effet notoire dans l'inhibition tumorale, montre également une certaine toxicité vis-à-vis de l'organisme. Le fait de bloquer la régulation immunitaire et notamment l'axe suppresseur de l'inflammation instaure également le développement de réaction auto-immunitaire pouvant être tout aussi délétère vis-à-vis de l'organisme^{27, 99}.

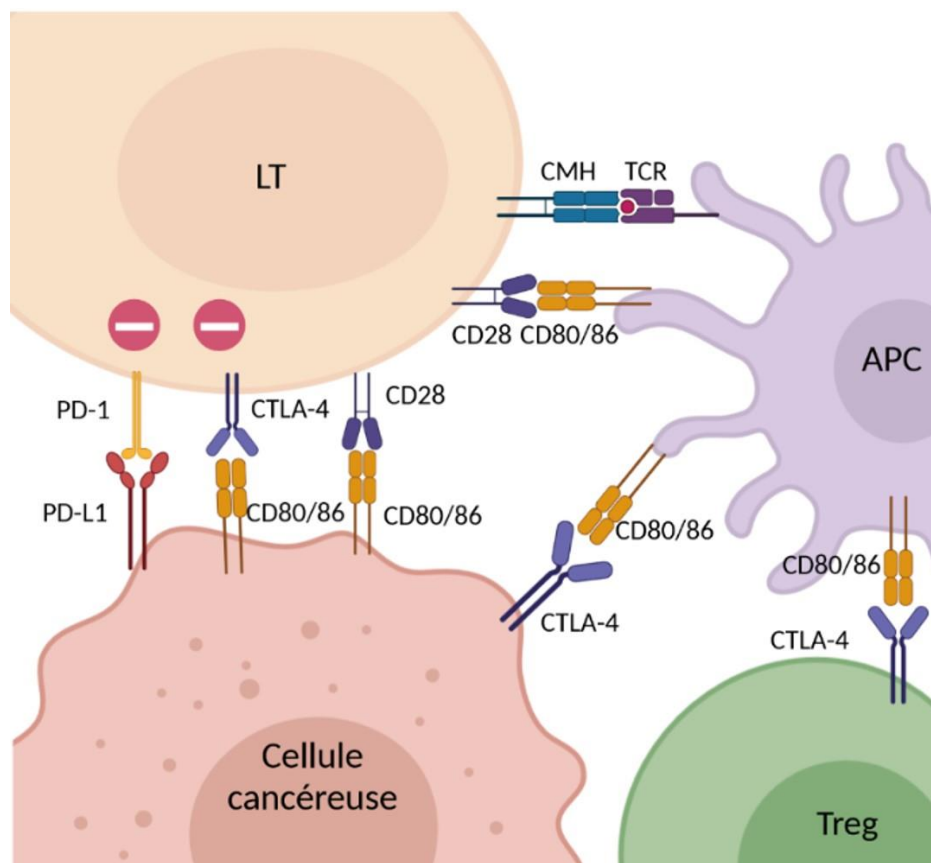


Figure 16. Les principaux points de contrôles immunitaires. Les lymphocytes T et notamment les CD8+ sont les cellules les plus impactées par l'immunosuppression impliquant la signalisation par PD-1 et PD-L1. En revanche CTLA-4 est plus à même de supprimer l'action des Treg. Figure adaptée de : Topalian et al., 2016⁹⁷.

- **Armer les cellules immunitaires : CAR T cells**

La troisième stratégie pour susciter la surveillance immunitaire est de rééduquer les cellules immunitaires à la surveillance anti-tumorale. Le point clé de ces stratégies est une importante infiltration lymphocytaire au niveau de la tumeur, permettant le passage d'une tumeur froide à chaude¹⁰⁰. Pour cela, la reprogrammation des cellules immunitaires, et notamment des cellules hématopoïétiques et des lymphocytes T matures, est nécessaire. Cette reprogrammation passe par des transfections géniques pour faire exprimer aux cellules des gènes codants pour un récepteur permettant la reconnaissance de l'antigène tumoral et leur activation. Ces récepteurs sont appelés *CAR (Chimeric antigen receptor) T cells*¹⁰⁰. Il existe diverses cibles thérapeutiques des *CAR T cells*. Ces dernières sont plutôt employées dans le traitement des cancers hématologiques que des tumeurs solides. La forte mutation au sein d'une tumeur solide rend en effet les *CAR T cells* inefficaces. De plus, l'utilisation de cette stratégie thérapeutique peut conduire à une forte réponse anti-tumorale engendrant la production d'une forte quantité de cytokines inflammatoires comme l'IL-6, le TNF- α et l'IFN- α à l'origine du syndrome de relargage cytokinique¹⁰⁰⁻¹⁰². D'autres syndromes sont observés comme le syndrome d'activation macrophagique ou des syndromes neurotoxiques¹⁰⁰⁻¹⁰².

B. Le bénéfice des approches anti-inflammatoires et pro-résolutives associées aux thérapies conventionnelles

Ainsi, différentes stratégies ont été mises en place, au cours des dernières années, pour lutter contre le développement des cancers, passant par l'induction de la mort des cellules cancéreuses pour réinitialier le système immunitaire ou par la levée des points de contrôles et la réactivation des cellules immunitaires. De plus en plus ces approches visent le système immunitaire et non plus directement les cellules cancéreuses. Le réenclenchement du système immunitaire à l'origine d'une surveillance anti-tumorale permet de lutter efficacement contre le cancer mais instaure également de effets indésirables directement liés au développement cancéreux ou en initiant d'autres syndromes néfastes pour l'organisme.

Il apparait ces dernières années, que certains types de cancers se montrent résistants pour ces thérapies. Ce phénomène est notamment dû à l'induction de l'environnement suppressif induit par ces thérapies provoquant la nécrose des cellules cancéreuses. En effet, les MDSC et les Th17 entretiennent la résistance aux thérapies en amplifiant la réponse non immunitaire, le métabolisme de ces cellules et leur caractère inflammatoire. Par exemple, l'IL-17 au sein des cancers colorectaux induisent une résistance au 5-FU (*5-fluorouracil*)^{21, 34}. Il apparait en effet, que la modulation de

l'inflammation pourrait avoir un rôle majeur dans les phénomènes de résistances aux thérapies, et permette d'améliorer les effets de celles-ci. Par exemple, il a été observé que la déficience en récepteur au TNF améliore l'efficacité de l'utilisation d'anti-PD-1 en réduisant la mort cellulaire des TILs (*Tumor infiltrating lymphocytes*) dans les mélanomes⁸². En effet, l'utilisation d'anti-TNF- α (Infliximab) couplé à l'inhibiteur *checkpoint* anti-PD-1 montre une diminution de l'inflammation générée par cet inhibiteur ainsi qu'une inhibition de la résistance associée à cette thérapie⁷⁹. En plus de ces observations, l'utilisation d'anti-PD-1 couplé aux médiateurs lipidiques pro-résolutifs montre un réel intérêt bénéfique dans le traitement de cancers¹⁰³. De même, l'aspirine a également démontré un intérêt lorsque la molécule est utilisée en adjuvant de chimiothérapie. Dans ce contexte l'aspirine permet d'inverser la résistance à la chimiothérapie²⁰. Dans le cas des thérapies avec les *CAR T cells*, l'inflammation peut également être ciblée pour éviter les syndromes inflammatoires massifs. Cette conséquence de l'utilisation de *CAR T cells* est en faveur du blocage concomitant des récepteurs à l'IL-6 ou de l'utilisation de corticostéroïdes^{100, 101}.

L'environnement inflammatoire des cancers est donc décrit comme un des facteurs principaux de la progression tumorale. Ainsi, cibler l'inflammation dans le traitement de cancers semble une approche pertinente, seul ou en combinaison, afin de potentialiser les effets anti-cancéreux des thérapies actuelles mais également d'ouvrir une nouvelle fenêtre thérapeutique.

2. La proposition d'une nouvelle approche pro-résolutive innovante dans le traitement de cancers : candidat médicament bio-identique, SuperMApo

Au cours des dernières décennies, un nouveau paradoxe, dans le développement et le traitement des cancers est apparu, avec une mise en avant des processus inflammatoires nécessaires pour lutter contre le cancer mais engendrant *in fine* la promotion tumorale. L'étude du rôle de l'inflammation dans l'édition des cancers a permis de mettre en avant le potentiel du ciblage de l'inflammation comme stratégie anti-cancéreuse. Les connaissances acquises sur l'inflammation offrent de nouvelles fenêtres dans l'élaboration de thérapies. Contrairement aux anti-inflammatoires connus qui visent à inhiber l'initiation et la progression de l'inflammation, engendrant des effets indésirables, les thérapies pro-résolutives visent à limiter et éliminer les sources à l'origine de l'inflammation tout en initiant les différentes voies de la résolution de l'inflammation.

Ainsi, les stratégies de thérapies pro-résolutives notamment basées sur les médiateurs lipidiques pro-résolutifs ont pour but de restaurer un état d'homéostasie, avec une réponse du système immunitaire conditionnée pour éviter l'emballement inflammatoire, en réenclenchant une tolérance. L'utilisation

de SPM en approche thérapeutique dans des modèles expérimentaux de cancers a déjà montré des résultats très encourageants^{20, 24, 57, 68, 103-105}.

Dans ce contexte, l'étude de médiateurs pro-résolutifs semble être une opportunité dans le traitement des cancers. L'injection de cellules apoptotiques a permis de montrer que la réponse inflammatoire pouvait être réenclenchée en induisant la résolution naturelle de l'inflammation dans différents modèles expérimentaux de greffes auto-immunes¹⁰⁶⁻¹¹³. Les mécanismes à l'origine de cet effet étaient notamment associés aux facteurs libérés par les macrophages éliminant les cellules apoptotiques injectées. La société MED'INN'Pharma développe actuellement un candidat médicament bio-identique aux propriétés pro-résolutives : SuperMApo® (*Supernatant issued from macrophage and apoptotic cell culture*). Ce candidat médicament est constitué principalement par des lipides, des enzymes (MMP), des cytokines et chimiokines anti-inflammatoires et pro-résolutives (Annexine, IL-10 et TGF-β), de molécules du complément et de facteurs de croissance comme le VEGF. Ces médiateurs pro-résolutifs sont issus de la co-culture entre des cellules apoptotiques et des macrophages, suite à l'efferocytose¹¹¹. Ce candidat médicament a été expérimenté dans différents modèles expérimentaux de pathologies auto-immunes. L'injection de ces facteurs pro-résolutifs (SuperMApo) dans un modèle expérimental d'arthrite permet de stopper la pathologie. En effet, dans ce modèle d'arthrite induite au collagène, le traitement SuperMApo® montre un réel succès thérapeutique, en permettant de limiter les effets cliniques *via* une reprogrammation des APC¹¹¹. Dans un modèle expérimental d'encéphalomyélite, ce candidat médicament bio-identique (SuperMApo) a également permis de moduler la progression de la pathologie¹¹⁴ (Gauthier et *al.*, *in preparation*). Et dans un modèle expérimental de maladie inflammatoire chronique de l'intestin, le candidat médicament SuperMApo® limite l'inflammation et promeut la réparation de la muqueuse en restaurant l'intégrité de la barrière intestinale^{115, 116}. Ces différentes observations montrent le potentiel pro-résolutif des facteurs issus de l'efferocytose ainsi que le potentiel de l'utilisation du candidat médicament SuperMApo® afin de cibler l'inflammation dans le traitement des cancers.

Conclusion Partie III.

Face à l'accroissement du nombre d'études montrant un effet néfaste de l'inflammation sur la promotion tumorale, de nouvelles stratégies thérapeutiques émergent. Ces stratégies ont pour but de cibler l'inflammation pour, à terme, promouvoir la résolution de l'inflammation dans le processus d'édition des cancers, seules ou en association de thérapies conventionnelles. Dans ce contexte, l'utilisation des facteurs issus de l'efferocytose contenus dans le candidat médicament SuperMApo® apparaît comme une nouvelle approche innovante dans le traitement des cancers.

OBJECTIFS

Objectifs

Actuellement, la place et le rôle de l'inflammation dans l'édition des cancers et dans leur traitement font état d'un paradoxe entre effet anti-tumoral et effet pro-tumoral. Ce constat entraîne la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-inflammatoires et pro-résolutives pour venir en soutien aux solutions thérapeutiques conventionnelles déjà étudiées jusqu'alors. Les médiateurs issus de l'efferocytose, mimant le processus de résolution de l'inflammation, ont des propriétés pro-résolutives. Ces médiateurs pro-résolutifs constituent le médicament bio-identique SuperMApo® et permettent de limiter l'inflammation dans des modèles expérimentaux inflammatoires^{111, 116} (Gauthier *et al.*, *in preparation*).

Les travaux de cette thèse visent donc à exploiter ces médiateurs dans le traitement du cancer afin d'étudier l'intérêt de cette approche dans l'amplification d'une réponse anti-tumorale.

Dans ce contexte, ces travaux ont visé à étudier le potentiel effet thérapeutique de l'injection de facteurs issus de l'efferocytose dans différents modèles expérimentaux de cancers et d'étudier les mécanismes anti-tumoraux mis en place lors du traitement SuperMApo.

MATERIEL & METHODES

Matériel et méthodes

1. Modèles expérimentaux

A. Souris

Les souris C57Bl/6J et BALB/cByJ, mâles et femelles, âgées de 7 à 24 semaines ont été obtenues auprès de Charles River. Les souris Ly5.1 (souche C57Bl/6-Ly5.1 portant l'allèle SJL, locus du gène *Ptprca* : « CD45.1 ») ont été obtenues auprès de Charles River et une colonie a ensuite été maintenue au sein de notre animalerie.

Toutes les souris ont été hébergées au sein de l'animalerie de l'UMR1098, en cages ventilées (Plexx) avec accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*, en conditions « sans pathogènes spécifiques ». Les expériences ont été réalisées sous l'approbation du comité d'éthique local : « Comité d'éthique bisontin en Expérimentation Animale » (projet #2019-001-SP-7PR).

B. Lignées tumorales

Les lignées tumorales murines B16 (mélanome), B16-OVA (mélanome exprimant l'ovalbumine), B16-OVA-luc (mélanome exprimant l'ovalbumine et la luciférase), EL4 (lymphome), EL4-luc* (lymphome exprimant la luciférase), LLC1 (carcinome du poumon) et CT26 (carcinome du colon), ont été obtenues à partir de la Master Cell Bank de l'UMR1098 (**Tableau 3**).

En raison de la contamination par mycoplasmes de la lignée EL4-luc*, la lignée EL4-luc (ATCC®TIB-39-LUC2™) a été obtenue de nouveau à partir du fournisseur ATCC, ainsi que la lignée E.G7-OVA (ATCC®CRL-2113™) (**Tableau 3**). Ces deux lignées ont été entretenues en milieu de culture complet suivant les recommandations du fournisseur. Pour les lignées B16 (+/-OVA, +/-luc), EL4 et EL4-luc*, le DMEM a été utilisé avec 10 % de FBS (*Fetal bovine serum*) décomplémenté (Life Technologies), 1 % de pénicilline/streptomycine (Eurobio), 10 mM de tampon HEPES (Lonza), 10 mM d'acides aminés non essentiels (Biowest) et 1 mM de sodium pyruvate (Sigma-Aldrich). Pour la lignée CT-26, le RPMI (Gibco) a été utilisé avec 10 % de FBS décomplémenté (Life Technologies), 1 % de pénicilline/streptomycine (Eurobio), 10 mM d'acides aminés non essentiels (Biowest) et 1 mM de sodium pyruvate (Sigma-Aldrich).

Lignées	Pathologie	Tissu	Cellule	Origine	Mode de croissance	Milieu
B16	Mélanome	Peau	Epithéliale	Equipe Pr. Adotévi – UMR1098 (ATCC)	Adhérente	DMEM
B16-OVA	Mélanome	Peau	Epithéliale	Equipe Pr. Adotévi – UMR1098 (Pr. Tartour INSERM U970)	Adhérente	DMEM
B16-OVA-luc	Mélanome	Peau	Epithéliale	Equipe Pr. Adotévi – UMR1098	Adhérente	DMEM
CT-26	Carcinome	Côlon	Fibroblaste	Equipe Pr. Adotévi – UMR1098 (ATCC – CRL-2638)	Adhérente	RPMI
EL4	Lymphome	Sang	Lymphocyte T	Equipe Pr. Adotévi – UMR1098 (ATCC)	Suspension	DMEM
EL4-luc*	Lymphome	Sang	Lymphocyte T	Equipe Pr. Adotévi – UMR1098	Suspension	DMEM
EL4-luc	Lymphome	Sang	Lymphocyte T	ATCC – TIB-39-luc	Suspension	DMEM
EL4-OVA (E.G7)	Lymphome	Sang	Lymphocyte T	ATCC – CRL-2113	Suspension	RPMI
LLC-1	Carcinome	Poumon		Equipe Pr. Adotévi – UMR1098 (ATCC – CRL-1642)	Adhérente	DMEM

Tableau 3. Description des lignées cancéreuses murines utilisées pour les modèles expérimentaux de cancers.

C. Procédures et suivis des greffes de cellules cancéreuses, et de l'induction de tumeurs spontanées

Pour le modèle de greffes de tumeurs « solides », les souris ont été tondues 1 jour avant l'injection des cellules cancéreuses par voie sous-cutanée au niveau du flanc inférieur droit (200 µL). Les souris à J0 ont reçu 2.10⁵ cellules (CT-26), 5.10⁵ cellules (B16 et B16-OVA), 1.10⁶ cellules (LLC1 et EL4). La croissance des tumeurs a été mesurée régulièrement à l'aide d'un pied à coulisse (Lxl). Conformément aux recommandations éthiques, les souris présentant une tumeur supérieure à 2000 mm³ ont été euthanasiées.

Pour les modèles de greffes de tumeurs dites « liquides », les souris ont reçu 5.10⁵ cellules (B16 et B16-OVA-luc) et 1.10⁶ cellules (EL4-luc) par voie intraveineuse (300 µL), ou 2.10⁶ cellules (EL4-luc et EL4-OVA) par voie intrapéritonéale (1 mL). La progression tumorale a été évaluée par l'injection par voie intrapéritonéale de 15 mg/mL de luciférine (Promega) suivie d'une mesure de bioluminescence sous anesthésie (IVIS Lumina III Series & Living Image Software, PerkinElmer), 1 à 2 fois par semaine minimum. Pour les métastases pulmonaires induites par la lignée B16, les poumons ont été prélevés et le nombre de métastases a été déterminé ainsi que leur taille.

Pour le modèle d'induction spontanée de tumeurs du côlon, des souris BALB/cByJ mâles ont été utilisées, du fait de leur meilleure résistance au modèle¹¹⁷. L'AOM (*Azoxymethane*, Sigma-Aldrich) a été injecté (10 mg/kg) par voie intrapéritonéale à J0, et l'eau de boisson a été complétée avec 1 % de DSS (*Dextran sulfate Sodium*, MP biomedicals), pendant 3 cycles de 1 semaine¹¹⁸. Le suivi du développement tumoral a été réalisé par vidéos endoscopiques, sous anesthésie, à l'aide d'un urétroscope flexible (URF V2 ; Olympus, Rungis, France), connecté au système *visera elite* composé

du processeur vidéo OTV-S190 et de la source lumineuse au xénon CLV-S190 (Olympus, Rungis, France). Durant la procédure, le nombre de tumeurs ainsi que leur taille ont été suivis. La taille des tumeurs a été évaluée suivant un score allant de 1 à 5 en fonction de l'obstruction de la lumière intestinale¹¹⁸.

A. Traitements et modalités de traitements

Pour toutes les expériences de cette étude, le même schéma d'administration du traitement SuperMApo a été réalisé. Les souris porteuses de tumeurs ont reçu du SuperMApo par voie intrapéritonéale (1 mL), et l'injection a été répétée 48h après. Les temps de traitement ont pu différer suivant l'hypothèse de travail : à J0, à J7, à la détection d'une masse tumorale, ou en continu (1 semaine avec 4 injections, Vt = 4 mL ou 3 semaines avec 10 injections, Vt = 10 mL).

Pour les études de combinaison thérapeutique, les souris ont reçu 5 mg/ml de dacarbazine (CHU Besançon), ou une combinaison de 50 mg/ml de 5-FU (*5-fluorouracile*, CHU Besançon) et de 1 mg/ml de cisplatine (CHU Besançon), par voie intrapéritonéale. Pour la combinaison à la radiothérapie, les tumeurs des souris ont été irradiées à 8 Gy³⁰.

Pour le LPS (*E. coli*, serotype O55:B5, Sigma-Aldrich), les souris ont reçu par voie sous cutanée, ou par voie intrapéritonéale, 500 ng de LPS, 18h avant les cellules cancéreuses ou en injection concomitante.

2. Expérimentations *ex vivo* et *in vitro*

A. Prélèvement et extractions cellulaires

Des échantillons de sang ont été prélevés à chaque fin d'expérimentation, ou en suivi, par voie rétro-orbitale en tubes EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*). Le plasma a été récolté par centrifugation (20 min, 1159 x g, 20°C) et conservé à -80°C pour les dosages de cytokines.

Les cellules de la tumeur, du côlon, de la rate, des ganglions inguinaux ou mésentériques ont été obtenues par une dissociation manuelle et/ou physico-chimique des organes. Pour les tumeurs, les masses tumorales ont été passées sur un tamis cellulaires de 70 µm (Miltenyi). Une reprise en solution de 2 mg/mL de collagénase D (Sigma-Aldrich), une dissociation au GentleMacs (m_imp_tumor 04:01 C tube, Miltenyi) et une séparation en gradient de percoll, de 35 à 41 % et 68 à 75 % (Sigma-Aldrich) ont été réalisées pour certaines expériences. Pour les côlons, les cellules de la *lamina propria* ont été extraites par la dissociation des tissus en HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, Gibco), 5mM EDTA (Invitrogen) et 10% FBS (*Fetal Bovine serum*, Gibco) pendant 20 min à 37°C, puis avec 2 mg/mL de collagénase D (Sigma-Aldrich) pendant 45 min à 37°C, et au GentleMacs (tumor_02, Miltenyi). Les

cellules immunitaires ont été séparées par un gradient de 40% et 80% de Percoll (Sigma-Aldrich). Pour les splénocytes, l'élimination des globules rouges a été réalisée par une solution de lyse (NH₄Cl 41,45 g/L, EDTA 0,185 g/L, KHCO₃ 5 g/L, H₂O). Pour le modèle expérimental de tumeurs intrapéritonéales, le liquide d'ascite malin a été prélevé par lavage péritonéal avec 2,5 à 5 mL de HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, Gibco), les cellules ont été récupérées pour les études *ex vivo* par centrifugation (5 min, 460 x g, 4°C) et le surnageant a été conservé à -80°C pour la détection de cytokines et de DAMPs. Pour les modèles expérimentaux de tumeurs solides, des échantillons de tumeurs ont été remis en culture (2,5 mg/mL) pendant 24h, le surnageant a été prélevé pour le dosage de cytokines.

B. Etude *in vitro* des cellules cancéreuses

La croissance des cellules cancéreuses EL4 (2.10⁴ cellules/mL) a été étudiée au cours du temps par comptage et bioluminescence (Luciférine, Promega, 0,075 mg/mL), en présence ou non de SuperMApo. La viabilité des cellules a été déterminée par dénombrement au bleu de trypan et par un marqueur de viabilité dilué au 1/500^{ème} (FVD e-Fluor-506, *Fixable viability Dye*, Invitrogen) et analysé par cytométrie en flux. La prolifération des cellules (2.10⁶ cellules/mL), après 48h de culture, dont 24h en présence de SuperMApo (1/2), a été déterminée par cytométrie après marquage intracellulaire de Ki-67 (**Tableau 3**) et par marquage au CFSE (*Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*, Biolegend) selon les recommandations du fournisseur. Les DAMPs ont été dosés dans le surnageant de culture des cellules (1.10⁶ cellules/mL) au bout de 48h.

C. Analyse des populations immunitaires & cancéreuses, *ex vivo* et *in vitro*, par cytométrie en flux

Pour l'analyse de la polarisation des lymphocytes T et l'activation des APC, les cellules (1.10⁶ cellules/puits) ont été stimulées pendant 4h avec de la PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*, 100 ng/mL, Sigma-Aldrich), de la ionomycine (4 µg/mL, Sigma-Aldrich) et du Golgi Plug (4 µL/mL, BD Biosciences). Les FC récepteurs ont été bloqués avec 10 µg/mL de CD16/CD32 (clone 2.4G2). Les cellules ont été marquées par 2 µL/mL de marqueur de viabilité (FVD eFluor 506, Invitrogen), avec les anticorps membranaires (**Tableau 4**). Pour le marquage intracellulaire, les cellules ont été perméabilisées et fixées (kit FoxP3/transcription factor buffer set, Invitrogen) suivant le protocole du fournisseur et marquées par les anticorps intracellulaires (**Tableau 4**). Les marquages ont été acquis par cytométrie en flux (BD LSRFortessa X-20, BD Biosciences) et l'analyse a été réalisée sur les logiciels Diva (BD biosciences) et FlowJo 10 (FlowJo, LLC).

Cible	Fluo	Référence	Fournisseur	Marquage
CD3	PCP	559067	BD biosciences	membranaire
CD4	V450	560468	BD Biosciences	membranaire
CD8	AF700	557959	BD Biosciences	membranaire
CD11b	APC-Cy7	557657	BD Biosciences	membranaire
CD11c	APC	550261	BD Biosciences	membranaire
CD25	APC	557192	BD Biosciences	membranaire
CD45	BV711	563709	BD Biosciences	membranaire
CD45.1	BV711	747742	BD Biosciences	membranaire
CD45.2	APC-Cy7	560694	BD Biosciences	membranaire
CD80	FITC	553768	BD Biosciences	membranaire
CD86	PCP	105026	Biolegend	membranaire
CD152	PE	553720	BD Biosciences	membranaire
FoxP3	PE	12-5773-82	eBioscience	intracellulaire
F4/80	BV421	565411	BD Biosciences	membranaire
Gr1	PCP-Cy5.5	552093	BD Biosciences	membranaire
I-A/I-E	Pe-Cy7	107630	Biolegend	membranaire
IFN- γ	Pe-Cy7	557649	BD Biosciences	intracellulaire
Ki-67	APC	652406	Biolegend	intracellulaire
Ly6C	PCP-Vio700	130-111-782	Miltenyi	membranaire
Ly6G	FITC	130-117-500	Miltenyi	membranaire
PD-L1	APC	124312	Biolegend	membranaire

Tableau 4. Références des anticorps utilisés pour les marquages de cytométrie en flux.

D. Analyse de la réponse spécifique anti-tumorale *ex vivo*

Les cellules extraites de la rate, des ganglions mésentériques, inguinaux et du péritoine ont été remises en culture ($1 \cdot 10^6$ cellules/puit) en milieu complet DMEM (Life Technologies) supplémenté avec 10 % de FBS décomplémenté (Life Technologies), 1 % de pénicilline/streptomycine (Eurobio), 10 mM de tampon HEPES (Lonza), 10 mM d'acides aminés non essentiels (Biowest) et 1 mM de sodium pyruvate (Sigma-Aldrich). Les cellules ont été stimulées pendant 48 à 72h avec 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de peptides OVA₂₅₇₋₂₆₄ (Invivogen) ou 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de peptides OVA₃₂₃₋₃₃₉ (Invivogen), ou avec les cellules cancéreuses irradiées à 35 Gy (4:1). Le surnageant de culture a été récolté et conservé à -80°C pour le dosage des cytokines, et la réponse en IFN- γ a été étudiée par cytométrie en flux par marquage intracellulaire des lymphocytes T CD4+ et CD8+ (**Tableau 4**).

Pour étudier la réponse spécifique en IFN- γ , des ELISpot (Diaclone) ont été réalisés selon les recommandations du fournisseur. Les cellules ont été stimulées pendant 72h avec les cellules cancéreuses irradiées à 35 Gy (4:1). Le nombre et la taille des spots ont été analysés par le système CTL Immunospot (Cellular Technology Ltd et du logiciel Immunospot 5.0 Analyser).

E. Dosage de cytokines et de DAMPs

Les échantillons de surnageant de cultures des cellules cancéreuses *in vitro*, du liquide d'ascite malin issu du lavage péritonéal, du secretome des tumeurs, et du plasma issu des prélèvements sanguins, ont été dosés en cytokines et en DAMPs, selon les recommandations des fournisseurs (**Tableau 5**). Les plaques ont été lues à la longueur d'onde préconisée par le fournisseur, et analysées par un lecteur de microplaque et son logiciel (Delfia, EnVision, PerkinElmer).

Cible	Référence	Fournisseur
ATP	NBP3-54855	Novus Biologicals
HMGB1	NBP2-62767	Novus Biologicals
HSP70	DYC1663-2	R&D Systems
IFN- γ	430815	Biolegend
IL-6	431304	Biolegend
TGF- β	DY1679	R&D Systems

Tableau 5. Références des kits de détection pour cytokines et DAMPs.

3. Production de SuperMApo

Pour la production du médicament bio-identique aux propriétés pro-résolutives, SuperMApo, les macrophages péritonéaux de souris C57Bl/6 (ou BALB/c) ont été recrutés par 3 % de thioglycolate (Fisher Scientific). Les cellules apoptotiques ont été obtenues à partir des thymus des animaux après irradiation (35 Gy) et 6h de culture en DMEM (Life Technologies) complétement avec 10 % de FBS décomplémenté (Life Technologies), 1 % de pénicilline/streptomycine (Eurobio), 10 mM de tampon HEPES (Lonza), 10 mM d'acides aminés non essentiels (Biowest) et 1 mM de sodium pyruvate (Sigma-Aldrich). L'apoptose a été vérifiée par marquage Annexine-V-FITC et 7-AAD (*7-Aminoactinomycin D*, BD biosciences), et analysée par cytométrie en flux. Les macrophages ont été cultivés avec les cellules apoptotiques (1:5) en milieu X-vivo 15 (Lonza) ou RPMI 1640 (Lonza) supplémenté avec 2 % de FBS décomplémenté (Life Technologies), 1 % de pénicilline/streptomycine (Eurobio), 10 mM d'acides aminés non essentiels (Biowest) et 1 mM de sodium pyruvate (Sigma-Aldrich) pendant 48h. Le surnageant a été collecté et stocké à -80°C après filtration 0,22 μ m. La quantité de TGF- β a été déterminée par ELISA (R&D systems) selon les recommandations du fournisseur.

4. Représentation graphique et analyse statistique

Les données ont été représentées en moyenne plus ou moins l'erreur à la moyenne (SEM) ou en valeur par individu. La distribution des données a été étudiée grâce au test de normalité. Les groupes ont été comparés par tests paramétriques (*t* test non apparié ou en Anova plus post-test de Bonferroni). Pour les groupes ne suivant pas une distribution normale, des tests non paramétriques (Mann-Whitney, ou One-Way Anova, ou Two-Way Anova test plus post test de Dunn ou de Bonferroni) ont été utilisés. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative pour chacune des expériences. L'analyse et la représentation graphiques des données ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 8.3 (GraphPad Software). Les schémas et figures ont été réalisés à partir de *Servier Medical Art* (Servier) et de *BioRender* (BioRender.com).

RESULTATS

Résultats

Partie I.

Etude exploratoire de l'effet du traitement par facteurs pro-résolutifs dans des modèles expérimentaux de cancers

Le projet de recherche a consisté, dans un premier temps, à réaliser une étude prospective des différents modèles expérimentaux de cancers, pour lesquels l'injection de facteurs pro-résolutifs par le traitement SuperMApo pouvait montrer un effet thérapeutique potentiel. En effet, bien que la restauration de l'inflammation soit de plus en plus ciblée en thérapeutique anti-cancéreuse le traitement de cancers par l'injection de facteurs issus de l'efferocytose, est innovant et nécessite de trouver le modèle adéquat pour l'étude de ces effets. Il existe différents types de modèles expérimentaux de cancers. Les modèles expérimentaux les plus étudiés sont les modèles syngéniques de greffes de lignées issues de tumeurs murines chez des animaux immunocompétents. Ces modèles sont les plus simples à mettre en œuvre. Cependant, il existe d'autres types de modèles comme les modèles génétiquement modifiés, dont les tumeurs se développent spontanément suite à une modification génétique, ou encore les xénogreffes dérivées de cellules de patients¹¹⁹. Ces différents modèles sont utilisés en fonction de la question adressée. Parmi ces groupes de modèles expérimentaux il existe une multitude de sous modèles. C'est pour cette raison qu'il nous a fallu, dans un premier temps, réaliser une étude exploratoire des différents modèles expérimentaux de cancers.

1. Modèles de tumeurs solides

Notre premier axe de recherche s'est orienté autour de modèles expérimentaux de tumeurs solides, issus de greffes de lignées cancéreuses murines. Ces modèles de tumeurs solides, bien qu'expérimentaux, permettent d'étudier facilement la croissance tumorale, de par l'accessibilité de la tumeur. De plus ce type de modèle permet aussi d'étudier la composition du microenvironnement tumoral. Ce sont également des modèles documentés puisqu'ils sont largement exploités dans les études de thérapies anti-cancéreuses. Enfin, notre approche se joint à d'autres études, puisque les SPM ont déjà été démontrés comme ayant un effet potentiel sur ce type de modèle¹⁰⁵.

A. Greffes de lignées cancéreuses par voie sous-cutanée

Nous avons étudié différentes lignées cancéreuses pour induire une tumeur solide et étudier l'effet du traitement SuperMApo. Les différentes lignées, B16 (mélanome), EL4 (lymphome), LLC1 (carcinome du poumon) et CT26 (carcinome du côlon), ont été injectées ($5 \cdot 10^5$ cellules ou $1 \cdot 10^6$ cellules) par voie sous-cutanée au niveau du flanc inférieur des souris C57Bl/6 et BALB/c, suivant le fond génétique de la lignée (greffe syngénique). Au cours de ces travaux, pour certaines lignées, l'étude a consisté à étudier des lignées dérivées comme la lignée B16-OVA ou B16-OVA-luc ou encore la lignée EL4-luc ou EL4-OVA (EG.7). Les lignées « OVA » sont des lignées pour lesquelles une modification génétique a été apportée afin que ces cellules cancéreuses expriment la protéine ovalbumine permettant l'étude de réponse spécifique associée à la tumeur. Pour les lignées « luc », les cellules ont été modifiées génétiquement pour que la cellule exprime la luciférase. Le catabolisme de la luciférine par cette enzyme produit de la bioluminescence et permet ainsi de détecter les cellules cancéreuses *in vivo*.

- Effet du traitement SuperMApo sur la croissance tumorale et les cellules du système immunitaire

L'injection des facteurs pro-résolutifs pour toutes les expériences de cette étude a été réalisée en intrapéritonéal (1mL, 2 fois à 48h d'intervalle). Le traitement a été administré de manière préventive (le jour de l'injection des cellules cancéreuses) ou curative (7 jours post injection des cellules cancéreuses ou au moment de l'apparition de la tumeur). Lorsque les cellules B16-OVA ont été injectées à J0 et que le traitement SuperMApo a été administré en préventif, c'est à dire à J0 au même moment que les cellules cancéreuses, peu d'effet du traitement SuperMApo est observé sur la croissance tumorale par rapport aux animaux traités par le contrôle (Figure **17A**). En revanche, lorsque le traitement est administré 7 jours après les cellules cancéreuses, le traitement SuperMApo tend à limiter le volume de la tumeur, à partir de 3 jours après le traitement (Figure **17A**). Ces résultats suggèrent que le traitement SuperMApo aurait une meilleure efficacité lorsqu'il est administré en curatif, plutôt qu'en préventif. Cependant lorsque ces expériences ont été réalisées une seconde fois, le traitement SuperMApo, administré 7 jours après les cellules cancéreuses, ne démontrait pas d'effet anti-tumoral sur la croissance tumorale (Figure **17B**). Afin de permettre une meilleure compréhension de l'effet anti-tumoral du traitement SuperMApo dans ce modèle, les souris ont reçu le traitement au moment de l'apparition de la tumeur pour chaque animal (5 à 50 mm³), permettant de limiter l'hétérogénéité potentielle entre animaux. Lorsque cette modalité d'administration a été réalisée, le

traitement SuperMApo tendait à limiter la croissance tumorale directement après le traitement SuperMApo et cet effet pouvait être observé pendant 8 jours (Figure **17C**). En revanche, comme pour la modalité d'administration du traitement 7 jours après les cellules cancéreuses, l'administration au moment de l'apparition de la tumeur ne semble pas permettre un contrôle de la croissance sur l'ensemble de 4 expériences (Figure **17D**) mais uniquement sur deux expériences (Figure **17C**). Au vu de ces résultats peu reproductibles, d'autres lignées ont été étudiées dans le but de déterminer si un type cellulaire particulier permettait d'induire une réponse anti-tumorale après traitement par SuperMApo. La lignée B16-OVA a été remplacée par la lignée B16 dans le but de déterminer si l'ovalbumine (protéine exogène au modèle murin) pouvait impacter la réponse du traitement SuperMApo. Avec cette lignée, le traitement SuperMApo administré au moment de l'apparition de la tumeur ne limite pas la croissance de tumeur mais semble plutôt l'augmenter (Figure **17E**). Ces résultats peuvent suggérer que l'effet anti-tumoral du traitement pourrait dépendre de la lignée mais également de son immunogénéicité. En effet, l'ovalbumine est une protéine exogène à la souris, cette protéine produite par les cellules cancéreuses pourrait donc engendrer une plus forte réponse immunitaire lors de l'édition du cancer. Pour autant, le traitement SuperMApo dans ce contexte ne tend pas à limiter la croissance tumorale des B16. L'effet du traitement SuperMApo a été étudié sur d'autres lignées afin de déterminer si un autre modèle était plus exploitable pour notre approche. Pour cela, le même schéma d'expérience a été réalisé avec la lignée LLC1 (carcinome du poumon). Dans ce modèle, encore une fois, le traitement SuperMApo, administré au moment de l'apparition de la tumeur, ne permet pas de limiter le volume de la tumeur au cours du temps (Figure **17F**). La même observation a pu être faite pour le traitement de souris ayant reçu la lignée CT26 (carcinome du côlon) ou même la lignée EL4 (lymphome) : le traitement SuperMApo ne permet pas le contrôle du volume de la tumeur par rapport aux souris ayant reçu le traitement contrôle (Figure **17G** et Figure **17H**).

Ces résultats suggèrent que dans des modèles expérimentaux de croissance de tumeurs solides, l'administration du traitement SuperMApo ne limite pas le volume de la tumeur au cours du temps. Cependant, une certaine hétérogénéité est observable suivant le modèle cellulaire utilisé et l'administration du traitement.

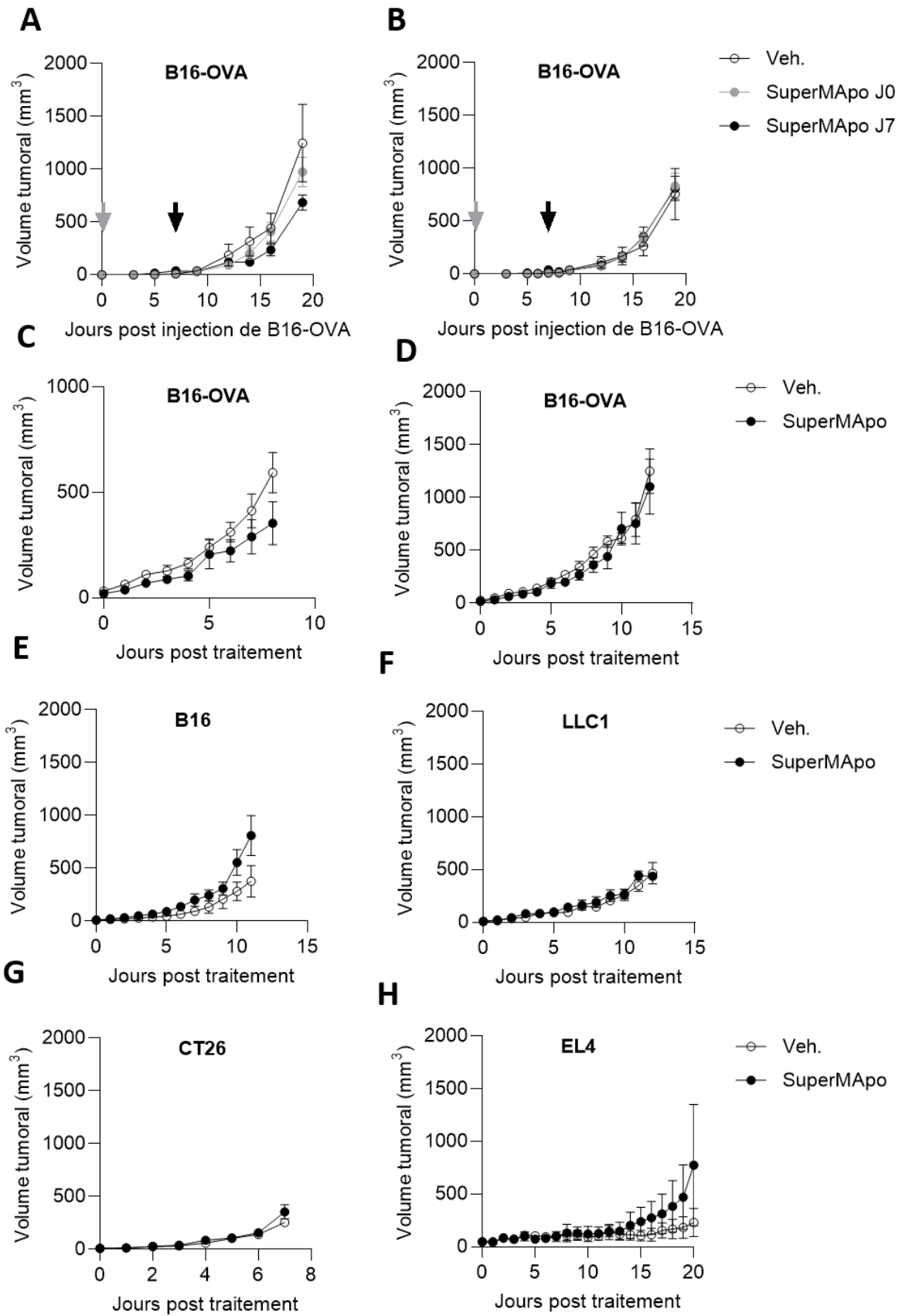


Figure 17. Effet du traitement SuperMApo sur la croissance tumorale des différentes lignées injectées en sous-cutanées. La croissance des tumeurs a été évaluée 3 fois par semaine minimum. Les lignées ont été injectées en sous-cutanées aux

souris C57Bl/6 ou Balb/C et le traitement SuperMApo a été administré en intrapéritonéal (2 x 1 mL, 48h d'intervalle). B16-OVA 5.10⁵ cellules, traitement à J0 ou J7, 1 expérience, 5 souris/groupe, $p = ns$, One-Way Anova Test + Bonferroni's post test (A). B16-OVA 5.10⁵ cellules, traitement à J0 ou J7, 2 expériences représentatives de 3 pour le traitement J7, 10 souris/groupe, $p = ns$, One-Way Anova Test + Bonferroni's post test (B). B16-OVA 5.10⁵ cellules, traitement à l'apparition de la tumeur (5 à 50 mm³), 2 expériences, 15 à 18 souris/groupe, $p = ns$, t test (C). B16-OVA 5.10⁵ cellules, traitement à l'apparition de la tumeur (5 à 50 mm³), 4 expériences, 29 à 30 souris/groupe, $p = ns$, t test (D). B16 5.10⁵ cellules, traitement à l'apparition de la tumeur (5 à 50 mm³), 1 expérience, 5 souris/groupe, $p = ns$, t test (E). LLC1 1.10⁶ cellules, traitement à l'apparition de la tumeur (5 à 50 mm³), 1 expérience, 5 souris/groupe, $p = ns$, t test (F). CT26 2.10⁵ cellules, traitement à l'apparition de la tumeur (5 à 50 mm³), 1 expérience représentative de 2, 7 à 8 souris/groupe, $p = ns$, t test (G). EL4 1.10⁶ cellules, traitement à l'apparition de la tumeur (5 à 50 mm³), 1 expérience, 5 souris/groupe, $p = ns$, t test (H). Données en moyenne \pm SEM.

Bien que dans ces modèles expérimentaux de tumeurs, le traitement SuperMApo ne semble pas limiter drastiquement la croissance tumorale en toutes circonstances, les cellules immunitaires infiltrant la tumeur ont été étudiées dans le but de déterminer si le traitement SuperMApo induit une modification immunitaire à l'origine du ralentissement de la progression tumorale. Pour cela, les cellules ont été extraites de la rate et de la tumeur 17 à 21 jours (14 jours post-traitement) après l'injection des cellules cancéreuses, et ont été étudiées par cytométrie en flux. Le nombre de lymphocytes T infiltrant la tumeur (CD4+ et CD8+) n'augmente pas lorsque les souris ont été traitées par SuperMApo (Figure 18A). En revanche, lorsque le pourcentage de CD4+ et de CD8+ parmi les CD3+ est relativisé par rapport au volume de la tumeur, une augmentation significative est observable pour les souris ayant reçu le traitement SuperMApo (Figure 18B). Ces résultats suggèrent que le nombre absolu ne diffère pas mais que pour une plus petite tumeur le pourcentage de lymphocytes T infiltrant la tumeur augmente suite au traitement SuperMApo. Afin de déterminer si les LT effecteurs étaient impactés et augmentaient en présence de SuperMApo, l'étude des CD4+ IFN- γ + (Th1) et des CD8+ IFN- γ + (Tc1) a été réalisée. Il est possible d'observer que le nombre de T effecteurs dans la tumeur, n'augmente pas après traitement SuperMApo, comme pour les LT CD4+ et CD8+ (Figure 18C). En revanche comme pour les LT, lorsque le pourcentage de cellules est rapporté au volume de la tumeur, les LT effecteurs CD4+ IFN- γ + (Th1) et CD8+ IFN- γ + (Tc1) augmentent lorsque les souris ont reçu le traitement SuperMApo (Figure 18D). Ainsi, le traitement SuperMApo pourrait être à l'origine d'un recrutement immunitaire au sein de la tumeur. Afin de déterminer si cette potentielle infiltration immunitaire provenait d'un recrutement des cellules des organes lymphoïdes secondaires, le nombre de lymphocytes T a été étudié dans la rate. Comme pour la tumeur, le nombre de lymphocytes T (CD4+ et CD8+) n'augmente pas lorsque les souris ont été traitées par SuperMApo (Figure 18E). Afin d'étudier la réponse spécifique vis-à-vis de la tumeur, les splénocytes ont été stimulés pendant 7 jours en présence de peptides OVA. Le peptide OVA₃₂₃₋₃₃₉ est présenté par le CMH de classe I permettant d'étudier la réponse spécifique des lymphocytes T CD8+ et le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₃ est présenté par le CMH de classe II permettant d'étudier la réponse spécifique des lymphocytes T CD4+. Lorsque les splénocytes ont été stimulés par ces peptides, la réponse spécifique des lymphocytes T CD4+ IFN- γ + et CD8+ IFN- γ + (cellules stimulées-

cellules non stimulées) a tendance à diminuer, lorsque les souris ont été traitées par SuperMApo (Figure **18F**). Ces observations suggèrent qu'aucun effet du traitement SuperMApo n'est retrouvé dans la rate. Dans le but d'étudier si l'injection de facteurs pro-résolutifs ne favorisait pas un phénomène d'immunosuppression, les lymphocytes T régulateurs ont été étudiés au niveau de la tumeur. Le nombre de Treg (CD4+ CD25+ FoxP3+) dans la tumeur n'est pas augmenté dans la tumeur (Figure **18G**). En revanche, le pourcentage de cette population par rapport au volume de la tumeur tend légèrement à augmenter, mais de manière non significative, lorsque les souris ont été injectées par le traitement SuperMApo (Figure **18H**). Les cellules myéloïdes, constituées de populations immunosuppressives, ont également été étudiées. Les cellules de type « MDSC-like » (CD11b+ Gr1+) augmentent de manière significative après traitement SuperMApo (Figure **18I**). Cette augmentation est due à une augmentation significative des MDSC monocytaires (Ly6G- Ly6C+) (Figure **18J**) mais pas des populations granulocytaires (Figure **18K**). Afin d'analyser le phénotype immunosuppressif, le marqueur PD-L1 a été étudié. Le pourcentage de population granulocytaire (G-MDSC) exprimant ce marqueur n'augmente pas lorsque les souris ont été traitées par SuperMApo (Figure **18L**). En revanche, pour les populations monocytaires (M-MDSC) le pourcentage de cellules PD-L1+ par rapport au volume tumoral augmente de manière significative (Figure **18M**).

Ces résultats suggèrent que le traitement SuperMApo pourrait induire une réponse lymphocytaire pour induire un effet anti-tumoral (Figure **17C**). Cependant ces données suggèrent également une potentielle augmentation des populations myéloïdes avec un phénotype immunosuppressif au sein de la tumeur qui pourrait réduire l'efficacité anti-tumorale des lymphocytes T. En ce sens, il serait envisageable que cet environnement immunosuppressif médié par le traitement SuperMApo, dans les modèles de tumeurs solides, puisse être à l'origine de l'hétérogénéité des résultats obtenus dans le suivi des volumes de tumeurs (Figure **17**), et de l'effet anti-tumoral du traitement SuperMApo présent ou non dans certains cas.

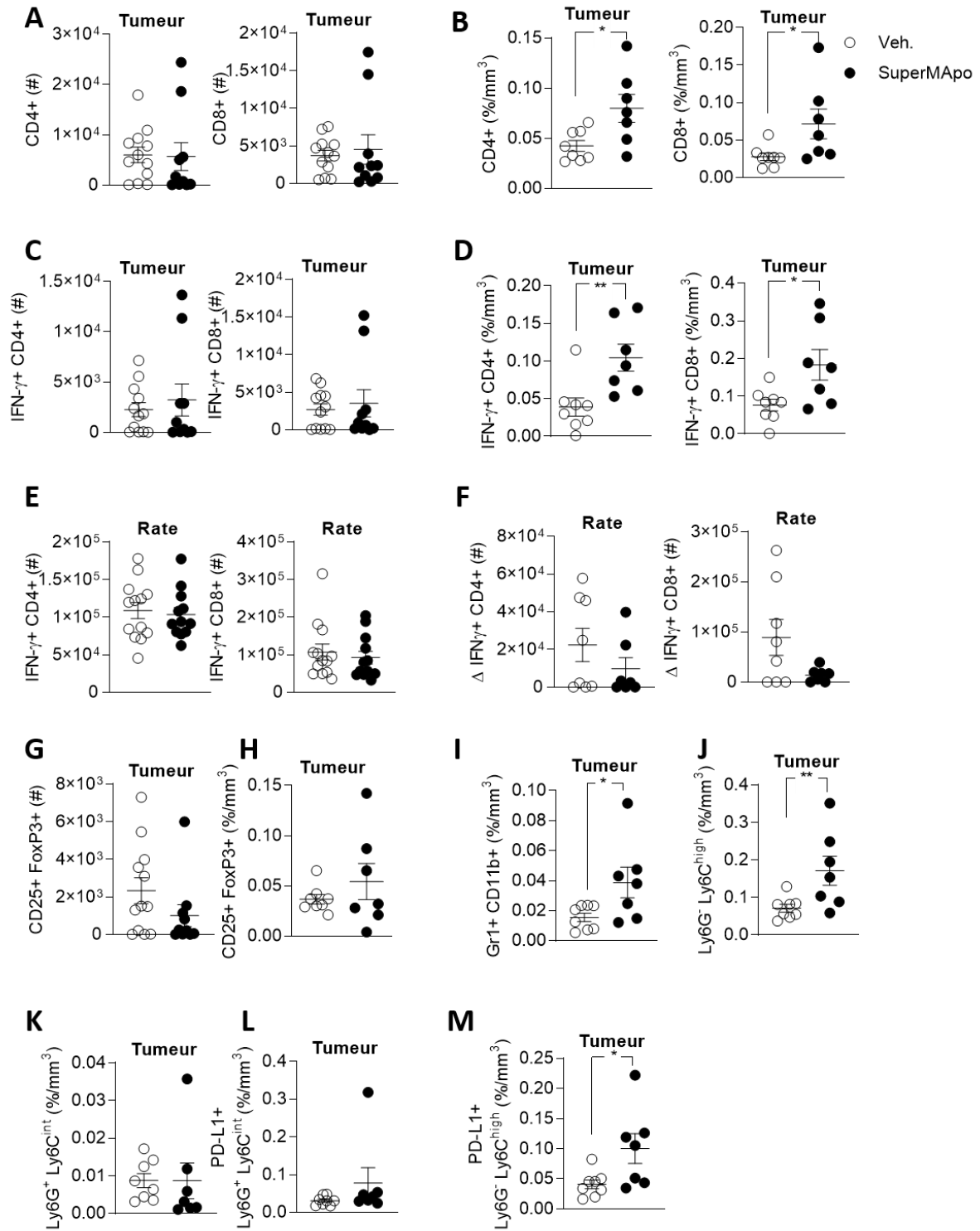


Figure 18. Effet du traitement SuperMApo sur les cellules immunitaires de la tumeur et de la rate. Les cellules immunitaires de la rate et de la tumeur ont été étudiées par cytométrie en flux 17 à 21 jours après l'injection des B16-OVA ($5 \cdot 10^5$ cellules en s.c.) aux souris C57Bl/6 traitées par SuperMApo (1mL, i.p., répété à 48h) au moment de l'apparition de la tumeur (5 à 50 mm^3). Nombre de CD4+ et de CD8+ dans la tumeur 2 expériences, 10 à 12 souris/groupe, $p = \text{ns}$, t test (A). Pourcentage parmi les CD3+ de CD4+ et de CD8+ par mm^3 de tumeur, 1 expérience, 7 à 8 souris/groupe, $* p < 0,05$, t test (B). Nombre de CD4+ et de CD8+, IFN- γ dans la tumeur, 10 à 12 souris/groupe, $p = \text{ns}$, t test (C). Pourcentage parmi les CD4+ et les CD8+ de cellules IFN- γ + par mm^3 de tumeur, 1 expérience, 7 à 8 souris/groupe, $* p < 0,05$ et $** p < 0,01$, t test (D). Nombre de CD4+ et de CD8+, IFN- γ + dans la rate, 10 à 12 souris/groupe, $p = \text{ns}$, t test (E). Réponse spécifique des lymphocytes T CD4+ IFN- γ + 5 jours après stimulation des splénocytes avec le peptide OVA₃₂₃₋₃₃₉ (10 mg/mL) et lymphocytes T CD8+ IFN- γ + 5 jours après stimulation des splénocytes avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₃ (10 mg/mL), Δ = cellules stimulées-non stimulées, 1 expérience, 7 à 8

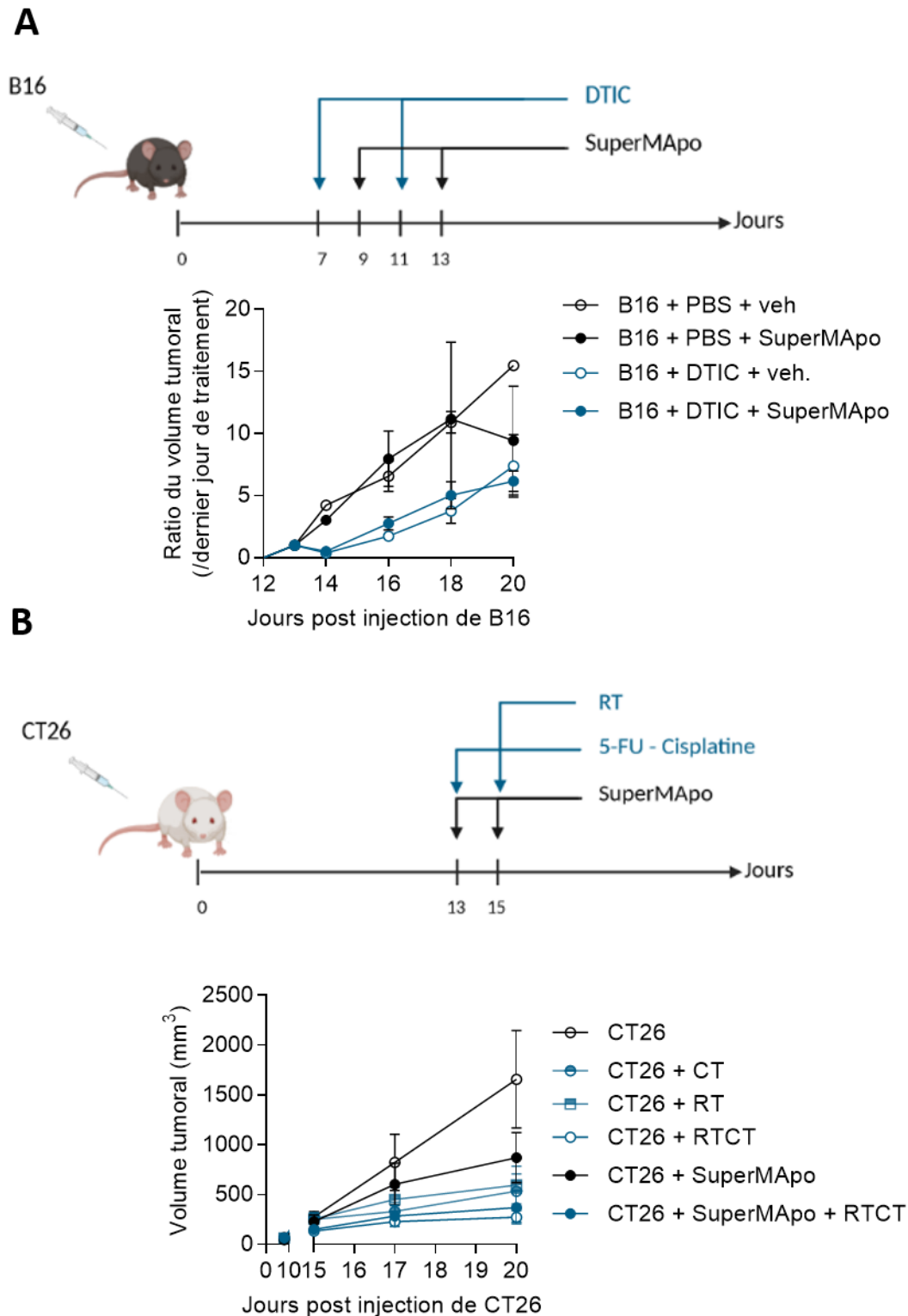
souris/groupe, $p = ns$, t test (F). Nombre de cellules CD25+ FoxP3+ (Treg) dans la tumeur, 2 expériences, 10 à 12 souris/groupe, $p = ns$, t test (G) et pourcentage de CD25+ FoxP3+ parmi les CD4+ par mm^3 de tumeur, 1 expérience, 7 à 8 souris/groupe, $p = ns$, t test (H). Pourcentage de CD11b+ Gr1+ (MDSC like) parmi les CD45+ par mm^3 de tumeur, 1 expérience, 7 à 8 souris/groupe, $* p < 0,05$, t test (I). Pourcentage de Ly6C+ parmi les CD11b+ Gr1+ (M-MDSC like) par mm^3 de tumeur, 1 expérience, 7 à 8 souris/groupe, $** p < 0,01$, t test (J). Pourcentage de Ly6G+ parmi les CD11b+ Gr1+ (G-MDSC like) par mm^3 de tumeur, 1 expérience, 7 à 8 souris/groupe, $p = ns$, t test (K). Pourcentage de PD-L1+ parmi les G-MDSC par mm^3 de tumeur (L), parmi les M-MDSC (M), 1 expérience, 7 à 8 souris/groupe, $* p < 0,05$, t test. Données en moyenne \pm SEM.

- Effet de l'association du traitement SuperMApo aux thérapies conventionnelles

Du fait de l'hétérogénéité des résultats en monothérapie, l'impact du traitement SuperMApo a été étudié en combinaison avec des thérapies conventionnelles (chimiothérapie et radiothérapie)³⁰. En effet, il a été démontré que les médiateurs pro-résolutifs spécialisés, associés à certaines chimiothérapies, permettaient d'augmenter leur efficacité en réduisant la croissance tumorale par rapport à l'utilisation de chimiothérapie seule¹⁰⁵. Ainsi, les souris C57Bl/6 ont reçu 5.10^5 cellules B16 en sous-cutané, et ont été traitées par chimiothérapie (dacarbazine, 5 mg/ml, ip) à J7 et J11, et par SuperMApo (1 mL, ip) à J9 et J13 (Figure 19A). Le traitement SuperMApo utilisé en monothérapie permet de limiter le volume de la tumeur tardivement (J20), par rapport au contrôle (Figure 19A). Les souris ayant reçu la chimiothérapie en monothérapie, ont une croissance tumorale beaucoup moins importante que les souris sans chimiothérapie, et dès les premiers jours après le traitement (Figure 19A). En effet, la taille des tumeurs des souris traitées par chimiothérapie augmente d'un facteur 5 entre le premier et le dernier jour de traitement, alors que pour le traitement SuperMApo le facteur est de 10 à 18 jours, et 9 à 18 jours. De plus, l'association de la chimiothérapie au traitement SuperMApo n'améliore pas l'effet de la chimiothérapie seule (Figure 19A). Ces résultats démontrent que le traitement SuperMApo tend à limiter la croissance tumorale tardivement, lorsqu'il est administré seul, mais que l'ajout du traitement SuperMApo à une monothérapie de dacarbazine ne permet pas d'augmenter son effet anti-tumoral. Les données obtenues pour la chimiothérapie sont déjà révélatrices d'un effet anti-tumoral drastique. L'ajout du traitement SuperMApo sur une telle réduction de croissance ne permet sans doute pas d'observer des effets supplémentaires sur la croissance tumorale. Un second modèle de combinaison a été étudié dans le but de connaître l'effet d'une association du traitement SuperMApo à la radiothérapie. Pour cela, les souris ont reçu des cellules CT26 (2.10^5 cellules), puis un traitement par chimiothérapie à J13 (5-FU à 50 mg/ml et cisplatine à 1 mg/ml en ip), et/ou radiothérapie (8 Gy) à J15, et/ou SuperMApo (1 mL, ip) à J13 et J15. Le traitement SuperMApo, utilisé en monothérapie permet de limiter légèrement le volume de la tumeur, ne dépassant pas $1000 mm^3$ contre $1500 mm^3$ à J20 pour les souris contrôles (Figure 19B). L'utilisation de chimiothérapie et de radiothérapie en monothérapie permet de limiter encore plus le

volume de la tumeur (environ 500 mm³) (Figure **19B**). Lorsque la chimiothérapie est associée à la radiothérapie, le volume des tumeurs est encore plus bas (< 500 mm³). Cependant le fait d'associer le traitement SuperMApo à la chimiothérapie et la radiothérapie, ne permet pas une réduction plus importante (Figure **19B**).

Comme pour le modèle d'association à la chimiothérapie (dacarbazine) dans le modèle de mélanome, le traitement SuperMApo associé à la RTCT ne permet pas d'augmenter les effets anti-tumoraux de ces thérapies conventionnelles. En effet, la réduction tumorale par chimio et/ou radiothérapie est déjà très marquée et de ce fait ne permettrait pas d'observer un effet supplémentaire quant à l'ajout du traitement SuperMApo. En ce sens, l'utilisation en monothérapie du traitement SuperMApo limite difficilement la croissance tumorale dans ces modèles expérimentaux de tumeurs solides. Et lorsque le traitement SuperMApo a été combiné aux thérapies anti-cancéreuses conventionnelles radio-chimio-thérapies, nous n'observons pas d'effet bénéfique de l'association thérapeutique.



- Effet du traitement SuperMApo associé au LPS

Au vu des résultats sur les modèles expérimentaux de tumeurs solides et l'association des thérapies, la question était de savoir si les modèles étaient suffisamment inflammatoires pour souhaiter prétendre à une réponse anti-tumorale du traitement SuperMApo. Pour cela, un modèle de tumeurs solides artificiellement rendu inflammatoire par l'injection de LPS (lipopolysaccharides) a été utilisé¹²⁰⁻¹²⁴. Dans un premier temps, le modèle a été mis au point dans le but d'obtenir une promotion tumorale par l'injection de LPS. Les cellules B16-OVA-luc (5.10^6 cellules) ont été injectées en sous cutanés à J0 aux souris C57Bl/6 ayant reçu du LPS 18h avant ou en co-injection. Le suivi de la progression tumorale a été évalué par mesure de la tumeur. Les souris pour lesquelles l'injection de LPS s'est faite avant les cellules cancéreuses, présentent un volume tumoral légèrement plus important par rapport à celle n'ayant pas reçu de LPS (Figure **20A**). Lorsque le LPS est injecté au même moment que les cellules cancéreuses (co-injection), l'augmentation du volume tumoral semble légèrement moins forte par rapport à l'injection 18h avant les cellules cancéreuses (Figure **20A**). Ces résultats suggèrent que l'injection de LPS en sous cutané (18h avant ou en co-injection des cellules cancéreuses) permettrait d'augmenter la progression tumorale. Ces observations pourraient être dues à une augmentation locale de l'inflammation, qui pourrait enrichir la croissance tumorale. Dans le but de déterminer si le LPS pouvait générer une plus forte progression tumorale, un second modèle a été étudié avec cette fois l'injection des cellules en intraveineux. La progression tumorale a été évaluée par injection de luciférine et par la détection de bioluminescence. Le LPS injecté 18h avant, ou en même temps, a été administré en systémique par voie intrapéritonéale. Pour ce type de modèle, l'injection au préalable du LPS n'augmente pas plus la radiance que par rapport aux souris contrôles, mais la progression tumorale se comporte de la même manière (Figure **20B**). Au contraire, l'injection concomitante de LPS aurait plutôt tendance à limiter la progression tumorale au cours du temps (Figure **20B**). Ces résultats suggèrent que quelque soit le modèle utilisé, l'injection simultanée de LPS aux cellules cancéreuses ne semble pas induire plus de progression tumorale, alors que l'injection plus précocement (18h avant les cellules cancéreuses) permet légèrement d'augmenter la progression tumorale au cours du temps. Les résultats variant entre effet du LPS et voie d'injection des cellules cancéreuses pourraient être dus au fait que l'injection systémique serait moins relevant du fait d'une plus forte dilution du LPS dans l'organisme. Alors que l'injection en sous cutané, localement aux cellules cancéreuses, pourrait recruter localement les cellules immunitaires. Dans le but de confirmer les données en sous cutané, la même expérience a été réalisée avec l'injection de LPS 18h avant les cellules cancéreuses B16. L'injection de LPS avec la lignée B16 permettrait également une légère augmentation du volume de la tumeur (Figure **20C**). Dans le but de déterminer si ce modèle pouvait être associé à un modèle

« inflammatoire », des cytokines pro-inflammatoires ont été dosées dans le sécrétome de 24h de la tumeur prélevée à J10 (2.5 mg/mL). Les quantités détectées d'IFN- γ et de TNF- α très faibles, ne permettent pas de déterminer si les tumeurs pour lesquelles les souris ont été injectées par LPS 18h avant les cellules cancéreuses augmente leur sécrétion (Figure **20D**). En revanche, une forte concentration d'IL-6 dans les sécrétome 10 jours après l'injection des cellules cancéreuses a été observée et cette forte concentration d'IL-6 est plus importante lorsque les souris ont reçu du LPS. Ces données suggèrent que le LPS induirait potentiellement un environnement inflammatoire plus important à l'origine d'une légère augmentation tumorale (Figure **20D**). Suite à ces résultats, le modèle sous cutané avec injection 18h avant les cellules cancéreuses, a été utilisé pour étudier les effets des facteurs pro-résolutifs sur la croissance tumorale dans un modèle proposé comme « plus inflammatoire ». Afin de déterminer l'effet direct d'une inflammation potentiellement pro-tumorale, les souris ont reçu le traitement SuperMApo à J0 et J2 (1 mL, ip). Dans cette expérience, le LPS seul n'induit pas une plus forte croissance tumorale que les souris ayant reçu le traitement contrôle comparativement à ce qu'il avait été observé dans les précédentes expériences (Figure **20E**). Le traitement SuperMApo, seul, n'a quant à lui, dans cette expérience, aucun impact sur la croissance tumorale par rapport aux souris contrôles. Néanmoins, lorsque SuperMApo est associé au LPS, le traitement induit une augmentation de la croissance tumorale par rapport au LPS seul (Figure **20E**). Ces données suggèrent, qu'effectivement le traitement SuperMApo pourrait être lié à l'inflammation dans son action sur la progression tumorale. Cependant, ici, le traitement ne limite pas la croissance mais l'augmente. Ces données préliminaires demanderaient à être confirmées par un plus grand nombre d'expériences.

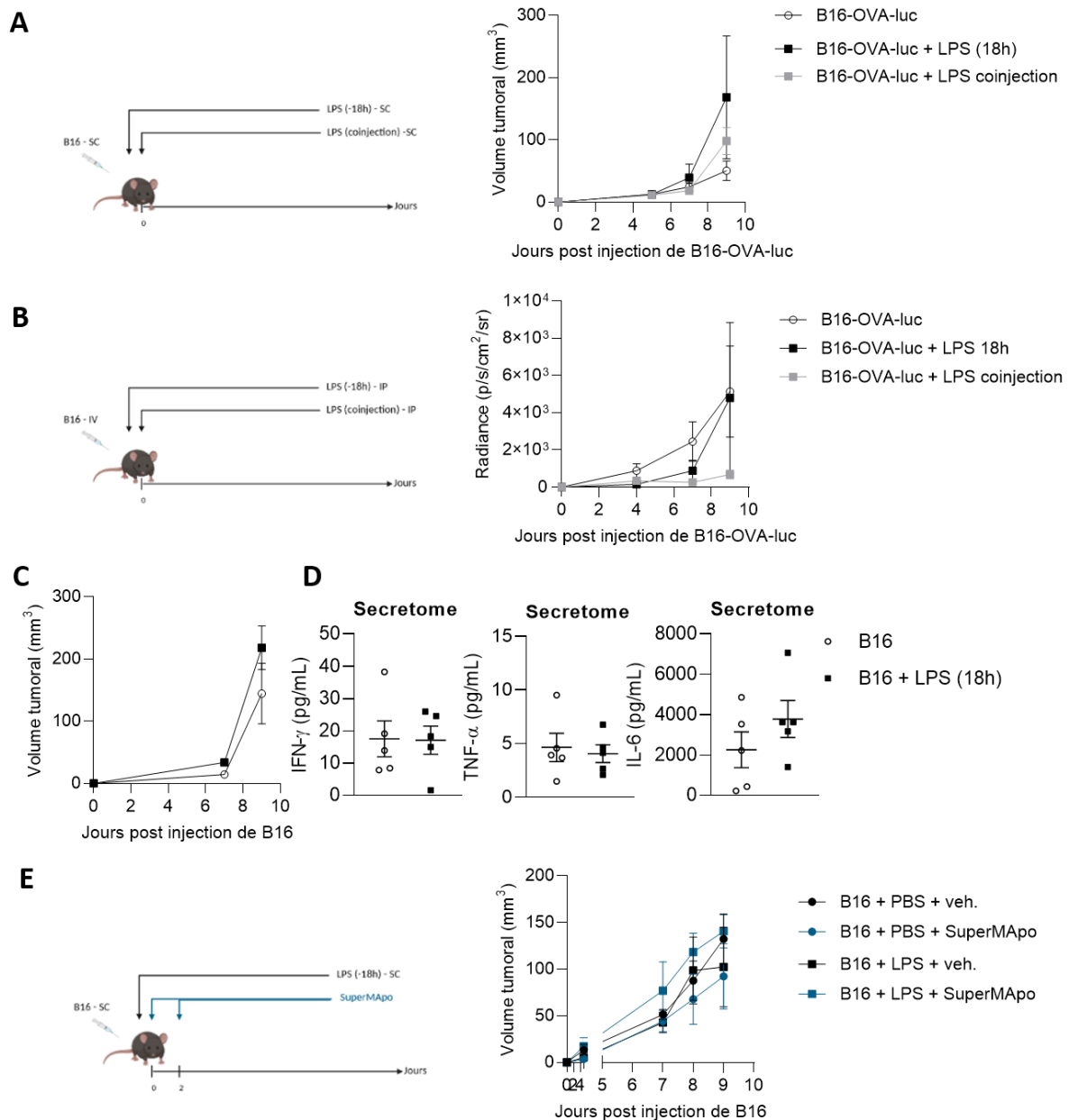


Figure 20. Effet du traitement SuperMApo sur la croissance tumorale de B16 chez des souris C57Bl/6 injectées en LPS. La croissance des tumeurs a été évaluée par mesure 3 fois par semaine après injection de LPS en sous cutané (500 ng/souris) 18h avant l'injection des B16-OVA-luc, en sous cutané (5.10^5 cellules/souris) ou en co-injection, 5 souris/groupe ; 1 expérience ; $p = ns$ One-Way Anova Test + Dunn's post test (A). La progression tumorale a été évaluée 3 fois par semaine après injection de LPS en intrapéritonéal (500 ng/souris), 18h avant l'injection des B16-OVA-luc en intraveineux (5.10^5 cellules/souris) ou en injection concomitante, 5 souris/groupe ; 1 expérience ; $p = ns$ One-Way Anova Test + Dunn's post test (B). LPS en sous cutané (500 ng/souris) 18h avant l'injection des B16 en sous cutané (5.10^5 cellules/souris), 10 souris/groupe ; $p = ns$, t test (C). Dosage d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-6 en ELISA sur le sécrétome (24h) de tumeurs prélevées à J10 (2,5 mg/mL), 5 souris/groupe ; 1 expérience ; $p = ns$, t test (D). LPS en sous cutané (500 ng/souris) 18h avant l'injection des B16 en sous cutané (5.10^5 cellules/souris) et les souris ont été traitées par SuperMApo en intrapéritonéal (1 mL) à J0 et J2, 4 à 5 souris/groupe ; 1 expérience ; $p = ns$; Two-Way Anova Test + Tukey post test (E). Données en moyenne \pm SEM.

Dans ce contexte de promotion tumorale par le traitement SuperMApo, les populations cellulaires ont été étudiées au sein de la tumeur, 10 jours après l'injection des cellules cancéreuses. Comme dans les

modèles de tumeurs solides seules (Figure 18) il avait été observé que le traitement SuperMApo pouvait potentiellement induire plus de cellules myéloïdes suppressives. Les cellules myéloïdes ont alors été étudiées par cytométrie en flux. D'une manière générale, l'injection de LPS aurait tendance à limiter le nombre de cellules myéloïdes dans la tumeur (Figure 21A-D). En revanche, cette observation n'est pas valable pour les « G-MDSC » (Ly6G+ CD11b+) (Figure 21E). Le traitement SuperMApo seul n'impacte pas ces populations (Figure 21A-C). Le traitement SuperMApo associé au LPS n'a pas d'impact sur le nombre de cellules myéloïdes (CD11b+), de cellules dendritiques (CD11c+) ni sur les cellules myéloïdes matures (CD11b+ IAIE+) (Figure 21A-C). Dans ce contexte, les lymphocytes T présents au sein de la tumeur ont également été étudiés. De manière générale le LPS n'induit pas un plus grand nombre de lymphocytes T CD8+ et CD4+ (Figure 21F,G), ni de LT effecteurs Tc1 et Th1 (Figure 21H,I). Les souris traitées par SuperMApo sans LPS ont tendance à voir leur nombre de lymphocytes T CD8+ et lymphocytes T effecteurs Tc1 diminués dans la tumeur par rapport aux souris contrôles sans LPS (Figure 21F,H). Cette observation n'est en revanche pas valable pour les souris traitées SuperMApo avec LPS.

Ces différents résultats suggèrent que le LPS n'induit pas plus de cellules immunitaires innées dans la tumeur mais au contraire tendrait à les diminuer.

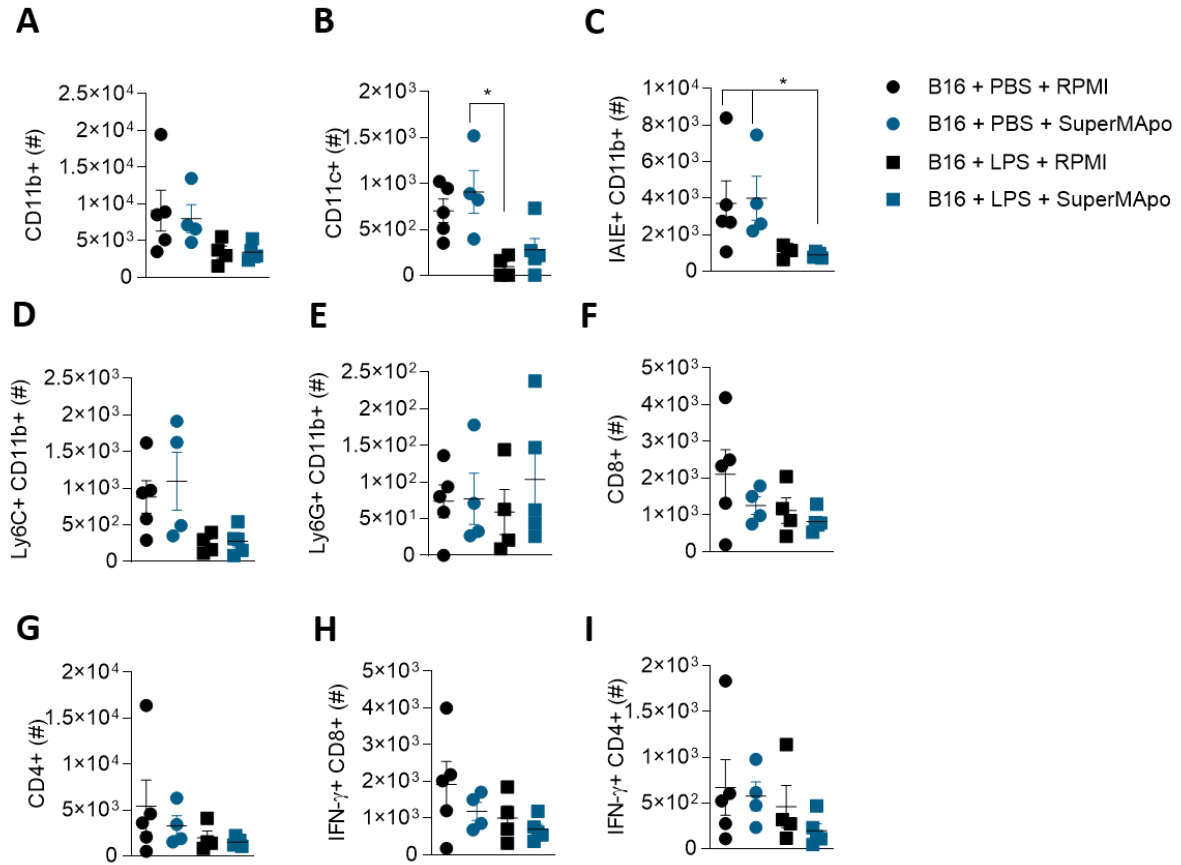


Figure 21. Effet du traitement SuperMApo sur les cellules immunitaires de la tumeur chez des souris C57Bl/6 injectées en LPS. Les cellules infiltrant la tumeur ont été étudiées par cytométrie en flux, 10 jours après l'injection des B16 (LPS en sous cutané, 500 ng/souris, 18h avant) à $5 \cdot 10^5$ cellules/souris et les souris ont été traitées par SuperMApo en intrapéritonéal (1 mL) à J0 et J2. Nombre de CD11b+ (A), CD11c+ (B), IAIE+ CD11b+ (C), Ly6G+ CD11b+ (M-MDSC like) (D), Ly6G+ CD11b+ (G-MDSC like) (E), CD8+ (F), CD4+ (G), IFN- γ + CD8+ (H), IFN- γ + CD4+ (I), 4 à 5 souris/groupe ; 1 expérience ; * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ One-Way Anova test + Dunn's post test ; données en moyenne \pm SEM.

B. Induction spontanée de tumeurs du côlon

Du fait de la faible, et peu reproductible, réponse anti-tumorale du traitement SuperMApo dans les différents modèles de tumeurs solides à partir de greffes de cellules cancéreuses en sous cutanées, un autre modèle de tumeurs solides a été étudié. Ce modèle a été mis en place dans le but d'étudier le développement de tumeurs induites par inflammation : un modèle de tumeurs solides se développant de manière spontanée après l'injection d'un agent mutagène et de l'exposition à un médiateur inflammatoire^{24, 117, 118}. Ce modèle se rapproche au plus près des cas cliniques, qui, bien souvent montrent une association entre maladies inflammatoires de l'intestin et développement de cancers^{22, 125, 126}. Dans les cas de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, le traitement SuperMApo a montré un réel intérêt bénéfique dans le traitement de ces pathologies^{115, 116}. Le modèle d'induction spontanée de tumeurs du côlon se base sur l'initiation tumorale induite par l'injection d'AOM (azoxyméthane) et à l'exposition au DSS (*Dextran Sulfate Sodium*) dans l'eau de boisson des souris,

pendant 3 cycles de 1 semaine (Figure **22A**). Ce modèle permet le développement de tumeurs au niveau du côlon des souris (Figure **22B**). Le suivi du développement tumoral est permis grâce à l'exploration par vidéos endoscopiques et par l'établissement d'un score des tumeurs suivant leur nombre et la taille définie par l'obstruction de la lumière intestinale par les tumeurs¹¹⁸. L'établissement du nombre de tumeurs et de leur taille a été réalisé le plus possible en double aveugle. Dans ce modèle, le traitement SuperMApo a été administré (1 mL, répété à 48h, ip) avant les cycles de DSS, soit à J0, ou à J21, ou à J52, en prévention des cycles de DSS. Le traitement préventif à J0 semble ralentir l'apparition des premières tumeurs, jusqu'à 60 jours après le traitement (Figure **22C gauche**). Cette observation est également valable pour la taille cumulée des tumeurs de chaque souris (Figure **22C milieu**). Lorsque cette taille est moyennée par rapport au nombre de tumeurs, le traitement SuperMApo semble également limiter la taille moyenne des tumeurs à partir de 48 jours mais ne perdure pas dans le temps (Figure **22C droite**). L'infléchissement des courbes pour les souris contrôles pourrait être dû à la mortalité associée au fort développement tumoral, mais également au fait qu'à partir de 60 jours la taille et le nombre de tumeurs limitent l'exploration complète et précise du côlon des souris. Lorsque le traitement SuperMApo est administré au moment du second cycle de DSS (J21), aucun effet n'est observé sur le nombre de tumeurs, ni pour la taille cumulée des tumeurs ou la taille moyenne des tumeurs (Figure **22D**). Au contraire, le traitement SuperMApo aurait tendance à augmenter la taille moyenne des tumeurs. De manière surprenante par rapport à ces résultats, lorsque le traitement SuperMApo est administré au moment du 3^{ième} cycle de DSS, correspondant à J52, le traitement SuperMApo semble réduire le nombre de tumeurs à partir de 60 jours (Figure **22E gauche, F**). Et de manière intéressante, le traitement SuperMApo à J52 limite également la taille cumulée des tumeurs par souris, avec un plateau entre 60 et 70 jours (Figure **22E milieu, F**). Si la taille cumulée des tumeurs est moyennée par rapport au nombre de tumeurs, le traitement SuperMApo limite également la taille moyenne d'une tumeur mais ne perdure pas dans le temps (Figure **22E droite, F**).

Ainsi, dans ce modèle de tumeurs solides induites spontanément par inflammation et agent mutagène, le traitement SuperMApo semble avoir un effet sur le nombre de tumeurs mais également sur leur taille, à un temps préventif et tardif d'administration.

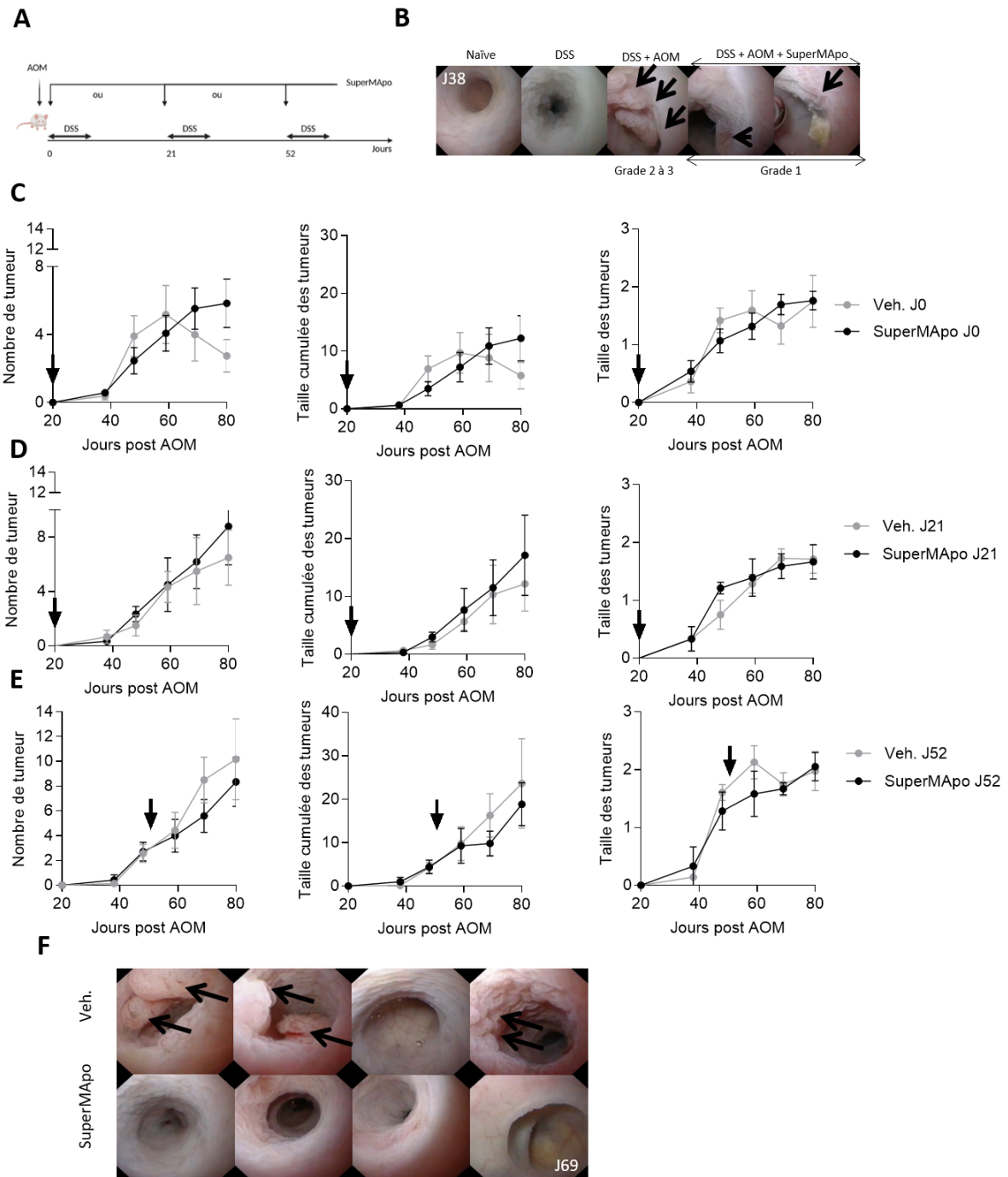


Figure 22. Effet du traitement SuperMApo sur le développement de tumeurs du côlon de souris BALB/c. Les souris ont été injectées d'azoxymethane en intrapéritonéal (10 mg/kg) à J0, et le DSS (1%) a été ajouté à l'eau de boisson des animaux pendant 3 cycles de 1 semaine (1^{ère}, 3^{ème}, 8^{ème} semaine) (A). Le développement des tumeurs a été suivi par vidéos endoscopiques toutes les 2 semaines pendant 3 mois, par dénombrement et par évaluation de la taille (score de 1 à 5) (B). Les souris ont été traitées par SuperMApo à J0 et J2 en intrapéritonéal (1 mL) : 2 expériences (C), à J21 et J23 : 1 expérience (D), à J52 et J54 : 1 expérience (E, F) ; 3 à 14 souris/groupe ; données en moyenne \pm SEM ; $p = ns$, t test.

Dans le but, à J52, de déterminer si les populations lymphocytaires étaient modulées par le traitement SuperMApo à l'origine d'une réponse anti-tumorale, les cellules des ganglions mésentériques et du côlon ont été extraites et étudiées par cytométrie en flux à J99. Lorsque les souris ont été traitées par

SuperMApo, 52 jours après l'injection d'AOM, le pourcentage de leucocytes CD45+ diminue par rapport aux souris contrôles, dans les ganglions mésentériques (Figure **23A**). Cette diminution de cellules CD45+ peut être due à une diminution des lymphocytes T CD4+ et CD8+, dont le pourcentage parmi les CD45+ diminue significativement (Figure **23A**). Cependant, cette diminution des lymphocytes T n'affecte pas le pourcentage de lymphocytes T effecteurs Th1 (CD4+ IFN- γ +) et de Tc1 (CD8+ IFN- γ), ni les Treg (CD25+ FoxP3+) (Figure **23A**). En revanche il apparaît comme les lymphocytes T, que le pourcentage de cellules myéloïdes (CD11b+) parmi les cellules CD45+ diminue également dans les ganglions mésentériques pour les souris traitées par SuperMApo 52 jours post AOM (Figure **23A**). Ces résultats suggèrent un apport moins important dans l'infiltration des ganglions mésentériques tant en lymphocytes qu'en cellules myéloïdes. De ce fait, les mêmes populations cellulaires ont été étudiées dans le côlon, dans le but de déterminer si cette diminution était due à une infiltration des cellules immunitaires au niveau local des tumeurs. Dans le côlon, le pourcentage de cellules CD45+ diminue également après traitement par SuperMApo (Figure **23B**). Cette diminution pourrait être également due à une diminution des lymphocytes T CD4+ de manière non significative mais pas pour les lymphocytes T CD8+ (Figure **23B**). Tout comme pour les ganglions mésentériques, cette diminution n'impacte pas le pourcentage de lymphocytes T effecteurs Th1 (CD4+ IFN- γ +) et de Tc1 (CD8+ IFN- γ +) (Figure **23B**). Aucune différence n'est observable pour le pourcentage de Treg (CD25+ FoxP3+) (Figure **23B**). Dans les ganglions mésentériques les cellules CD11b+ avaient tendance à diminuer. Cette tendance n'est pas retrouvée en revanche dans le côlon (Figure **23B**).

Ainsi, dans ce modèle d'induction de tumeurs solides du côlon, le traitement SuperMApo semble diminuer l'initiation et la progression du cancer. Ces résultats semblent associés à un plus faible pourcentage de cellules dans les ganglions mésentériques. Les données cellulaires du traitement à J0 n'ont pas été représentés ici, mais sont concordantes aux données du traitement à J52 présentées (Figure **23**). Ces données ne permettent pas de conclure quant à l'effet anti-tumoral du traitement, pour cela une étude plus rapprochée du temps de traitement aurait été nécessaire.

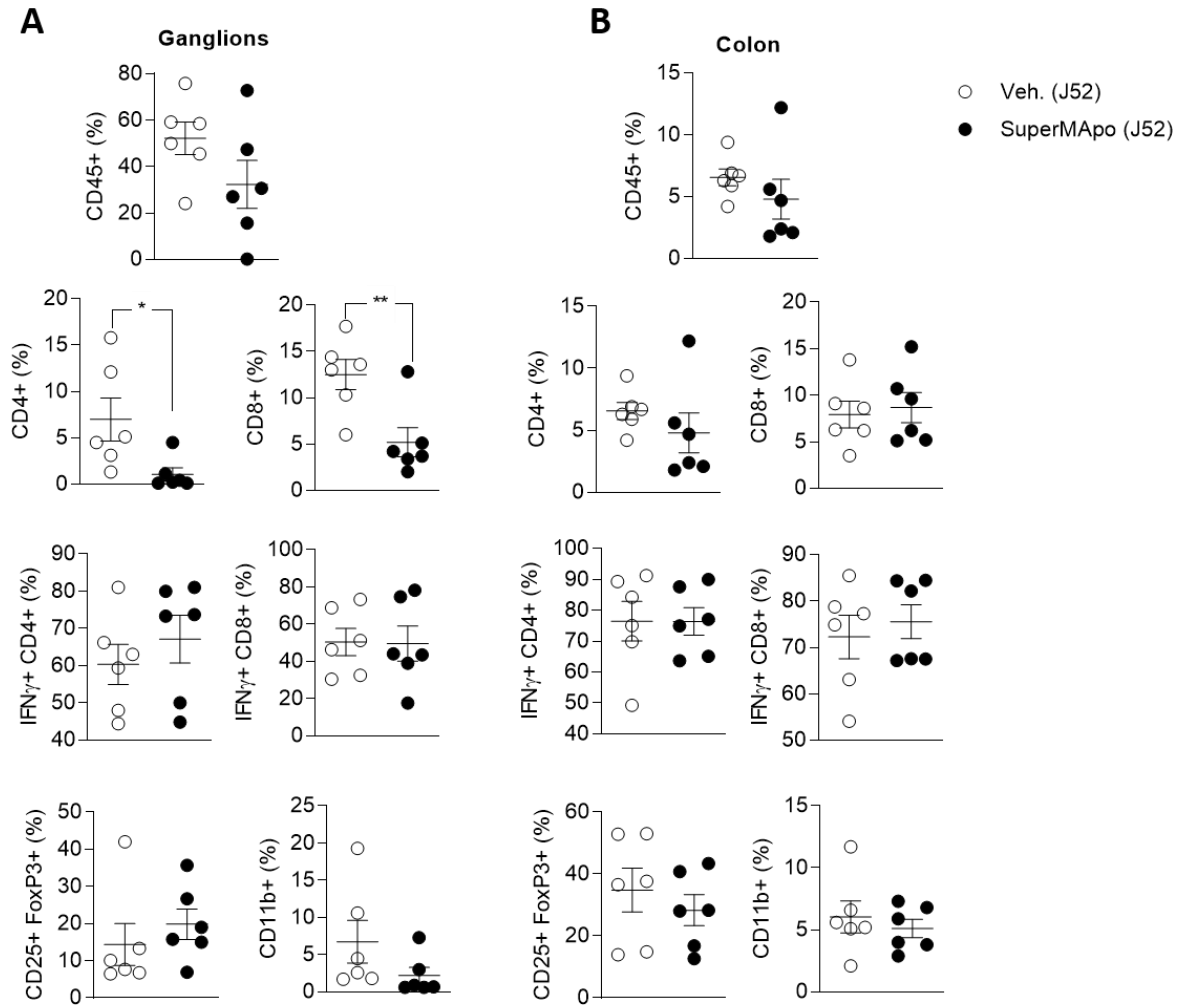


Figure 23. Effet du traitement SuperMApo sur les cellules immunitaires 45 jours post traitement chez les souris BALB/c ayant développé spontanément des tumeurs du côlon. Les souris ont été injectées d'azoxymethane en intrapéritonéal (10 mg/kg) à J0, et le DSS (1 %) a été ajouté à l'eau de boisson des animaux pendant 3 cycles de 1 semaine (1^{ère}, 3^{ème}, 8^{ème} semaine) et traitées par SuperMApo à J52 et J54 en intrapéritonéal (1 mL). Les cellules extraites des ganglions mésentériques (A) et du côlon (B) ont été étudiées par cytométrie. Le pourcentage de CD4+, CD8+ et de CD11b+ a été défini parmi les CD45+, les CD25+ FoxP3+ parmi les CD4+, et l'IFN- γ + parmi les CD4+ et les CD8+. 1 expérience, 6 souris/groupe, données en moyenne \pm SEM ; * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$, t test.

Conclusion – Modèles de tumeurs solides.

Les modèles expérimentaux de cancers solides, étudiés dans ce projet, ont montré une certaine hétérogénéité de réponse face au traitement, par l'injection de facteurs pro-résolutifs, SuperMApo. Des effets anti-tumoraux potentiels ont été mis en avant dans certains cas de tumeurs induites par l'injection de cellules cancéreuses et par l'induction de tumeurs spontanées médiée par agent mutagène et inflammation. Ces effets anti-tumoraux pourraient être dus à une réponse lymphocytaire. Cependant l'étude des populations myéloïdes démontre que la réponse au traitement pourrait être contournée par un environnement immunosuppresseif. Ces résultats hétérogènes pourraient également être dus à l'accessibilité du traitement dans ces modèles solides. En effet, le traitement

SuperMApo est administré au niveau systémique, par voie intrapéritonéale. L'étude de ces modèles concerne des tumeurs solides, ainsi les facteurs pro-résolutifs pourraient induire un effet systémique peut retrouver au sein de la tumeur primaire et ne permettrait pas une réponse anti-tumorale systématique, au niveau du microenvironnement tumoral.

2. Modèles de tumeurs liquides

Du fait des résultats assez aléatoires quant à l'effet anti-tumoral du traitement par facteurs pro-résolutifs des tumeurs solides, l'étude s'est orientée sur l'utilisation de modèles de cancers liquides. Au vu de la voie d'injection (ip) du traitement, la biodisponibilité des facteurs pro-résolutifs pourrait être impacté, à l'origine du faible effet anti-tumoral observé et de l'hétérogénéité des résultats dans les modèles solides. Pour cela l'effet du traitement SuperMApo a été étudié dans le contexte de deux modèles qualifiés de modèles « liquides » : un consistant en l'injection des lignées en intraveineux et l'autre en intrapéritonéal.

A. Greffes de lignées cancéreuses en intraveineux

Afin d'étudier l'effet du traitement pro-résolutif sur la formation de métastases, le développement de métastases de manière « artificielle », consistant en l'injection des B16 en intraveineux (5.10^5 cellules), a été étudié. Ce type de modèle est peu représentatif du développement des métastases en clinique³⁴. En effet l'injection directe des cellules cancéreuses en systémique induit la colonisation des organes, ici du poumon, et la formation de métastases, et non à partir d'une tumeur primaire à l'origine d'une extravasation des cellules cancéreuses. De plus, l'étude de ce type de modèle se réalise sur une courte période, du fait de la puissance du modèle associée à une forte mortalité. En effet, le principe même du développement de métastases en clinique s'effectue sur une longue période. Cependant il n'existe actuellement très peu de modèles expérimentaux de métastases. Les modèles actuels les plus représentatifs sont des modèles de greffes ectopiques, orthotopiques, ou des modèles génétiquement modifiés¹²⁷⁻¹²⁹. Dans ce modèle les souris ont été traitées en préventif (J0) ou en curatif (J7) par le traitement SuperMApo (1 mL, ip, répété à 48h). Quatorze jours après l'injection des cellules cancéreuses, les poumons ont été extraits et le dénombrement des colonies de B16 ont été réalisées et mesurées. Le traitement SuperMApo, administré en préventif n'aurait pas d'impact sur le nombre de métastases pulmonaires (Figure **24A gauche**). Le traitement plus tardif (J7) ne semble également pas impacter le nombre de métastases mais aurait même plutôt tendance à induire un plus grand

nombre de colonies métastatiques (Figure **24B gauche**). De plus, peu d'impact du traitement est observable sur la taille des métastases (Figure **24A, B droite**). Ces résultats suggèrent que le traitement par facteurs pro-résolutifs n'aurait pas d'impact sur la colonisation métastatique du poumon pour ce modèle.

De ce fait, un second modèle de tumeurs dites « liquides » a été étudié. En effet, la lignée B16 reste une lignée de mélanome c'est-à-dire une lignée adhérente dite « solide ». La lignée EL4-luc, elle, étant une lignée non adhérente issue de lymphome T, a été étudiée. Pour cela les EL4 ont été injectées à J0 en intraveineux (1.10^6 cellules). Le développement tumoral a été évalué au cours du temps par injection de luciférine (15 mg/mL) et la détection des cellules cancéreuses a été suivie par bioluminescence. Les souris ont été traitées par SuperMApo (1 mL répété à 48h, ip) au moment de la détection par bioluminescence des cellules cancéreuses. Lorsque les souris ont été traitées par SuperMApo, la progression tumorale, définie par la moyenne de radiance, semble diminuer à partir de 24 jours (Figure **24C, D**). Ces résultats suggèrent que le traitement SuperMApo pourrait avoir un effet potentiel dans les cancers liquides, avec la lignée EL4.

Dans le but d'étudier l'impact des effets du traitement SuperMApo, à différents temps de la progression tumorale, le traitement a été administré suivant différentes modalités. Pour cela, soit le traitement a été administré en préventif c'est-à-dire à J0, soit en curatif, à J7, ou en continu pendant la première semaine de croissance tumorale, ou en continu sur 3 semaines. Le traitement SuperMApo dans ce modèle, lorsqu'il est administré, ponctuellement, à J0 ou à J7, permettrait de limiter la croissance tumorale de manière non significative (Figure **24E**). Cependant il s'avère que lorsque l'expérience, avec la modalité de traitement 7 jours après les cellules cancéreuses, a été réalisée une seconde fois, l'effet du traitement n'était pas retrouvé (Figure **24F**). La stratégie a donc été d'étudier plusieurs injections, pour observer l'effet d'un traitement prolongé. La première modalité a été un traitement en continu pendant 3 semaines (toutes les 48h, 1 mL/injection, Vt = 10 mL, ip). Les souris ayant reçu le traitement SuperMApo, en continu, ont une progression tumorale plus importante que les souris ayant reçu le traitement contrôle (Figure **24G**). Suite à ces résultats, la fenêtre d'administration en continu a été réduite entre le 1^{er} et le 7^{ième} jour (toutes les 48h, 1 mL/injection, Vt = 4 mL, ip), jours pour lesquels, le traitement SuperMApo avait semblé montrer des effets sur la progression tumorale (Figure **24E**). Pour cette modalité de traitement, les souris ayant reçu le traitement SuperMApo n'ont plus une progression tumorale plus importante que les souris contrôles, mais aucun effet anti-tumoral n'est observable pour une semaine de traitement (Figure **24H**).

Ces résultats semblent suggérer que le traitement SuperMApo paraît induire un effet anti-tumoral sur la croissance des cancers liquides (intraveineux), lorsqu'il est administré ponctuellement, mais non de manière répétée. Cependant, cet effet reste peu reproductible.

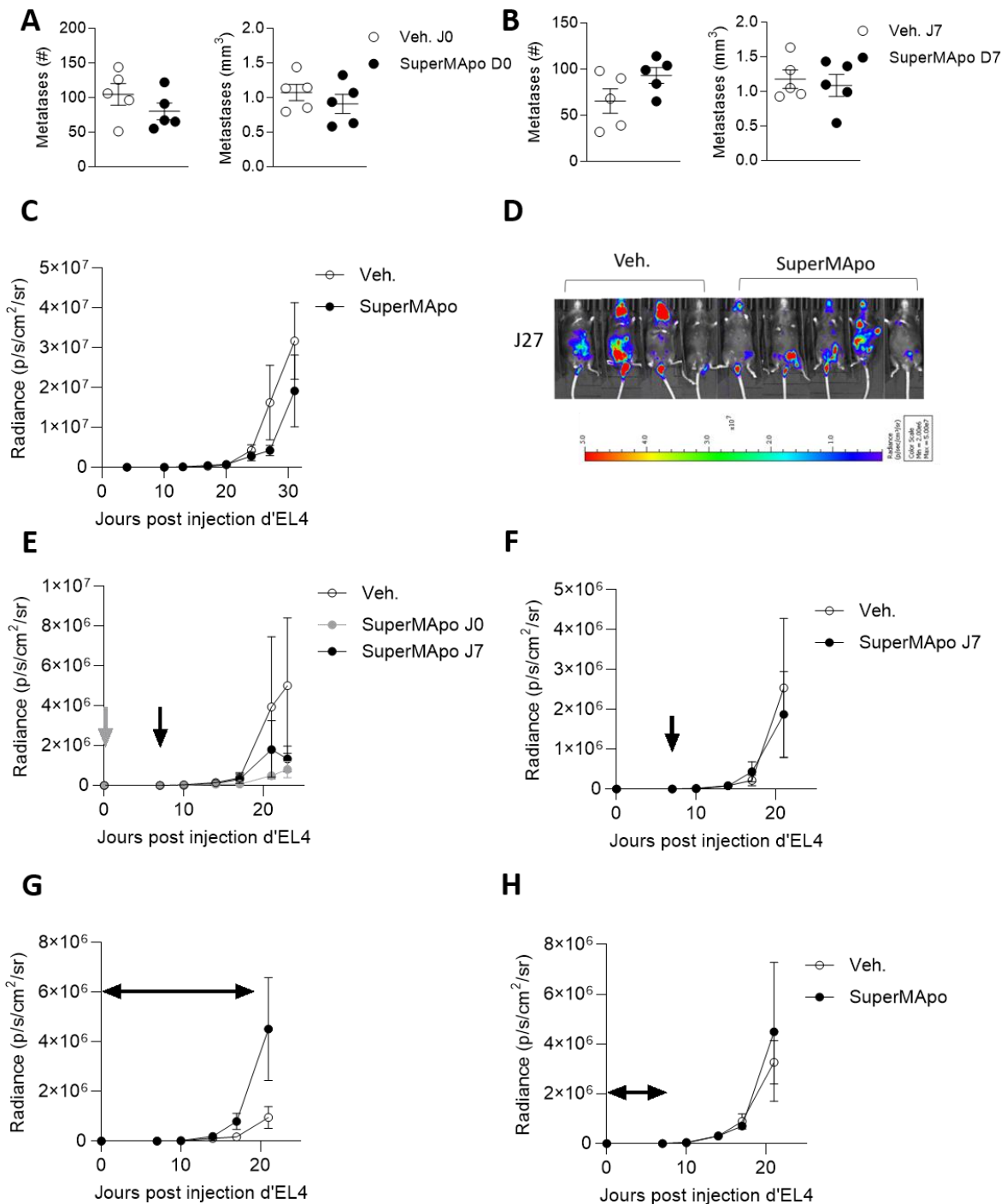


Figure 24. Effet du traitement SuperMApo sur la croissance de tumeur liquide (intraveineux). Le nombre et le volume des métastases pulmonaires (B16-OVA, i.v., 5.10e5 cellules/souris) a été évalué à J13 après traitement par SuperMApo® (1 mL, i.p. renouvelé à 48 h) à J0 (A), ou à J7 (B) 1 expérience, 5 souris/groupe ; $p = ns$, t test. La progression tumorale des cellules injectées en intraveineux (EL4-luc, 1.10e6 cellules/souris) a été évaluée après traitement par SuperMApo® à la détection de

la bioluminescence (1 mL, i.p. renouvelé à 48 h) ; $n \geq 4$ souris/groupe ; $p = ns$; t test ; 1 expérience unique (**C,D**), ou après traitement par SuperMApo® à J0 ou J7 (1 mL, i.p. renouvelé à 48 h), 1 expérience, 5 souris/groupe, $p = ns$, One-Way Anova Test + Bonferroni's post test (**E**), après traitement par SuperMApo® à J7 (1 mL, i.p. renouvelé à 48 h), 2 expériences, 10 souris/groupe, $p = ns$, t test (**F**), ou pendant 3 semaines (soit 10 injections pour un volume total de 10 mL), 1 expérience, 5 souris/groupe ; $p = ns$, t test (**G**), ou pendant la première semaine de croissance (soit 4 injections pour un volume total de 4 mL), 1 expérience, 5 souris/groupe ; $p = ns$, t test (**H**). Données en moyenne \pm SEM.

Lorsque le traitement SuperMApo est administré ponctuellement à J0, ou J7 ou au moment de la détection de la bioluminescence, celui-ci semble limiter la progression tumorale pour une expérience. L'étude des cellules extraites des ganglions inguinaux a été réalisé dans le but d'étudier les populations lymphocytaires suite au traitement SuperMApo. Lorsque le traitement est administré au moment de la détection de bioluminescence aucune différence n'est observable pour les souris traitées par SuperMApo par rapport aux souris contrôles, quant au nombre de lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Figure **25A**). Cependant il est possible d'observer une légère tendance à la diminution pour les lymphocytes T effecteurs Th1 (CD4+ IFN- γ +) et Treg (CD25+ FoxP3+) (Figure **25A**). Le même profil lymphocytaire a été étudié pour le traitement à J0 ou J7, cependant aucune différence n'est observable (Figure **25B**).

Ces résultats suggèrent que le traitement pourrait avoir un effet anti-tumoral en permettant d'induire une réponse lymphocytaire. Cependant ces données ne sont pas statistiquement significatives. Le prélèvement de sang et l'étude des lymphocytes T circulants auraient permis d'observer si les lymphocytes T migraient des organes lymphoïdes secondaires à la tumeur.

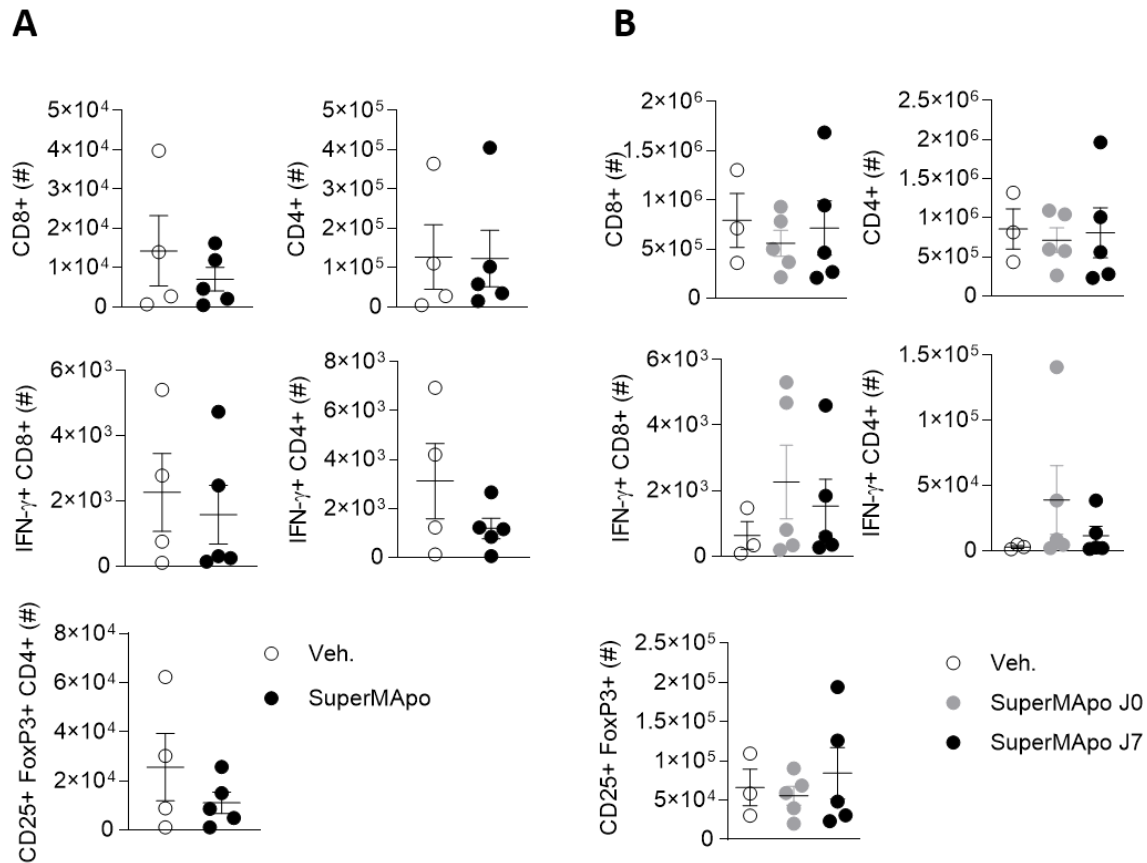


Figure 25. Effet du traitement SuperMApo sur le nombre de lymphocytes T dans les ganglions inguinaux dans le modèle de tumeur liquide (intraveineux). Le nombre de cellules lymphocytaires a été évalué 21 jours après l'injection des EL4 en intraveineux (1.10^6 cellules) chez des souris C57Bl/6 traitées par SuperMApo (1 mL, i.p. renouvelé à 48 h) au moment de la détection de bioluminescence, $n \geq 4$ souris/groupe ; $p = ns$; t test ; 1 expérience (A), ou à J0 ou J7, 1 expérience, 5 souris/groupe, $p = ns$, One-Way Anova Test + Bonferroni's post test (B). Le nombre de CD4+, CD8+, IFN- γ + CD4+, IFN- γ + CD8+, CD25+ FoxP3+, a été déterminé par cytométrie en flux. Données en moyenne \pm SEM.

B. Greffes de lignées cancéreuses en intrapéritonéal

Le traitement SuperMApo dans les modèles expérimentaux de cancers liquides, pour des cellules cancéreuses injectées par voie intraveineuse, semble démontrer un effet sur la progression tumorale, suivant des modalités d'administration ponctuelle. Cependant aucune différence notable était observable dans les organes lymphoïdes secondaires quant aux populations de leucocytes. C'est pour cette raison que le modèle de tumeurs liquides par injection des cellules cancéreuses en intrapéritonéale a été étudié. En effet, ce type d'injection pourrait permettre d'induire une inflammation locale au niveau du péritoine et en ce sens être un modèle plus inflammatoire que le modèle intraveineux. De plus l'étude du lavage péritonéal permet d'étudier l'environnement tumoral direct. Pour cela, les cellules EL4 ont été injectées en intrapéritonéal (2.10^6 cellules), et les souris ont été traitées soit à J0 ou à J7 en intrapéritonéal avec SuperMApo (1 mL, renouvelé à 48h). Le suivi de la

progression tumorale a été évalué par injection de luciférine 1 à 2 fois par semaine (15 mg/mL). Lorsque le traitement SuperMApo est administré à J0, aucun effet n'est observé sur la progression tumorale (**Figure 10A**). Au contraire dans ce modèle, le traitement aurait plutôt tendance à augmenter la progression tumorale. En revanche, lorsque le traitement est réalisé 7 jours après les cellules cancéreuses, celui-ci permet de limiter drastiquement la progression tumorale (**Figure 26B, C**). Ainsi nous pouvons encore une fois émettre l'hypothèse que le traitement SuperMApo administré de manière curative, permet de limiter la croissance tumorale, comme pour le modèle d'injection des cellules cancéreuses en intraveineux (**Figure 24**).

Conclusion – Modèles de tumeurs liquides.

Les modèles expérimentaux de cancers liquides, étudiés dans ce projet, ont montré une certaine réponse face au traitement SuperMApo comparativement aux modèles de tumeurs solides. Les modalités de traitement relatives à une réponse anti-tumorale ont également pu être mis en avant. En effet, l'injection répétée des facteurs pro-résolutifs, semblent induire la progression tumorale. En revanche des injections ponctuelles à J7 permettraient de limiter la progression tumorale. Ces observations ont été réalisées pour une injection des cellules cancéreuses par voie intraveineuse (effet peu reproductible) mais de manière plus marquée pour la voie intrapéritonéale. En revanche aucune population immunitaire n'a pu être liée à cet effet anti-tumoral pour le modèle intraveineux.

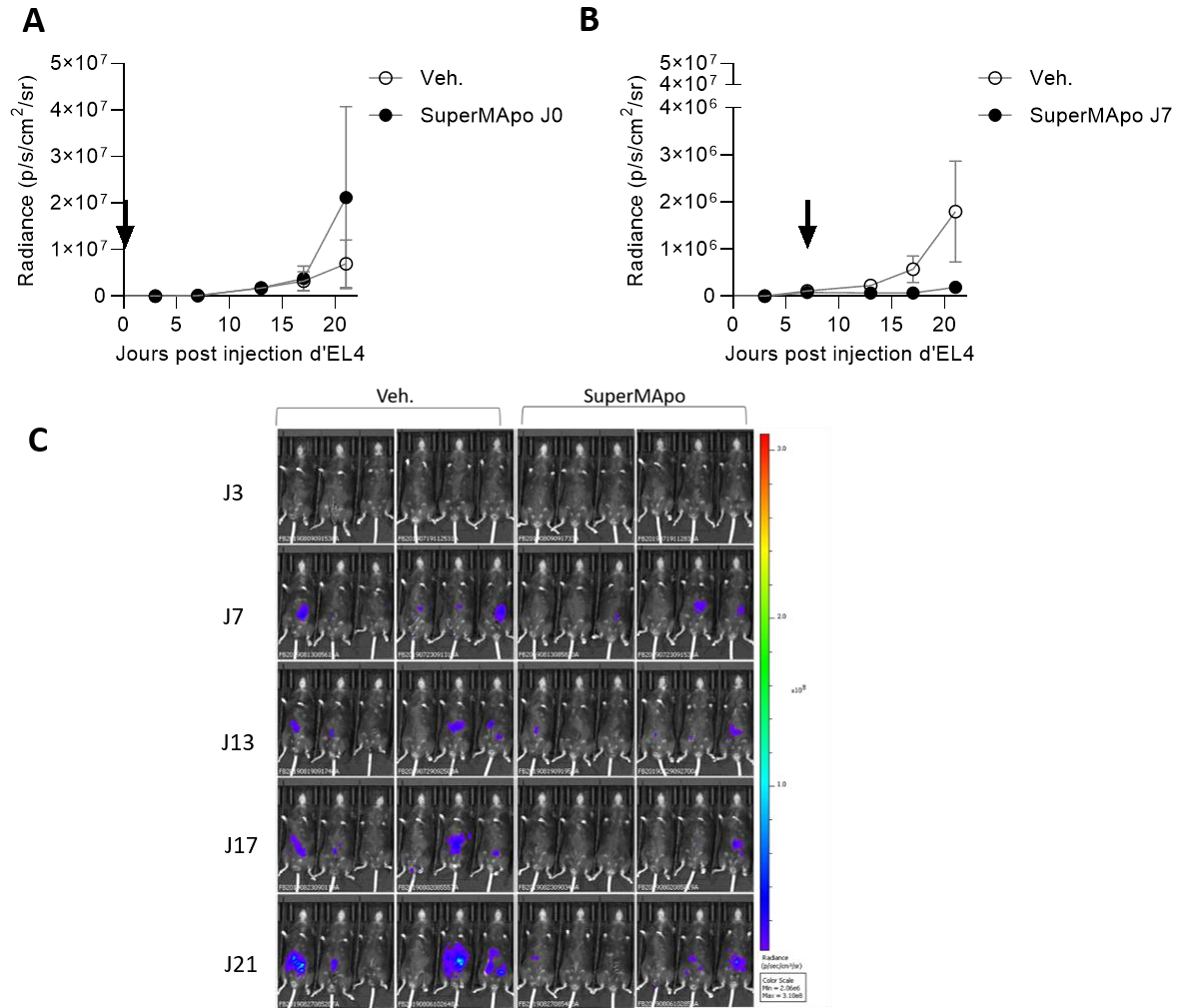


Figure 26. Effet du traitement SuperMApo sur la croissance de tumeur liquide (intrapéritonéale). Les cellules EL4-luc (2.10^6 cellules/souris) ont été injectées à J0. Le suivi de la progression tumorale a été évalué 2 fois par semaine par quantification de bioluminescence. Les animaux ont été traités par SuperMApo en intrapéritonéal à J0 et J2 (1mL) : 1 expérience ; 5 souris/groupe (A), ou à J7 et J9 : 3 expériences ; 15 souris/groupe (B, C), $p = ns$, t test, données en moyenne \pm SEM.

Partie II.

Mécanismes d'actions des facteurs pro-résolutifs comme approche innovante en thérapie anti-cancéreuse

La première partie de ce travail a consisté en l'étude exploratoire de l'effet du traitement SuperMApo sur différents modèles expérimentaux de cancers. L'effet anti-tumoral du traitement SuperMApo semble dépendre du modèle expérimental mais également des modalités de traitement. Les modèles liquides apparaissent être les modèles répondant le plus au traitement SuperMApo, c'est donc dans ce contexte que les mécanismes anti-tumoraux des facteurs pro-résolutifs ont été étudiés. La seconde partie de ce travail a donc consisté en l'étude des différentes populations immunitaires mais également des médiateurs inflammatoires, ainsi que le phénotype des cellules cancéreuses dans le but de comprendre les mécanismes anti-tumoraux à l'origine du ralentissement de croissance tumorale observé dans le modèle de greffes tumorales intrapéritonéales. Les résultats suivants ainsi que des données complémentaires ont fait l'objet d'un article scientifique soumis avec succès à la revue internationale à comité de lecture *Frontiers in Immunology* (cf. Partie. II.6. ANNEXE).

1. Le traitement SuperMApo limite la progression des cancers liquides

Dans le but d'étudier les mécanismes anti-tumoraux, la lignée EL4 (lymphome) injectée en intrapéritonéal chez des souris C57Bl/6, a été étudiée. Lorsque ces cellules ont été injectées ($2 \cdot 10^6$ cellules) et que les animaux ont été traités par SuperMApo (1mL répété à 48h, ip) 7 jours après les cellules cancéreuses, le traitement permet de limiter de manière importante la progression tumorale par rapport aux souris contrôles, de manière significative (Figure **27A-C**). Il avait été observé, que lorsque ces cellules sont injectées ($1 \cdot 10^6$ cellules) par voie intraveineuse et que le même schéma de traitement par SuperMApo est administré, les facteurs pro-résolutifs permettent également de limiter la progression tumorale (Figure **27D**). En revanche, lorsque ces cellules sont injectées en sous cutané, aucune réduction de croissance tumorale n'a pu être observée après traitement par SuperMApo administré au moment de l'apparition de la tumeur (Figure **27E**).

Ces résultats suggèrent que le traitement serait efficace pour les modèles de tumeurs liquides. En effet, il semblerait que pour induire son effet anti-tumoral, le traitement requiert une disponibilité des cellules cancéreuses et des cellules immunitaires, en systémique. Cette observation semble donc traduire une nécessité de la biodisponibilité du médicament au niveau systémique, pour une activité anti-tumorale.

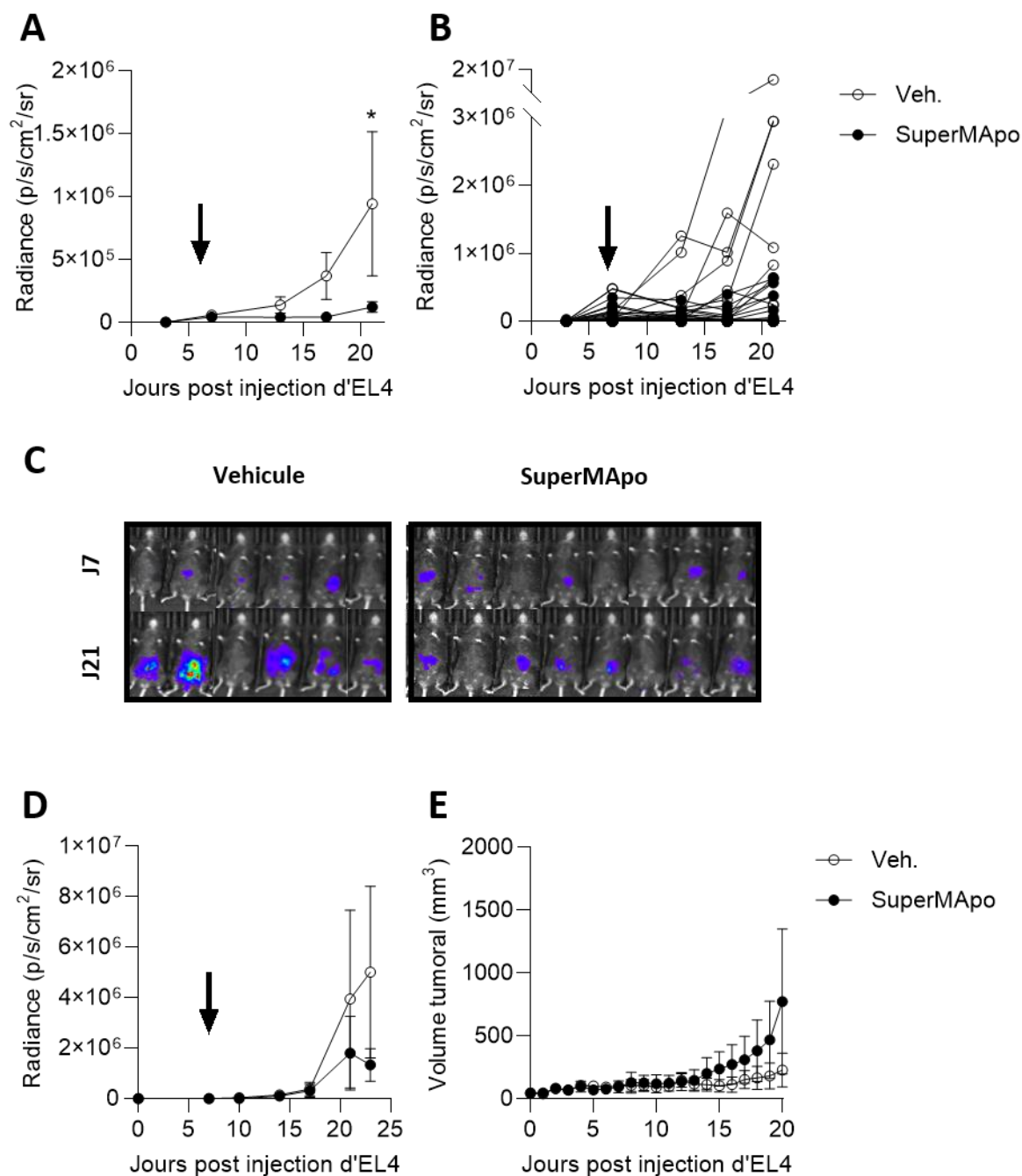


Figure 27. Le traitement SuperMApo limite la progression des cancers liquides. Les cellules EL4 ont été injectées en intrapéritonéal à J0 aux souris C57Bl/6 (2.10^6 cellules) traitées à J7 et J9 par SuperMApo (1 mL i.p.). La progression tumorale a été évaluée par injection de luciférine (15 mg/mL, i.p.) ; 6 expériences représentatives de 8, 20 à 28 souris/groupe, * $p < 0.05$ (Two-way Anova Test), données en moyenne \pm SEM (A), données par individu (B), image de bioluminescence à J7 et J21 (C). Les cellules EL4 ont été injectées en intraveineux à J0 aux souris C57Bl/6 (1.10^6 cellules) traitées à J7 et J9 par SuperMApo (1 mL i.p.). La progression tumorale a été évaluée par injection de luciférine (15 mg/mL, i.p.) ; 5 souris/groupe, moyenne \pm SEM ; $p = ns$ (Two-Way Anova Test) (D). Les souris C57Bl/6 ont reçu 1.10^6 cellules d'EL4 à J0, et ont été traitées à l'apparition de la tumeur (1 mL, ip, répété à 48h), 1 expérience, 5 souris/groupe, moyenne \pm SEM ; $p = ns$ (Two-Way Anova Test) (E).

2. Le traitement SuperMApo n'impacte pas directement les cellules cancéreuses

Les résultats de suivi de croissance tumorale *in vivo* pour la lignée EL4, suggèrent un différentiel de réponse anti-tumorale suivant la voie d'injection des cellules cancéreuses, suggérant que l'effet du traitement par facteurs pro-résolutifs dépendrait de l'environnement cellulaire pour induire un effet anti-tumoral. Dans ce contexte, la croissance, la prolifération et la mort des cellules EL4, ont été étudiées *in vitro* en présence du traitement SuperMApo. Le but de ces expériences a été de déterminer si le traitement SuperMApo pouvait avoir un effet direct sur les cellules cancéreuses en culture. Pour cela les cellules cancéreuses ont été cultivées en présence de SuperMApo, nous avons étudié la radiance des cellules cancéreuses, le nombre de cellules dans le milieu de culture. La radiance augmente pour les cellules cultivées en milieu de culture contrôle au cours du temps, lorsque les cellules ont été cultivées en présence de SuperMApo, les courbes de radiance se superposent presque totalement au cours du temps (Figure **28A**). Lorsque les cellules sont dénombrées au cours du temps, la même tendance est observée au cours du temps en présence de SuperMApo (Figure **28B**). Ces résultats suggèrent que le traitement n'aurait pas d'impact direct sur la croissance des cellules cancéreuses *in vitro*. Même s'il est possible d'observer une légère diminution au deuxième jour de culture, cet infléchissement semble dû au milieu contrôle de SuperMApo, moins riche et donc pouvant favoriser un ralentissement de la croissance des cellules dans ce milieu. Afin de d'approfondir ces données, l'étude de la prolifération des cellules EL4 *in vitro* a été réalisée. Pour cela, les cellules ont été cultivées en présence de SuperMApo, préalablement marquées au CFSE. L'étude en cytométrie en flux de l'index de division permet d'observer que le traitement SuperMApo ne diminue pas cet index (Figure **28C**). La même expérience a été réalisée par un marquage au Ki-67, et aucune réduction du pourcentage de Ki-67 n'est observable pour les cellules cancéreuses en présence de SuperMApo (Figure **28D**). Ces résultats semblent démontrer que le traitement SuperMApo en plus de ne pas impacter la croissance au cours du temps, ne semble pas induire plus de prolifération des cellules cancéreuses. Dans le but de déterminer si le traitement SuperMApo impactait la mortalité des cellules cancéreuses, le dénombrement des cellules mortes au cours du temps a été réalisé. Dans ce contexte, le traitement SuperMApo ne diminue pas le pourcentage de viabilité des cellules EL4 *in vitro* (Figure **28E**). Afin de soutenir ces données, le marquage des cellules par un marqueur de viabilité a été réalisé et analysé par cytométrie en flux. Le traitement SuperMApo n'a encore une fois pas d'impact sur la viabilité des cellules cancéreuses *in vitro* (Figure **28F**). La diminution de viabilité pour le milieu contrôle du traitement SuperMApo, pourrait s'expliquer comme pour les courbes de radiance et de croissance, par le fait que le milieu contrôle est moins riche que le milieu optimal de culture des cellules cancéreuses. Ainsi, les médiateurs présents dans le traitement SuperMApo pourraient cependant soutenir légèrement le développement des cellules cancéreuses.

Ces résultats suggèrent que le traitement SuperMApo, présent dans le milieu de culture des cellules EL4, n'a pas ou très peu d'impact direct sur les cellules cancéreuses. En effet, le traitement SuperMApo ne diminue pas directement la croissance, la prolifération ou la viabilité des cellules cancéreuses contrairement à ce qui a pu être observé *in vivo*, avec une réduction de la progression tumorale. Dans ce contexte, il semblerait que le traitement SuperMApo nécessite l'implication de l'organisme entier pour permettre un effet anti-tumoral. En effet, le traitement pourrait moduler le système immunitaire pour induire un effet anti-tumoral.

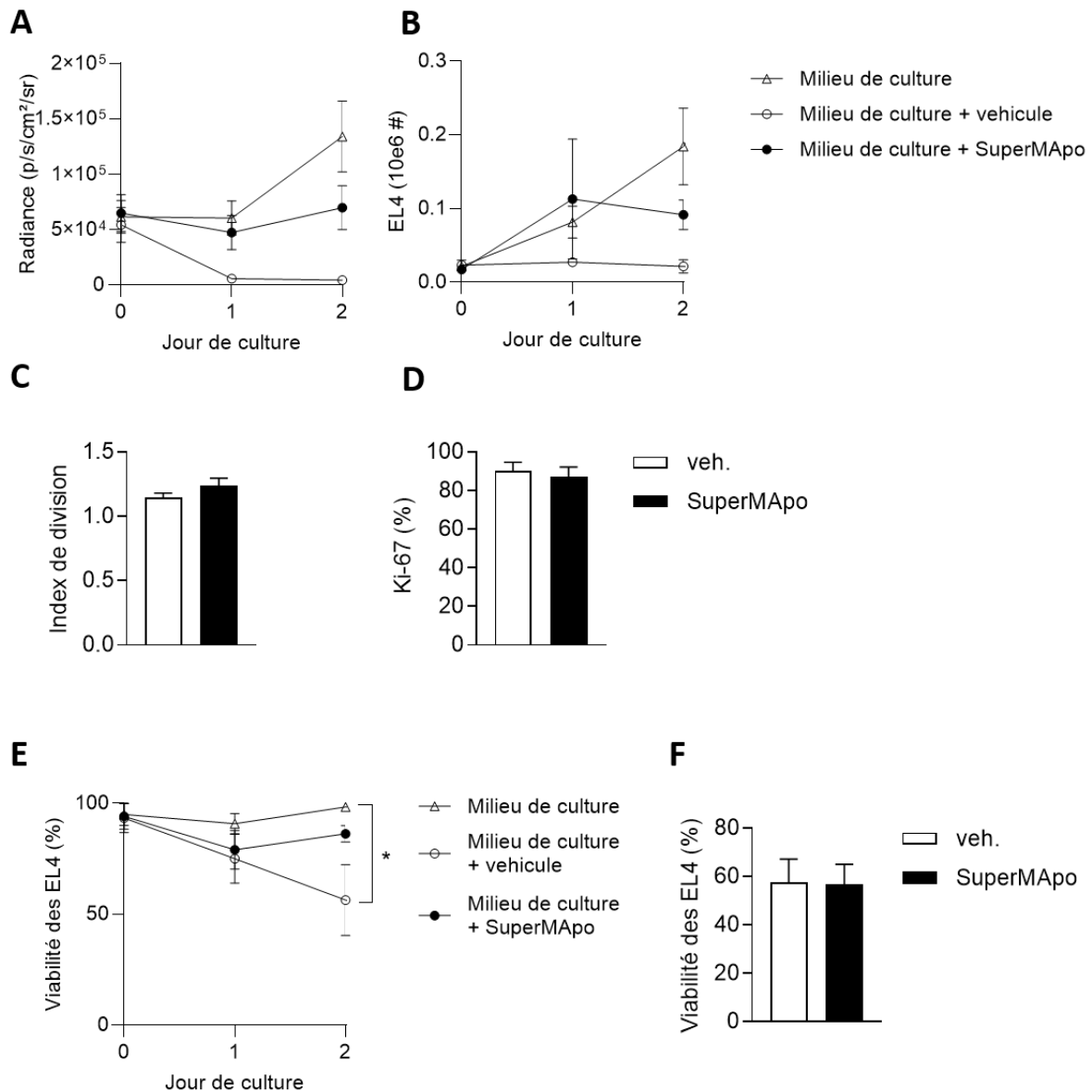


Figure 28. Effet du traitement SuperMApo sur les cellules EL4 *in vitro*. Les cellules EL4-luc (2.10⁴ cellules/puits) ont été ensemencées en plaque en présence de SuperMApo ou des milieux contrôles (DMEM, RPMI), et le suivi de la croissance cellulaire a été évaluée par quantification de la bioluminescence (A), par dénombrement cellulaire (B) 3 expériences ; 2 à 3 puits/condition ; *p* = ns (One-way Anova test). Les EL4-luc ont été marquées par CFSE et ont été cultivées pendant 24h avec le traitement SuperMApo, l'index de division a été déterminé par cytométrie en flux (C) et les cellules ont été marquées au Ki-67 et le pourcentage de cellules positives a été déterminé par cytométrie en flux (D), 3 expériences, *p* = ns (*t* test). La viabilité cellulaire a été déterminée par bleu de Trypan, 3 expériences ; 2 à 3 puits/condition ; * *p* < 0,05 Culture medium vs

Culture medium veh. (One-way Anova test plus Dunn's post test) (E) et par cytométrie en flux, 3 expériences, $p = ns$ (t test). (F). Données en moyenne \pm SEM.

3. L'effet anti-tumoral du traitement nécessite la mise en place d'une immunosurveillance

Les données obtenues avec un effet anti-tumoral du traitement SuperMApo, ont été réalisées avec une lignée EL4 positive pour les mycoplasmes. Lorsque cette observation a été réalisée, une nouvelle lignée EL4, dépourvue de contamination au mycoplasme, provenant d'ATCC a été étudiée. Cependant avec cette deuxième lignée, le modèle mis en place jusqu'à présent n'a pu être reproduit. Les caractéristiques de ces deux lignées ont alors été étudiées. La lignée EL4 est connue pour exprimer différents marqueurs cellulaires, notamment CD4+, CD80+ et CD86+¹³⁰⁻¹³⁶. Les deux lignées EL4, du laboratoire et celle provenant de ATCC, ont été étudiées par cytométrie en flux. Fondamentalement, il semblerait qu'il existe une différence dans l'expression de ces marqueurs *in vitro* (Figure 29A). Les marqueurs IAIE, CD80, CD86, CTLA-4, et PD-L1 ont été étudiés. Et en effet, il apparaît que la MFI (*Mean Fluorescence Intensity*) de ces différents marqueurs soit plus importante pour la lignée du laboratoire comparativement à celle provenant de ATCC (Figure 29A). Ces différences s'avèrent même significatives pour les cellules IAIE+, CD80+ et CTLA-4+, avec une augmentation 3 fois supérieure (Figure 29A). Ces résultats suggèrent que la dérive de cette lignée engendre un phénotype potentiellement plus immunogène par l'expression augmentée des marqueurs de co-stimulation mais à la fois plus immunosuppressive. Ainsi, cette lignée semblerait plus à même de favoriser les interactions avec les cellules du système immunitaire, et de ce fait pourrait sembler-t-il être plus immunogène. Dans ce contexte, le surnageant de culture des lignées cellulaires a été étudié par kit de détection pour doser les DAMPs (HSP-70, HMGB1 et ATP). Bien qu'il existe une différence dans le phénotype des cellules cancéreuses, aucune différence dans la adhé des DAMPs n'a été observée *in vitro* entre ces deux lignées (Figure 29B). Ces résultats suggèrent donc seulement une différence de phénotype *in vitro*. Suite à ces résultats *in vitro*, l'objectif a été de déterminer si ce phénotype et l'expression de DAMPs étaient similaires, une fois la lignée greffée au sein d'un organisme. Pour cela, les deux lignées ont été injectées par voie intrapéritonéale, et les mêmes expériences ont été réalisées *ex vivo*. Le phénotype des cellules cancéreuses reste similaire avec une augmentation de l'expression des différents marqueurs, significative pour IAIE+ CD80+ et CTLA-4+ (Figure 29C). Ainsi, il semblerait que le phénotype des cellules cancéreuses ne diffère pas après passage chez la souris. Ces résultats semblent donc démontrer une nette différence du phénotype de ces deux types de lignées EL4 suivant leur origine, conservée lorsque les cellules ont été implantées chez la souris. Les DAMPs ont alors été étudiés dans le lavage péritonéale de ces souris, afin de déterminer si ce phénotype était plus

immunogène *in vivo*. Le taux d'HSP70, d'HMGB1 et d'ATP augmente significativement dans le lavage péritonéal des souris ayant reçu la lignée EL4 du laboratoire comparativement à celles ayant reçu la lignée provenant d'ATCC (Figure **29D**). Ces résultats suggèrent que pour un phénotype plus immunogène mais également immunosuppresseur, la lignée du laboratoire engendre un plus fort taux de DAMPs *in vivo*, et donc serait potentiellement plus immunogène *in vivo*. La croissance *in vivo* de ces deux lignées a alors été étudiée en présence ou non de SuperMApo. Pour cela les cellules EL4 (ATCC, caractérisées de non immunogènes) ont été injectées (2.10^4 cellules) en intrapéritonéal et les animaux ont été traités par SuperMApo à J4 (1mL répété à 48h, ip). La lignée du laboratoire, caractérisée comme étant plus immunogène, a été injectée (2.10^6 cellules) en intrapéritonéal et les souris ont été traitées par SuperMApo à J7 (1mL répété à 48h, ip). La lignée la moins immunogène (ATCC) possède une cinétique de croissance beaucoup plus importante que la lignée plus immunogène (Figure **29E**). De plus, le traitement SuperMApo ne permet pas de limiter la progression tumorale de cette lignée moins immunogène (ATCC) comparativement à la lignée plus immunogène (laboratoire) (Figure **29E**). Ces résultats suggèrent, dans un premier temps que la lignée, du fait de son phénotype peu immunogène, croît *in vivo*, de manière exponentielle, et serait difficilement contrôlable par le système immunitaire de la souris. Le phénotype moins immunogène de la lignée pourrait expliquer sa faible croissance tumorale *in vivo*, potentiellement contrôlée par la surveillance du système immunitaire de la souris. Ces observations conduisent à l'hypothèse que le traitement SuperMApo agirait pour un modèle de tumeur fortement immunogène avec une croissance tumorale déjà contrôlée de base par le système immunitaire. Pour cela la lignée immunogène a été étudiée avec un schéma de traitement plus précoce, lorsqu'il était administré au moment de l'injection de la lignée EL4. Cette modalité de traitement préventif a été étudiée, au moment où un processus d'immunosurveillance pourrait se mettre en place, afin de comprendre si le traitement SuperMApo a un effet anti-tumoral dans ce contexte. Lors de cette étude, aucun effet du traitement SuperMApo n'est observé (Figure **29F**). Le traitement préventif semblerait donc ne pas permettre un effet anti-tumoral.

Ainsi l'ensemble de ces résultats suggère que le traitement SuperMApo nécessiterait l'action du système immunitaire pour induire un effet sur la croissance tumorale, mais également qu'il nécessite l'initiation au préalable d'une surveillance immunitaire vis à vis de la tumeur, pour sans doute la soutenir.

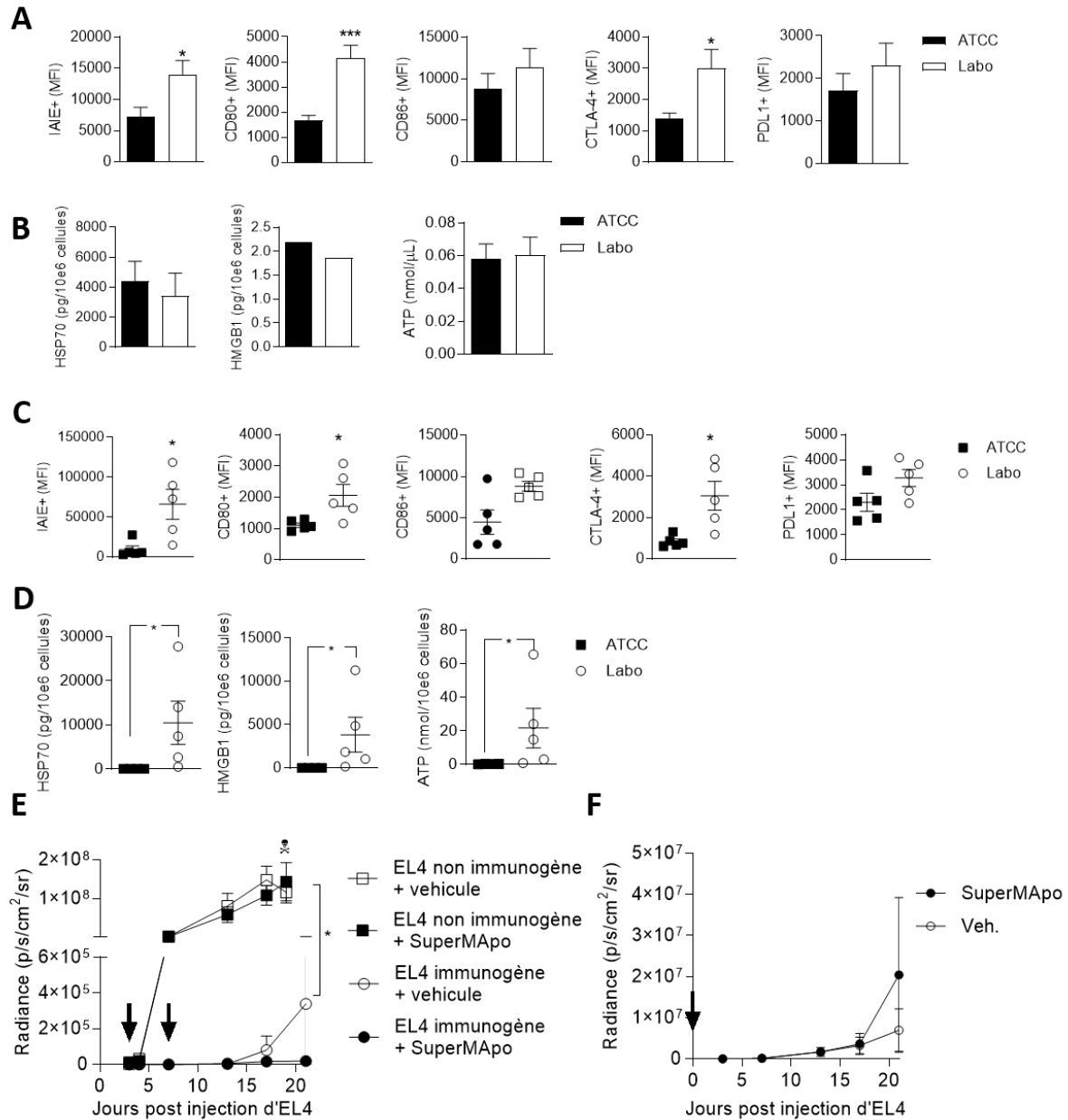


Figure 29. L'effet anti-tumoral du traitement SuperMApo suivant l'immunogénéité de la lignée et la mise en place de l'immunosurveillance. La moyenne d'intensité de fluorescence de marqueurs de co-stimulation (IAIE, CD80, CD86) et immunosuppresseurs (CTLA-4 et PD-L1) a été déterminée par cytométrie en flux pour les différentes lignées EL4 *in vitro*, 3 expériences ; * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ (*t* test) (A). Les DAMPs (HSP70, HMGB1 et ATP) ont été dosés par ELISA dans le surnageant de culture des différentes lignées, 1 à 4 expériences ; $p = ns$ (*t* test) (B). La moyenne d'intensité de fluorescence de marqueurs de co-stimulation (IAIE, CD80, CD86) et immunosuppresseurs (CTLA-4 et PD-L1) a été déterminée par cytométrie en flux pour les différentes lignées EL4 *ex vivo* 22 jours après injection chez les souris C57Bl/6 âgées de 7 semaines, 1 expérience ; * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ (*t* test) (C). Les DAMPs (HSP70, HMGB1 et ATP) ont été dosés par ELISA dans le lavage péritonéal 22 jours après injection des EL4, 1 expérience ; * $p < 0,05$ (*t* test) (D). La progression tumorale des deux lignées a été suivie par bioluminescence après l'injection (ip) à J0 des EL4 (2.10⁶ cellules/mL ou 2.10⁴ cellules/mL) chez des C57Bl/6, et traitées par SuperMApo (1mL, ip) à J4 ou J7. 1 expérience ; * $p < 0,05$ non immunogenic + vehicule vs immunogenic + SuperMApo, One-Way Anova test + Dunn's Multiple Comparison Test (E). La progression tumorale a été suivie par bioluminescence après l'injection (ip) à J0 des EL4 (2.10⁶ cellules/mL) chez des C57Bl/6 âgées de 16 à 24 semaines, et traitées par SuperMApo (1mL, ip) à J0, 1 expérience ; $p = ns$; One-Way Anova test. (F). Données en moyennes \pm SEM.

4. Le traitement SuperMApo soutient la réponse anti-tumorale sans être immunosuppresseur

Dans le cadre d'un modèle immunogène avec l'injection des cellules EL4 du laboratoire par voie intrapéritonéale, l'étude *ex vivo* des cellules cancéreuses n'a pas permis de démontrer une réduction des marqueurs de surface, caractéristique de cette lignée, par rapport à la lignée non immunogénique. Dans ce contexte, l'étude des marqueurs co-stimulateurs (IAIE, CD80), après traitement SuperMApo, a été réalisée dans le but de déterminer si le traitement avait un impact sur le phénotype des cellules cancéreuses pouvant permettre leur reconnaissance par le système immunitaire. L'étude par cytométrie en flux des cellules cancéreuses 13 jours post traitement, n'a pas permis d'observer une modulation de la MFI des cellules EL4 CD80+ et IAIE+ (Figure **30A**). Ces résultats suggèrent que le traitement n'induirait pas plus d'expression de marqueurs de co-stimulation, permettant aux cellules d'être reconnues par le système immunitaire. Dans ce contexte, l'étude des DAMPs (HSP70 et HMGB1) a également été réalisée par kit de détection, à partir du lavage péritonéal, 13 jours post traitement. Le taux de DAMPs au sein du péritoine ne semble pas être augmenté après traitement par SuperMApo (Figure **30B**). Ces résultats semblent montrer que le traitement SuperMApo n'impacte pas le phénotype des cellules cancéreuses ni l'immunogénéicité liée à la greffe des cellules immunogènes au sein du péritoine. Dans ce contexte, et afin de déterminer l'impact au sein du péritoine du traitement SuperMApo, le dosage de cytokines inflammatoires a été réalisé *ex vivo* à partir du lavage péritonéal, 1 jour et 13 jours post traitement. Le taux d'IFN- γ au sein du péritoine semble diminuer au cours du temps, lorsque les souris ont été traitées par SuperMApo, ce taux semble légèrement plus important 1 jour après le traitement et diminue plus fortement au cours du temps (Figure **30C gauche**). Le taux d'IL-6 quant à lui, semble similaire 1 jour post traitement, mais diminue au cours du temps lorsque les souris ont été traitées par SuperMApo (Figure **30C droite**). Ces résultats tendent à montrer que le traitement SuperMApo pourrait avoir un impact sur l'inflammation locale à la tumeur, en la diminuant. Dans ce contexte, le taux d'IL-6 a été quantifié en systémique à partir du prélèvement de sang, 13 jours post traitement. Lorsque les souris ont été traitées par SuperMApo, la concentration d'IL-6 diminue de manière significative dans le sang (Figure **30D**). Ainsi, le dosage des cytokines inflammatoires et plus particulièrement de l'IL-6, localement à la tumeur et en systémique tend à montrer une potentielle réduction de l'inflammation après traitement par SuperMApo. Ainsi l'étude des cellules myéloïdes a été réalisée dans le but de déterminer si l'impact d'une potentielle réduction d'inflammation par la cytokine IL-6, pouvait moduler le nombre de cellules myéloïdes, ainsi que leur activation, localement à la tumeur, mais également dans les organes lymphoïdes secondaires. Pour cela, le nombre de cellules CD11b+ et CD11c+ a été étudié par cytométrie en flux, au cours du temps à partir du lavage péritonéal. Le nombre de cellules myéloïdes dans le péritoine semble augmenter au cours du temps, cependant

cette croissance ne semble pas être impactée lorsque les souris ont été traitées par SuperMApo (Figure **30E**). Afin de vérifier si le nombre de cellules activées et le nombre de macrophages était impacté par le traitement SuperMApo, les cellules CD11b+ issues du péritoine ont été marquées respectivement pour les marqueurs IAIE et F4/80. Le nombre de cellules CD11b+ IAIE+ et CD11b+ F4/80+ ne change pas après traitement SuperMApo au sein du péritoine 13 jours après traitement (Figure **30F**). Ces résultats semblent indiquer, que, bien que le traitement paraisse moduler l'inflammation, le recrutement des cellules myéloïdes et notamment les cellules dendritiques et les macrophages ainsi que leur activation, ne se voit pas modifié dans le péritoine. Afin de déterminer si une inflammation systémique potentiellement diminuée pouvait moduler les cellules myéloïdes au sein des organes lymphoïdes secondaires, les mêmes expériences ont été réalisées pour la rate et les ganglions. Le nombre de cellules CD11b+ dans la rate augmente au cours du temps, cependant celui-ci ne se voit pas modifié pour des animaux traités par SuperMApo (Figure **30G gauche**). En revanche le nombre de CD11c+ diminue dans la rate, mais ne semble pas pour autant modulé par le traitement SuperMApo (Figure **30G droite**). Le nombre de cellules activées (CD11b+ IAIE+) et de macrophages (CD11b+ F4/80+) ne semble pas également modulé par le traitement SuperMApo dans la rate (Figure **30H**). Ainsi, ces différents résultats suggèrent que le traitement SuperMApo n'aurait que peu d'impact sur les cellules myéloïdes au sein de la rate. Dans le but de déterminer si ces types cellulaires, sont quant à eux, modulés dans d'autres organes lymphoïdes secondaires, les cellules extraites des ganglions inguinaux ont été étudiées. Il s'avère que dans les ganglions, le nombre de cellules CD11b+ soit augmenté au cours du temps de manière significative, 13 jours après traitement SuperMApo (Figure **30I gauche**). En revanche cette observation n'est pas valable pour le nombre de cellules CD11c+ (Figure **30I droite**). Ces résultats semblent évoquer que le traitement SuperMApo permettrait de soutenir le recrutement de cellules myéloïdes dans les ganglions mais pas des cellules dendritiques. Dans le but de déterminer l'impact de cette augmentation sur les cellules activées et les macrophages, le nombre de cellules CD11b+ IAIE+ et CD11b+ F4/80+ a été étudié par cytométrie en flux dans les ganglions 13 jours après traitement SuperMApo. Le nombre de cellules IAIE+ augmente de manière significative pour les souris ayant reçu le traitement SuperMApo (Figure **30J gauche**). Cette augmentation tend également à être retrouvée pour les macrophages (F4/80+), cependant cette différence n'est pas significative (Figure **30J droite**).

Ces différents résultats suggèrent que le traitement SuperMApo n'aurait pas d'impact sur le phénotype des cellules cancéreuses ni sur l'immunogénéicité au sein du péritoine. Mais que le traitement SuperMApo, tout en limitant certaines cytokines pro-inflammatoires, permettrait d'augmenter le nombre de cellules myéloïdes actives dans les organes lymphoïdes secondaires.

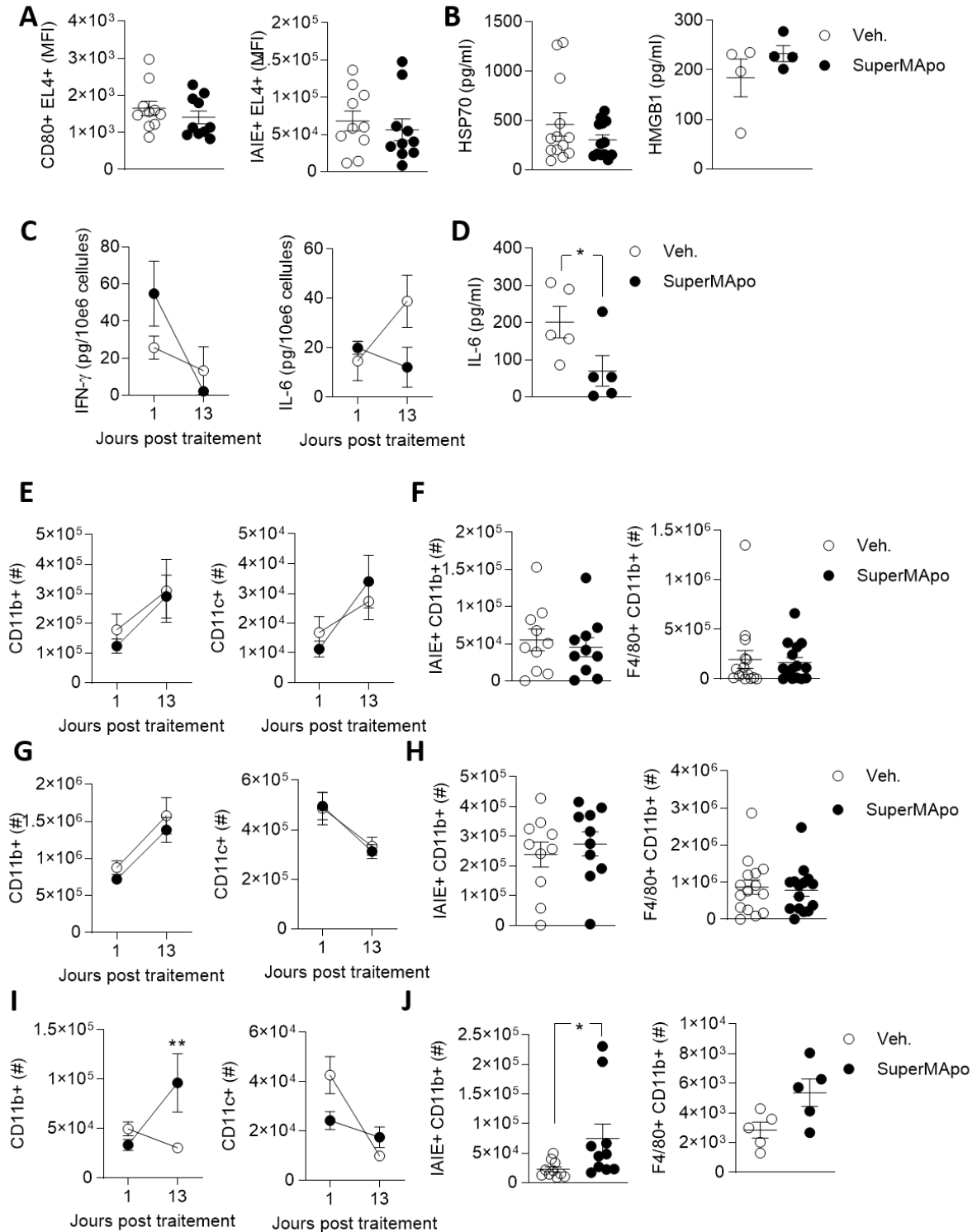


Figure 30. Immunorégulation par le traitement SuperMApo. La moyenne d'intensité de fluorescence de marqueurs de co-stimulation (IAIE, CD80) des EL4 a été déterminée par cytométrie en flux à partir du lavage péritonéal 13 jours après traitement SuperMApo (1 mL, répété à 48h, intrapéritonéal), 2 expériences ; 10 souris/groupe ; $p = ns$ (t test) (A). Les DAMPs (HSP70, HMGB1) ont été dosés par ELISA dans le lavage péritonéal 13 jours post traitement 1 à 2 expériences ; 5 à 10 souris/groupe ; $p = ns$ (t test) (B). Le dosage des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ et IL-6) a été réalisé par ELISA sur le lavage péritonéal en cinétique 1 (C) et 13 jours post traitement (C, D), 1 expérience ; 5 souris/groupe ; * $p < 0,05$ (Two-Way Anova test + Bonferroni's post test, t test). Le nombre de cellules (CD11b+, CD11c+) a été évalué par cytométrie en flux en cinétique (1 et 13 jours post traitement) dans le lavage péritonéal (E) dans la rate (G) et dans les ganglions inguinaux (I), 1 à 4 expériences ; 5 à 20 souris/groupe ; ** $p < 0,01$ (Two-Way Anova Test + Bonferroni's post test). Le nombre de cellules (IAIE+

et F4/80+) a été évalué par cytométrie en flux 13 jours post traitement dans le lavage péritonéal (F) la rate (H) et les ganglions inguinaux (J) 1 à 3 expériences ; 5 à 15 souris/groupe ; * $p < 0,05$ (t test). Données en moyennes \pm SEM.

Dans ce contexte, quant à une possible modulation des cellules myéloïdes par le traitement SuperMApo, l'étude des cellules myéloïdes au phénotype immunosuppresseif a été réalisée. En effet, les cellules myéloïdes, et plus particulièrement les macrophages au sein de la tumeur peuvent avoir un phénotype anti-tumoral mais également pro-tumoral^{34, 35, 41, 137, 138}. Dans ce contexte, les macrophages (CD11b+ F4/80+) exprimant PD-L1 ont été étudiés, 1 jour après traitement par SuperMApo, dans le lavage du péritoine. Le pourcentage ainsi que le nombre de macrophages exprimant PD-L1 n'augmentent pas suite au traitement SuperMApo mais auraient même possiblement tendance à diminuer (Figure **31A**). Ces données suggèrent que le traitement n'induirait pas directement de macrophages au phénotype immunosuppresseif. Suite à ces résultats, les cellules CD11b+ Gr1+ ont été étudiées 13 jours après traitement, dans le but d'observer si le traitement SuperMApo pouvait induire d'autres cellules myéloïdes au phénotype immunosuppresseif, comme les MDSC. Le traitement SuperMApo aurait tendance à diminuer le pourcentage de CD11b+ Gr1+ mais également leur nombre (Figure **31B**). Ces résultats indiquent, que même si le traitement SuperMApo aurait tendance à diminuer l'inflammation et à augmenter les cellules myéloïdes, il n'induirait pas pour autant plus de cellules myéloïdes au phénotype suppressif. Dans ce contexte, le marqueur Ly6C a été étudié au sein des cellules CD11b+, 13 jours après traitement SuperMApo, à partir du lavage péritonéal. Ce marqueur est exprimé chez les monocytes et les cellules myéloïdes immatures (M-MDSC). Il s'avère que le pourcentage de cellules Ly6C+ a tendance à augmenter après traitement SuperMApo comparativement au contrôle, en revanche leur nombre n'augmente pas (Figure **31C**). Ces données peuvent suggérer que le traitement SuperMApo aurait tendance à augmenter la proportion de cellules monocytaires au sein des cellules myéloïdes. L'hypothèse serait que le traitement SuperMApo pourrait limiter les cellules suppressives. Ainsi, les cellules Treg (CD4+ CD25+ FoxP3+) ont été étudiées, 13 jours après traitement SuperMApo dans le lavage péritonéal. Le pourcentage de Treg et leur nombre n'augmentent pas au suite du traitement SuperMApo (Figure **31D**). Ces observations confirment que l'injection des facteurs pro-résolutifs, n'induirait pas d'immunosuppression. Afin de garantir cette hypothèse, le taux de TGF- β a été dosé dans le liquide d'ascite malin, 1 jour et 13 jours après traitement SuperMApo. La concentration de TGF- β reste stable au cours du temps, que les animaux aient reçu ou non le traitement SuperMApo (Figure **31E**). Ainsi le traitement SuperMApo ne semble pas augmenter le nombre de cellules myéloïdes immunosuppressives, ni les lymphocytes T régulateurs, ni le taux de TGF- β au sein du péritoine. Afin de s'assurer que l'immunosuppression ne pouvait pas être augmentée à partir des cellules cancéreuses, le phénotype des cellules EL4 a été étudié par cytométrie en flux, 13 jours après traitement. Il a pu être observé qu'au bout de 13 jours

après le traitement, la MFI des EL4 CTLA4+ et PD-L1+ n'était pas augmentée lorsque les souris avaient reçu le traitement SuperMApo (Figure 31F).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats conduisent à montrer, que, même si l'injection de facteurs pro-résolutifs pourrait réguler l'inflammation et la surveillance anti-tumorale, pour autant, elle n'induirait potentiellement pas un environnement immunosuppresseur en faveur de la progression tumorale.

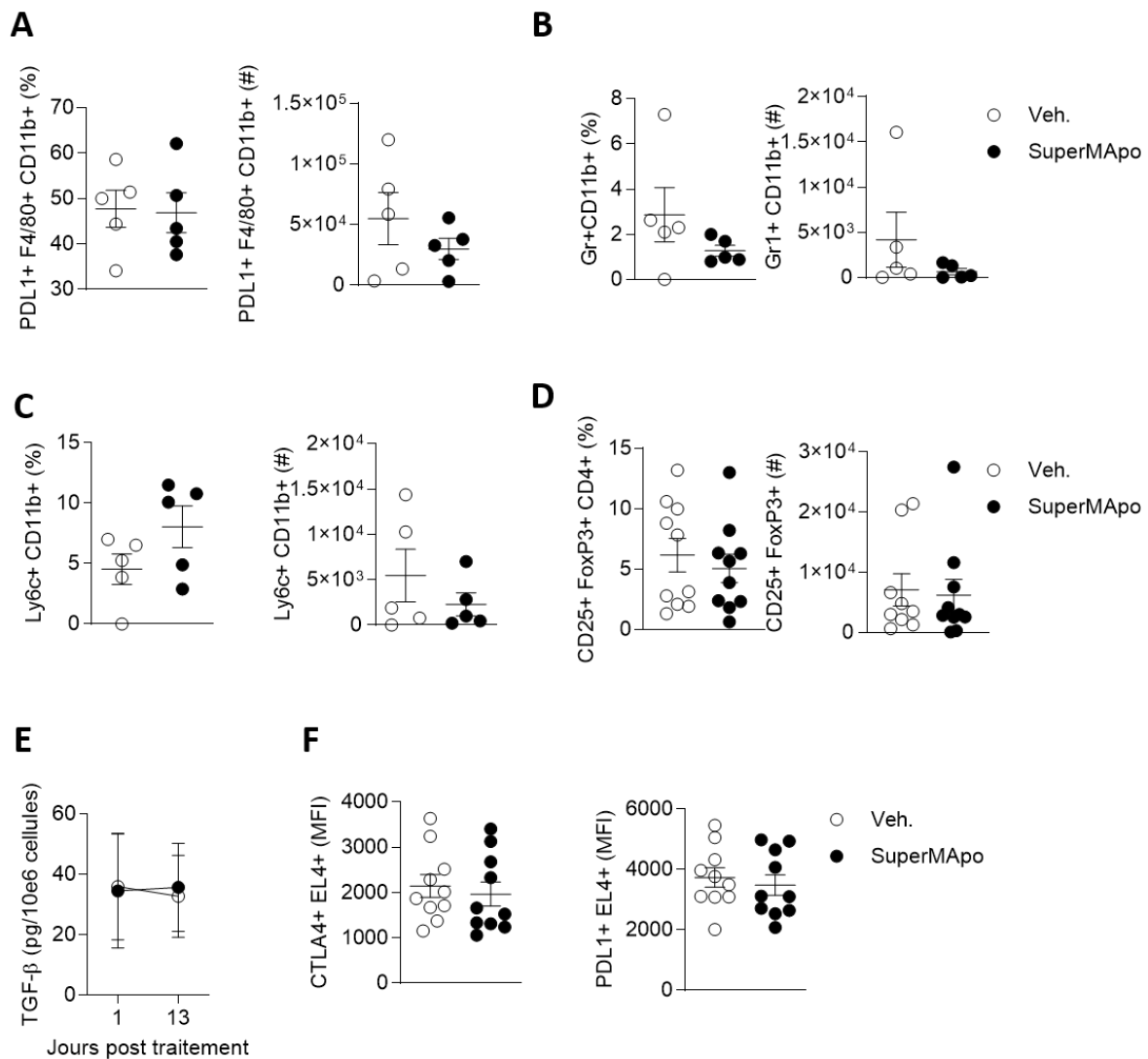


Figure 31. Absence d'immunosuppression suite au traitement SuperMApo. Le pourcentage et le nombre de macrophages exprimant PD-L1 a été déterminé par cytométrie en flux 1 jour post traitement SuperMApo (1 mL, répété à 48h, intrapéritonéal) à partir du lavage péritonéal, 1 expérience ; 5 souris/groupe ; $p = ns$ (t test) (A). Le pourcentage et le nombre de cellules CD11b+ Gr1+ (MDSC like) a été déterminé par cytométrie en flux 13 jours post traitement SuperMApo (1 mL, répété à 48h, intrapéritonéal) à partir du lavage péritonéal, 1 expérience ; 5 souris/groupe ; $p = ns$ (t test) (B). Le pourcentage et le nombre de cellules CD11b+ Ly6C+ (M-MDSC like) a été déterminé par cytométrie en flux 13 jours post traitement SuperMApo (1 mL, répété à 48h, intrapéritonéal) à partir du lavage péritonéal, 1 expérience ; 5 souris/groupe ; $p = ns$ (t test) (C). Le pourcentage et le nombre de cellules CD25+ FoxP3+ (Treg) ont été déterminé par cytométrie en flux 13 jours post traitement SuperMApo (1 mL, répété à 48h, intrapéritonéal) à partir du lavage péritonéal, 2 expériences ; 9 à 10 souris/groupe ; $p = ns$ (t test) (D). Le dosage de TGF- β (total) a été réalisé par ELISA en cinétique dans le lavage péritonéal 1 et 13 jours post traitement, 1 expérience ; 5 souris/groupe ; $p = ns$ (Two-Way Anova Test) (E). La moyenne d'intensité de fluorescence de

marqueurs immunosuppresseurs (CTLA-4 et PD-L1) des EL4 a été déterminée par cytométrie en flux à partir du lavage péritonéal 13 jours après traitement SuperMApo (1 mL, répété à 48h, intrapéritonéal), 2 expériences ; 10 souris/groupe ; $p = ns$ (t test) (F). Données en moyennes \pm SEM.

5. Le traitement SuperMApo maintient une veille immunitaire anti-tumorale

Le traitement SuperMApo semble limiter la progression tumorale en agissant sur l'inflammation mais également sur les cellules myéloïdes, sans pour autant induire d'immunosuppression. Dans ce contexte, l'étude des mécanismes anti-tumoraux du traitement SuperMApo s'est orientée sur les cellules lymphocytaires et plus particulièrement les lymphocytes T effecteurs. Les lymphocytes T ont été étudiés 13 jours après traitement SuperMApo. Pour cela les cellules CD4+ et CD8+ ont été étudiées par cytométrie en flux dans la rate et le péritoine. Le pourcentage de CD4+ et CD8+ dans la rate ne semble pas être impacté pour les animaux ayant reçu le traitement SuperMApo (Figure 32A), pas plus qu'à l'issue du lavage péritonéal (Figure 32B). Ainsi, pour étudier les LT effecteurs, le pourcentage de cellules CD4+ IFN- γ + (Th1) et CD8+ IFN- γ + (Tc1) a été étudié dans la rate et le péritoine. Tout comme le pourcentage de LT CD4+ et CD8+, aucun changement n'est observable pour les Th1 et Tc1 dans la rate comme dans le péritoine, lorsque les souris ont été traitées par SuperMApo (Figure 32C, D). Ces résultats tendent à suggérer que le traitement n'a pas d'impact sur la proportion de cellules LT effecteurs. En revanche, lorsque l'IFN- γ est dosé au sein du plasma par ELISA, le traitement SuperMApo semble induire une augmentation de la concentration d'IFN- γ (Figure 32E). Afin de déterminer l'origine de cette augmentation en systémique, les cellules issues de la rate et du péritoine ont été restimulées par les cellules cancéreuses irradiées et le taux d'IFN- γ a été dosé dans le surnageant de culture. Lorsque les splénocytes ont été restimulés pendant 48h par les cellules cancéreuses, le delta de la concentration entre cellules stimulées et les cellules non stimulées augmente de manière significative pour les souris qui ont été traitées par SuperMApo (Figure 32F). Cette augmentation est également observable, mais de manière non significative pour les cellules issues du péritoine restimulées pendant 72h (Figure 32G). Dans le but de déterminer si cette réponse spécifique est due à la capacité des T effecteurs à induire une réponse spécifique et non pas à une réponse spécifique de leur nombre, le taux d'IFN- γ a été étudié en ELISpot pour les splénocytes stimulés par les cellules cancéreuses irradiées pendant 72h. Le delta (entre cellules stimulées et cellules non stimulées) de la taille moyenne des spots tend à augmenter lorsque les souris ont été traitées par SuperMApo (Figure 32H). En revanche, le delta du nombre moyen de spot ne tend pas à augmenter par rapport aux souris contrôles (Figure 32I). Ces résultats suggèrent que le traitement SuperMApo aurait tendance à induire une réponse en IFN- γ spécifique de la tumeur dans la rate et dans le péritoine, même si au sein de ces organes aucune augmentation de la proportion de T effecteurs n'est observable. Ainsi, cette réponse spécifique

pourrait être due à une augmentation de la capacité de réponse des cellules effectrices. Ainsi, suite à ces différents résultats, la réponse spécifique des LT effecteurs a été étudiée. Pour cela les cellules issues des ganglions mésentériques et de la rate ont été restimulées par les peptides OVA₃₂₃₋₃₃₉ et OVA₂₅₇₋₂₆₄, respectivement présentés par le CMH de classe II et de classe I. Le concentration d'IFN- γ a été étudié par ELISA. Il est possible d'observer que lorsque les cellules de la rate sont stimulées par le peptide OVA₃₂₃₋₃₃₉, le delta de réponse en IFN- γ augmente de manière significative pour les souris ayant été traitées par SuperMApo par rapport aux souris contrôles (Figure **32J**). Pour les cellules extraites des ganglions mésentériques cette même tendance à l'augmentation est observable (Figure **32K**). Ces données conduisent à l'hypothèse que le traitement SuperMApo augmenterait la capacité des LT CD4+ à induire une sécrétion d'IFN- γ . La sécrétion d'IFN- γ pour les LT CD8+ a également été étudiée dans les ganglions mésentériques avec une stimulation par le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄. Dans ce contexte, le taux d'IFN- γ dans le surnageant de culture augmente ($p = 0.055$) lorsque les souris ont été traitées par SuperMApo (Figure **32L**). Ces données suggèrent que les LT CD8+ auraient tendance à avoir une capacité de réponse spécifique de la tumeur en IFN- γ augmenté quand les animaux ont été traités par SuperMApo.

Ces différents résultats tendent à montrer que le traitement SuperMApo n'augmente pas le nombre de T dans la rate ni dans le péritoine. En revanche, le traitement induirait plus de réponses spécifiques vis-à-vis de la tumeur des Th1 et des Tc1 au sein des organes lymphoïdes secondaires.

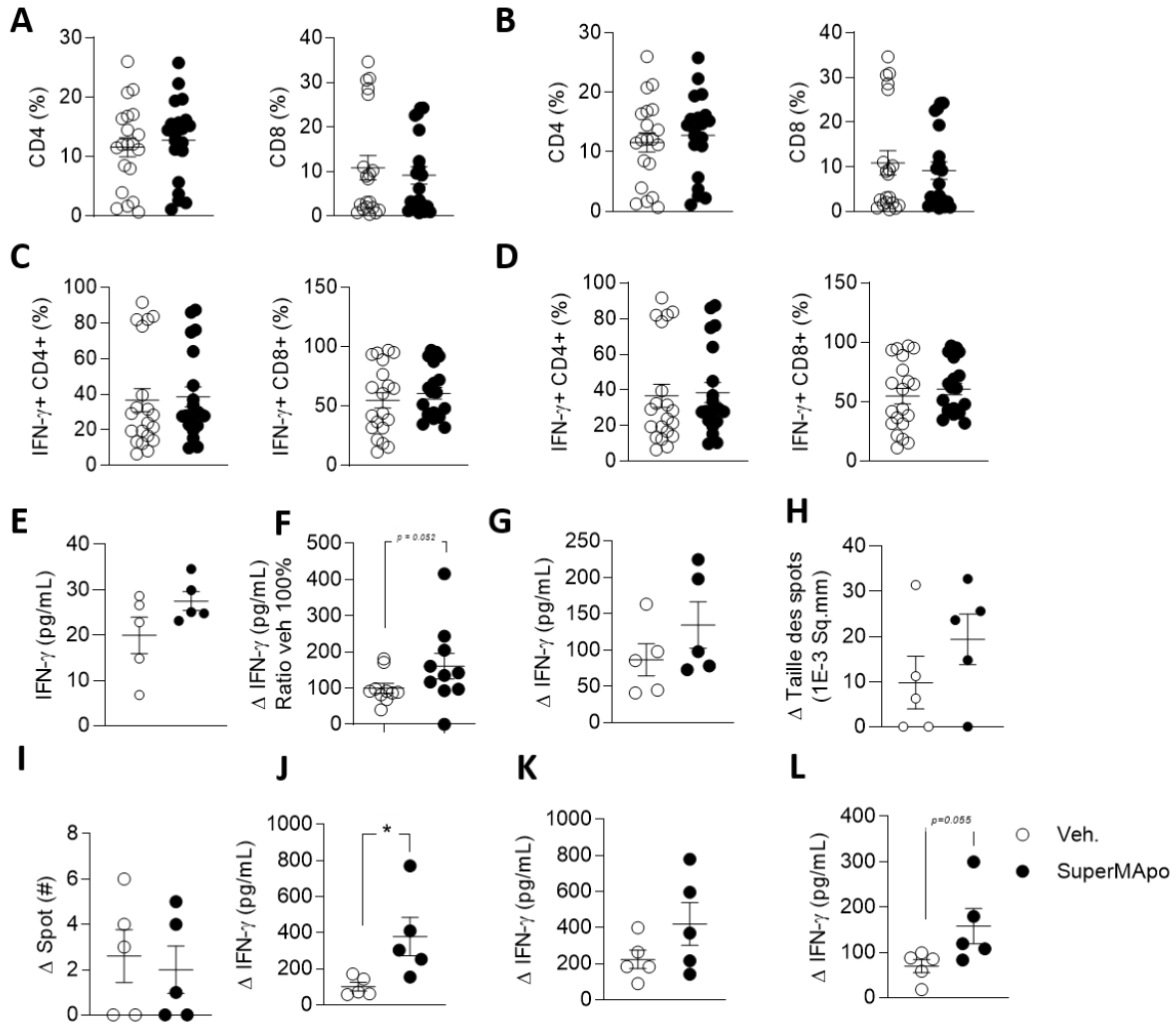


Figure 32. Réponse en IFN- γ spécifique de la tumeur, 13 jours post traitement SuperMApo. Les lymphocytes T *ex vivo* des splénocytes (A, C) et du lavage péritonéal (B, D) des souris C57Bl/6 injectées avec des EL4 à 2.10^6 cellules/mL et traitées à J7 par SuperMApo en intrapéritonéal (1 mL, répété à 48h), ont été étudiés par cytométrie en flux parmi les CD45+, 3 à 4 expériences, données représentatives en nombre, 15 à 20 souris/groupe, $p = ns$ (*t* test) (A, B, C, D). Le dosage de la réponse en IFN- γ a été évalué par ELISA sur le plasma ; 1 expérience, 5 souris/groupe, $p = ns$ (*t* test) (E), par ELISA sur les splénocytes restimulés pendant 48h par les cellules cancéreuses irradiées (4:1) ; 2 expériences, 10 souris/groupe, $p = 0,052$ (*t* test), données représentées / vehicule 100 %, Δ = cellules stimulées – non stimulées (F), par ELISA sur les cellules du lavage péritonéal restimulées pendant 72h par les cellules cancéreuses irradiées (4:1) ; 1 expérience, 5 souris/groupe, $p = ns$ (*t* test), Δ = cellules stimulées – non stimulées (G), par ELISpot sur les splénocytes, restimulés pendant 72h par les cellules cancéreuses irradiées (4:1), données en taille moyenne de spot, 1 expérience, 5 souris/groupe, $p = ns$ (*t* test) (H) Données en nombre de spots (I). La réponse spécifique des CD4+ a été étudiée par ELISA après restimulation pendant 72h avec le peptide OVA₃₂₃₋₃₃₉ (10 mg/mL) pour les splénocytes 1 expérience, 5 souris/groupe, * $p < 0,05$ (*t* test), Δ = cellules stimulées – non stimulées (J) et pour les cellules des ganglions mésentériques 1 expérience, 5 souris/groupe, $p = ns$ (*t* test), Δ = cellules stimulées – non stimulées (K), et pour les CD8+ avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (10 mg/mL) pour les ganglions mésentériques, 1 expérience, 5 souris/groupe, $p = 0,055$ (*t* test) (L). Données en moyennes \pm SEM.

6. ANNEXE : *“Pro-resolving factor administration limits cancer progression by enhancing immune response against cancer cells”*

L'étude des mécanismes anti-tumoraux suite à l'administration des facteurs pro-résolutifs a fait l'objet de résultats complémentaires. Ces résultats complémentaires sont inclus dans l'article : *“Pro-resolving factor administration limits cancer progression by enhancing immune response against cancer cells”*. Cet article a été soumis avec succès à la revue internationale à comité de lecture *Frontiers in Immunology*. Il résume les principaux points développés dans la Partie II, ainsi que les résultats complémentaires.

Pro-resolving factor administration limits cancer progression by enhancing immune response against cancer cells

1 Audrey Wetzel^{1,2}, Francis Bonnefoy^{1,2}, Cécile Chagué¹, Mathieu Vetter¹, Mélanie Couturier²,
2 Blandine Baffert¹, Olivier Adotevi^{1,3}, Philippe Saas¹, Sylvain Perruche^{1,2*}

3 ¹Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, RIGHT Interactions Greffon-
4 Hôte-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, LabEx LipSTIC, F-25000 Besançon, France;

5 ²MED'INN'Pharma, F-25000 Besançon, France;

6 ³Oncologie médicale, CHU Besançon, F-25000 Besançon, France.

7 * Correspondence:

8 Dr. Sylvain Perruche

9 INSERM U1098 RIGHT

10 8, rue du Docteur Jean-François-Xavier Girod

11 BP1937, F-25025 Besançon CEDEX

12 sylvain.perruche@inserm.fr

13 **Keywords:** cancer, inflammation, pro-resolving factors, anti-tumor response, macrophages

14 Abstract

15 Cancers are consequences of cellular dysfunction leading to an aberrant cellular multiplication and
16 proliferation, subsequently yielding metastasis formation. Inflammatory reaction, with immune cell
17 recruitment, is the main defense against precancerous lesions. However, inflammatory environment is
18 also favors cancer cells to progress, with cancer cell evasion from the immune surveillance, leading to
19 cancer development. Currently, therapeutic strategies enhance this natural immune response in order
20 to restore immunosurveillance. The variety of these strategies is a predominant source of inflammatory
21 mediators used by cancer cells to grow, differentiate and migrate, therefore encouraging metastasis
22 formation. For this reason, during cancer progression, limiting inflammation appears an innovative
23 strategy to avoid the escape of cancer cells and may enhanced efficacy of anti-tumor therapeutics.
24 Thus, this study aims to investigate the impact of pro-resolving factors administration, inducers of
25 inflammation resolution, in the framework of cancer treatment. We have observed that the
26 administration of pro-resolving mediators issued from apoptotic cell efferocytosis by macrophages
27 control peritoneal cancer progression by limiting cancer cell dissemination to blood and mesenteric
28 lymph node. This observation has been linked to an increase of macrophage mobilization in both
29 peritoneal cavity and mesenteric lymph nodes. This control is associated to a restricted
30 immunosuppressive myeloid cell circulation and to an IFN- γ specific anti-tumor T cell response.
31 Altogether, these results suggest that pro-resolving factor administration could provide a new
32 additional therapeutic alternative to control cancer progression.

33

34 1 INTRODUCTION

35 Inflammation is a natural process of the body to fight against aggressions like infections, but also
36 against cancer cells. Naturally, inflammation is characterized by an inflammatory response, which self-
37 resolves allowing return to homeostasis (1-5). During cancer editing, immune cells recognize tumor
38 antigen to eliminate the cancer cells and at least tumor (6-8). This process is called
39 immunosurveillance. The first key cells contributing to this elimination are myeloid cells (9, 10).
40 Resident cells (macrophages and dendritic cells) react to tumor antigen and initiate the inflammation
41 by inflammatory mediator's secretion, such as cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) (11). This inflammatory
42 microenvironment favors other immune cell recruitment, such as monocytes, which differentiate into
43 inflammatory cells. Into the tumor, activated myeloid cells drive the antigen presentation to lymphoid
44 organ so that to stimulate T cells, to enhance adaptive immunity against cancer cells, and to ultimately
45 kill them at the tumor site (12-15).

46 Although, inflammation is a necessary step for immunosurveillance, persistent and non-resolved
47 inflammation trigger cancer progression. Intrinsic inflammation during immunosurveillance is a source
48 of pro-inflammatory mediators (cytokines, DAMPs, growth factors) (16, 17). This rich inflammatory
49 environment is used by cancer cell to progress by growing, migrating and therefore encouraging
50 metastasis formation (16-18). Thus, cancer is often defined "wound that never heals" (19, 20). Finally,
51 this escape favor an immunosuppressive environment from cancer cells but also immune cells, leading
52 to a global shut down of the immune system (named cold tumor).

53 Yet, current therapeutic strategies (radio-, chemo-, immuno-therapies) target this cold tumor to restore
54 an immunosurveillance stage (21-23). Unfortunately, these approaches are also responsible of rich
55 inflammatory environment, which contribute to the persistence of tumor cells (cytokine syndrome
56 release, metastasis, therapy resistance) (16, 17, 24-29). This observation was realized in 1956, known
57 as Révész effect (30, 31). To date, inflammatory response during cancer editing and anti-cancer therapy
58 is always controversial (32-34). Anti-inflammatory drugs and biologics targeting inflammation, has
59 been shown to reduce cancer cell proliferation, invasion-avoiding angiogenesis (34-39). For example
60 anti-IL-6 or anti-TNF- α antibodies, are respectively associated to a decrease of cytokine production,
61 avoiding immune cell recruitment and angiogenesis but also to decrease of immunosuppressive protein
62 (PD-L1) favoring T cell infiltration (11, 40-43). However, these different approaches, which are
63 inflammation antagonists, could lead to side effect and are not equivalent to inflammation resolution
64 approach (34, 35, 38, 40).

65 The factors issued from apoptotic cell elimination by macrophages, called SuperMApo, demonstrate
66 pro-resolutive properties (3). These pro-resolving factors, issued from efferocytosis, are able to
67 terminate inflammation and initiate tissue healing. *In vitro*, SuperMApo can reprogram myeloid cells
68 (3). And, in experimental models of inflammation, SuperMApo administration resolves ongoing
69 inflammation (3). Interestingly, in experimental cancer model, SuperMApo controls cancer
70 progression by limiting periphery colonization from cancer cells. This mechanism is associated to an
71 increase of anti-tumor macrophages mobilization leading to an increase of antigen-specific T cell anti-
72 tumor IFN- γ response and finally limiting the circulation of immunosuppressive myeloid cells. Our
73 data demonstrate that, during cancer progression, targeting inflammation, with pro-resolving factors,
74 represents an innovative strategy to avoid cancer cell escape.

75

76 2 MATERIALS AND METHODS

77 2.1 Cell line and culture condition

Pro-resolving factors limit cancer progression

78 The tumor cell lines EL4-luc (defined here as non-immunogenic) and E.G7-OVA were obtained from
79 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA, respectively TIB-39-LUC2 and
80 CRL). Cells were cultured under supplier recommendation. Tumor cell line EL4-luc (defined here as
81 immunogenic, UMR1098) was cultured in DMEM (GIBCO) 10% v/v fetal bovine serum (Life
82 Technologies), 1% v/v penicillin/streptomycin (Eurobio), 10 mM HEPES buffer (Lonza), 10 mM non-
83 essential amino acids (Biowest) and 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich). Cells were maintained
84 at an optimal concentration 0.1 to 1.10e6 cells/ml at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. For *in vitro* study,
85 cancer cells (2.10e4 cells/mL) were cultured with SuperMApo (ratio 1/2) during 24 to 48h. Cell growth
86 was analyzed by bioluminescence quantification with 0.075 mg/mL luciferin (Promega), viability by
87 staining with Fixable viability Dye (FVD, Invitrogen) and proliferation with Ki-67 (clone 16A8,
88 Biolegend). DAMPs were quantified after 24h of culture at 1.10e6 cells/mL.

89 2.2 Mice

90 Female Ly5.2 (Charles River), Ly5.1 (Charles River) and RAG γ ^{-/-} C57Bl/6 mice aged 7-24 weeks
91 were housed in filter-top cages with freely available food and sterile water (Plexx), at the UMR1098
92 Animal facility. All experimental studies complied with European legislation and were approved
93 under projects numbers #2019-001-SP-7PR by Animal ethic committee of Besançon (Comité
94 d'Ethique Bisontin en Experimentation Animale #58) and French Ministry of Higher Education,
95 Research and Innovation, authorities for the care and use of animals.

96 2.3 Lymphoma model and tumor growth evaluation

97 C57Bl/6 syngeneic animals received intraperitoneal injections of EL4 cell (immunogenic 4.4.10e6
98 cells per body kg and 4.4.10e4 cells per body kg for non-immunogenic cells) in 1 mL of phosphate-
99 buffered solution (PBS). Tumor progression was followed by bioluminescence quantification with
100 injection of 15 mg/ml luciferin (Promega) analyzed by IVIS Lumina III Series & Living Image
101 Software (PerkinElmer). C57Bl/6 syngeneic animals received intravenous injection of immunogenic
102 EL4 cells (1.10e6 cells) in 300 μ L of phosphate-buffered solution (PBS). Same procedure than
103 intraperitoneal model was used to follow cancer progression.

104 2.4 Treatments

105 SuperMApo was produced such as methods previously described (3). SuperMApo or vehicle (RPMI
106 or X vivo) were administrated at day 0, 4, or 7 after EL4 injection. Mice received 1 mL of SuperMApo
107 or vehicle repeated 48h later, in intraperitoneal.

108 2.5 Cell sorting, culture and analysis

109 Lymphoid organs, blood and peritoneal lavages were harvested and stimulated with 100 ng/mL of
110 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich), 4 μ g/mL of ionomycin (Sigma-Aldrich) and
111 4 μ L/mL of Golgi Plug (BD Biosciences) for T cells intracellular staining, or with 1 μ g/mL of LPS (E.
112 coli O55:B5, Sigma) and 1 μ L/mL of Golgi Plug (BD Biosciences) for APC intracellular staining,
113 during 4h. Cells were stained for CD4 (clone RM4-5, BD Biosciences), CD8 (clone 53-6.7, BD
114 Biosciences), CD11b (clone M1/70, BD Biosciences), CD45 (clone 30-F11, BD Biosciences), CD45.1
115 (clone A20, BD Biosciences), CD45.2 (clone 104, BD Biosciences), CD80 (clone 16-10A1, BD
116 Biosciences), CD86 (clone GL-1, Biolegend), CD152 (clone UC10-4F10-11, BD Biosciences), CD206
117 (clone C068C2, Sony), F4/80 (clone T45-2342, BD Biosciences), Ly-6G and Ly-6C (clone RB6-8C5,
118 BD Biosciences), I-A/I-E (clone M5/114.15.2, Biolegend), IFN- γ (clone XMG1.2, BD Biosciences),
119 IL-6 (clone MP5-20F3, BD Biosciences), Ki-67 (clone 16A8, Biolegend), Ly-6C (clone REA796,

120 Miltenyi), Ly-6G (clone REA526, Miltenyi), OVA (25-D1.16, Invitrogen), PD-L1 (clone 10F.9G2,
 121 Biolegend), TNF- α (clone MP6-XT22, BD Biosciences). For intracellular staining, cells were
 122 permeabilized and fixed with Foxp3 kit/transcription factor buffer set (Invitrogen) or BD
 123 cytofix/cytoperm (BD Biosciences). Cells mice harvesting were cultured with EL4 irradiated (35 Gy,
 124 ratio 4:1), or with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of OVA 257-264 (Invivogen), or with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OVA 323-339 peptides
 125 (Invivogen) during 48h and 72h, supernatants were used for ELISA quantification of IL-6 (Biolegend),
 126 IFN- γ (Biolegend), TGF- β (R&D systems), ATP (Novus Biologicals), HMGB1 (Novus Biologicals)
 127 and HSP70 (R&D systems) and ELISpot quantification of IFN- γ (Diacor) using commercial
 128 recommendations. Cell staining was analyzed by flow cytometry using BD LSRFortessa X-20 (BD
 129 Biosciences), ELISA plates were analyzed by Delfia EnVision (PerkinElmer) and ELISpot by
 130 Immunospot CTL system, Cellular Technology Limited (Immunospot).

131 2.6 Statistical Analysis

132 Data were represented with mean \pm SEM or individual. Some data pooled from different experiments
 133 are expressed as ratio of 100%, where 100% corresponds to the mean of each control group per
 134 experiment. Data distribution was studied by normality test (D'agostino and Pearson). Groups were
 135 compared with parametric tests (unpaired t test or ANOVA test including multiple comparison post-
 136 tests). For groups unfollowing normality distribution, non-parametric test were used (Mann-Whitney
 137 or One-Way ANOVA or Two-Way ANOVA test including multiple comparison post-tests). Value of
 138 $p < 0.05$ was considered with statistical significance using GraphPad Prism version 9 (GraphPad
 139 Software).

140

141 3 RESULTS

142 3.1 SuperMApo treatment controls cancer cell progression

143 In an experimental model of peritoneal cancer induced in C57Bl/6 mice injected with EL4 cancer cells
 144 into the peritoneal cavity, we evaluated the administration of pro-resolving factors (SuperMApo) at the
 145 time of cancer detection by luminescence. In this setting, we observed a reduced cancer progression
 146 compared to mice receiving vehicle for the next 2 weeks as attested by a reduced radiance observed in
 147 mice treated with SuperMApo *versus* control (Figure 1A-C). This was also observed when the tumor
 148 was introduced intravenously (Supplementary Figure 1). Interestingly, the control of tumor growth
 149 by pro-resolving factors was mostly observed in peripheral sites such as blood and mesenteric lymph
 150 nodes, where the number of EL4 cells was reduced notably in the mesenteric lymph nodes (Figure 1D,
 151 E). These data show that SuperMApo treatment limits cancer cell progression by preventing cancer
 152 cell progression to secondary sites.

153 3.2 Pro-resolving factors enhance anti-tumor immune cell response

154 Going deeper in the mechanisms sustaining the control of tumor growth, we observed *in vitro* that pro-
 155 resolving treatment had not a direct effect on EL4 cancer cell growth. Indeed, pro-resolving factors did
 156 not affected EL4 cell growth, proliferation and viability *in vitro* (Supplementary Figure 2). These
 157 data suggest that SuperMApo treatment requires third party cells to provide anti-tumor activity. Indeed,
 158 when the same peritoneal cancer model was used but in RAG $\gamma\text{c}^{-/-}$ mice (lacking T, B and NK cells),
 159 SuperMApo treatment revealed no anti-tumor effect, as attested by an increased radiance observed in
 160 mice treated with SuperMApo *versus* control (Figure 2A, B).

161 Immune cells are necessary to mediate SuperMApo effect. We additionally observed that, to be
 162 effective, SuperMApo treatment needs cancer cell-primed immune cells. Indeed, SuperMApo
 163 treatment administrated to immunocompetent C57Bl/6 mice, before the priming of immune cells by
 164 cancer cells (the same day than cancer cell injection), was not able to promote any anti-tumor effect,
 165 as attested by an increased radiance observed in mice treated with SuperMApo *versus* control (**Figure**
 166 **2C, D**). These observations suggest that providing pro-resolving factors during cancer cell priming of
 167 T cells enhanced the control of tumor cell growth.

168 We further addressed cancer cell priming of immune cells by using another EL4 cancer cell line,
 169 defined as non-immunogenic. Indeed this cell line weakly expressed the co-stimulatory molecules I-
 170 A/I-E, CD80 and CD86, the immunosuppressive molecules CTLA-4 and PD-L1, and did not expressed
 171 the DAMPs HSP70, HMGB1 and ATP (**Supplementary Figure 3A-C**). Thus, using this non-
 172 immunogenic EL4 cell line, SuperMApo treatment failed to control cancer cell progression while it
 173 controlled immunogenic tumor cell line growth (**Supplementary Figure 3D, E**). Interestingly, in this
 174 context, we observed that SuperMApo treatment did not further enhanced the immunogenicity of the
 175 immunogenic tumor cell line to control its growth (**Supplementary Figure 4A, B**).

176 Altogether, these data show that the control of intraperitoneal tumor progression by pro-resolving
 177 factors is dependent on lymphoid cells primed by immunogenic tumor cells.

178 3.3 SuperMApo triggers early macrophage activation

179 Macrophages play an important role in tumor progression but also in the resolution of inflammation.
 180 We then looked at that population in our model of cancer cell peritoneal injection since they might be
 181 preferentially target by pro-resolutive factors (3). Three days after the administration of pro-resolving
 182 factors, we observed a tendency of CD11b⁺F4/80⁺ macrophages to mobilize in the peritoneal cavity
 183 and in the draining lymph nodes (**Figure 3A**). Importantly, we observed a significant predominance
 184 number of matured IA/IE⁺CD11b⁺F4/80⁺ macrophages within the draining lymph nodes of tumor
 185 bearing mice treated with SuperMApo (**Figure 3B**). Furthermore, the treatment induced a significant
 186 increase in the draining lymph nodes of the number of macrophages positive for model antigen OVA
 187 harbored by tumor cells (**Figure 3C**). This increase number of matured IA/IE⁺CD11b⁺F4/80⁺
 188 macrophages in the draining lymph nodes was maintained until time of sacrifice, 15 days after
 189 treatment (**Figure 3D, E**). Of note, matured macrophages were never observed increased in the model
 190 with the non-immunogenic cell line despite SuperMApo treatment (**Supplementary Figure 5**). Thus,
 191 SuperMApo treatment favors macrophages maturation and presentation of tumor cell-derived antigen.

192 Interestingly, accumulation of matured macrophages presenting tumor cell-derived antigen within the
 193 draining lymph nodes of mice controlling tumor cell growth after SuperMApo treatment was correlated
 194 with the reduction of peripheral pro-tumoral macrophages as attested by significant reduced blood
 195 counts of IL-6⁺, TNF- α ⁺, CD206⁺ and PDL1⁺ macrophage subsets (**Figure 4** and **Supplementary**
 196 **Figure 6**). In addition, IL-6 concentration was also decreased in plasma and ascite liquid
 197 (**Supplementary Figure 6**).

198 Altogether, these data indicate that SuperMApo treatment targets macrophages, favoring macrophage
 199 maturation and their presentation of tumor cell-derived antigen within the draining lymph nodes and
 200 preventing circulation of immunosuppressive pro-tumoral macrophages.

201 3.4 Activated macrophages enhanced T cell anti-tumor response

202 Because macrophages demonstrated enhanced presentation of tumor cell-derived antigen, we then
 203 focused our study on T cells. Three days after treatment, the time where we observed mature tumor
 204 antigen-presenting macrophages; we observed an enhanced T cell response in the spleen. Indeed, we

205 observed an OVA-specific CD4⁺ and CD8⁺ IFN- γ T cell responses only in mice receiving SuperMApo
 206 (Figure 5A and Supplementary Figure 7). This SuperMApo-induced tumor-specific T cell response
 207 was maintained over time since fifteen days post-treatment, IFN- γ was quantified higher in the serum
 208 of treated mice (Figure 5B). In addition, a sustained IFN- γ response was observable at that time post-
 209 treatment (Figure 5C, D), which is associated to enrichment in the spleen and mesenteric lymph nodes
 210 of antigen-specific IFN- γ ⁺ T cells (Figure 5E, F). Interestingly, this increase of the IFN- γ response
 211 seemed to be associate to a higher capacity of T cells to release IFN- γ but not to an increase in the
 212 proportion of IFN- γ ⁺ T cells (Figure 5G-I and Supplementary Figure 8).

213 Altogether, these data show an early and enhanced IFN- γ T cell response post-SuperMApo treatment,
 214 specific to tumor antigen and disseminate to the originate tumor tissue and lymphoid organs.

215 4 DISCUSSION

216 Here, we provide data showing that pro-resolving factors administration was able to control cancer
 217 progression, in particular the dissemination of cancer cells by enhancing existing immune response.
 218 We have shown that SuperMApo treatment implicated macrophage mobilization and activation.
 219 Macrophage deployment was associated with an increase of IFN- γ ⁺ T cell anti-tumor response.
 220 Additionally, we have demonstrated that enhancing existing immune response with pro-resolving
 221 factors prevented pro-tumoral macrophage circulation. This highlights the use of pro-resolving factors,
 222 especially here SuperMApo, as a new therapeutic approach against cancer propagation.

223 First, we demonstrated that pro-resolving factor administration controlled peritoneal cancer
 224 progression, in the peritoneal cavity but more importantly limiting cancer cell progression outside the
 225 peritoneal cavity. Indeed, SuperMApo treatment prevented cancer cell accumulation in the blood and
 226 in the mesenteric lymph nodes. Currently, only few studies evaluate the benefice of the use of pro-
 227 resolving factors to target cancer cell progression and are restricted to the use of specialized-pro-
 228 resolving lipid mediators (SPM). Resolvins have been shown to suppress tumor growth (38, 44-51).
 229 These observations have been mostly done in solid cancer model, but few for liquid cancer (44).
 230 Interestingly, resolvins have been shown to be implicated in metastasis formation. Mice knockout for
 231 the resolvin receptor, ALX/FPR2, demonstrated a higher spontaneous metastasis growth after tumor
 232 resection than wild type mice (44) and resolvin injection after intravenous B16 cell injection, limited
 233 metastasis formation (44). While the SPM content of SuperMApo is limited (data not showed),
 234 triggering resolution by this complex biological product also limited cancer progression. Indeed, only
 235 arachidonic and docosahexaenoic acid have been quantified in SuperMApo which may initiate the
 236 synthesis of SPM *in vivo*, participating to control of tumor cell escape as described for resolvin.

237 Then, we observed that SuperMApo's anti-tumor effect was dependent on existing host immune cell
 238 response specific to cancer cells. Myeloid cells, and especially macrophages, are both sentinel cells
 239 controlling tissue hemostasis and also regulators of pro-tumor inflammation due to their plasticity (52,
 240 53). Indeed, macrophages have pro- but also anti-tumor properties (18, 52-54). Tumor associated
 241 macrophages (TAM) are associated with a poor prognosis in cancer (18, 27, 31, 52, 53, 55, 56). TAM
 242 controlled circulating cancer cell recruitment to the primary tumors, and are implicated in the
 243 metastatic cascade (31, 53, 55, 57, 58). Several studies have shown that targeting macrophages
 244 improved cancer outcome, either by depleting them with clodronate liposome injection for instance,
 245 blocking the phagocytosis pathway, inhibiting their recruitment (CXCR2/CCL2 pathway blocking),
 246 targeting CD47, or by reprogramming them toward an anti-tumoral phenotype (11, 27, 52, 53, 57, 59).
 247 Anti-inflammatory approach in cancer, such as aspirin, has been shown to trigger specialized pro-
 248 resolving mediator production that stimulate cancer resolution by targeting macrophage subsets (38).
 249 Specialized pro-resolving lipid mediators have been described to favor the switch of TAM with pro-

250 inflammatory phenotype (M1) to pro-resolving macrophages (M2) limiting CD206 expression, TNF-
251 α and IL-6 secretion (38, 47, 52, 60). In addition, pro-resolving mediators such as SPM can trigger an
252 increase of phagocytosis from macrophages (3, 38, 44, 52). Thus, macrophages are key cells in cancer
253 progression, from escape to immune surveillance. We have demonstrated that SuperMApo pro-
254 resolving properties, allowed the reprogramming of antigen presenting cells (APC) (3). Here, we show
255 that in a peritoneal cancer model, SuperMApo treatment triggered early mobilization and activation of
256 macrophages. Interestingly this conversion toward anti-tumor macrophages seemed to prevent
257 inflammatory circulating and immunosuppressive macrophages over time. These observations suggest
258 that SuperMApo treatment could enhance an immune surveillance by macrophages without inducing
259 immunosuppressive environment and, finally, preventing immunosuppressive escape by reducing IL-
260 6 as described (53).

261 We also observed that SuperMApo product was ineffective to control cancer cell progression in the
262 absence of B, T and NK cells in a RAG γ -c environment. Indeed, SuperMApo triggered an early IFN-
263 γ T cell response, sustained in time. Strategies targeting inflammation to prevent an adequate
264 microenvironment for tumor growth and escape, have been concentrated on myeloid cells, mostly.
265 Again, the depletion of macrophages increased CD8⁺ T cells and impairment of phagocytosis was
266 associated with an increased IFN- γ T cell response (57, 59). In murine models, anti-inflammatory drugs
267 have been associated with a more important CD4/CD8 T cell infiltration in spleen after tumor rejection
268 (49). In contrast, radio-chemotherapy approaches were associated to an increase in the IFN- γ response
269 (21, 28, 61), IFN- γ that is responsible of pro-tumor TAM phenotype commitment (58). In the context
270 of SuperMApo, composed of pro-resolving mediators including TGF- β and IL-10 (3), we did not
271 inhibited the specific anti-tumor response from T cells. Indeed, SuperMApo injection restored and
272 enhanced a specific anti-tumor IFN- γ response that was correlated to the induction of macrophages
273 highly expressing class II and tumor-derived antigen. In addition, pro-tumor macrophages phenotype
274 decreased with a low level of IL-6, suggesting the anti-tumor role of SuperMApo treatment.

275 In summary, this work demonstrated that SuperMApo disrupted cancer cell progression, preventing
276 cancer cell delocalization from the primary tumor site by enhancing pre-existing anti-tumor immune
277 cell response. SuperMApo treatment triggered macrophage mobilization and activation that enhanced
278 a specific IFN- γ anti-tumor T cell response, without increasing immunosuppressive myeloid cells.
279 These observations revealed the beneficial impact of pro-resolving mediators in cancer progression.
280 Interestingly, these results opened new opportunities toward pro-resolving mediator role in cancer
281 treatment. Thus, SuperMApo treatment appears to be a potential new therapeutic strategy to fight
282 against cancer.

283

284 5 CONFLICT OF INTEREST

285 FB, MC, PS, and SP are shareholders of MED'INN'Pharma and FB, MC, AW and SP are employed
286 by MED'INN'Pharma developing the SuperMApo drug. All authors declare that the research was
287 conducted in the absence of any commercial and financial relationships that could be interpreted as
288 conflict of interest.

289

290 6 AUTHOR CONTRIBUTIONS

291 SP, and AW conceived and designed the study. AW performed and analyzed the experiments. FB and
292 CC participated to experiments and helped for analysis. MV and BB participated to some experiments.

293 MC and PS helped for design, analysis and interpretation to some experiments. AW and SP wrote the
294 manuscript. SP and OA supervised the study. All authors discussed the results and the manuscript.

295

296 7 FUNDING

297 This work is supported by LipSTIC LabEx, MiMedI, Bourgogne-France Comté region. AW was
298 supported by a doctoral fellowship from the Association Nationale de la Recherche et de la
299 Technologie (ANRT 2017/1322/2017) with MED'INN'Pharma. CC was supported by a doctoral
300 fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la
301 Recherche.

302

303 8 ACKNOWLEDGMENTS

304 We thank TIM-C group for advices and providing cellular material; Jean-René Pallandre for provided
305 murine cancer cell lines and RAG γ ^{-/-} mice, Sabeha Büchle and Laurie Spelner for cell irradiation and
306 ELISpot analysis. We thank also the animal technicians group for taking care of the mice.

307

308 9 REFERENCES

- 309 1. Kourtzelis I, Hajishengallis G, Chavakis T. Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of
310 Inflammation. *Frontiers in immunology*. 2020;11:553.
- 311 2. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat*
312 *Immunol*. 2005;6(12):1191-7.
- 313 3. Bonnefoy F, Gauthier T, Vallion R, Martin-Rodriguez O, Missey A, Daoui A, et al. Factors
314 Produced by Macrophages Eliminating Apoptotic Cells Demonstrate Pro-Resolutive Properties and
315 Terminate Ongoing Inflammation. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2586.
- 316 4. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*.
317 2014;510(7503):92-101.
- 318 5. Serhan CN. Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding
319 resolution mediators and mechanisms. *FASEB journal : official publication of the Federation of*
320 *American Societies for Experimental Biology*. 2017;31(4):1273-88.
- 321 6. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from
322 immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991-8.
- 323 7. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and
324 its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology*.
325 2014;27:16-25.
- 326 8. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune
327 escape. *Immunology*. 2007;121(1):1-14.
- 328 9. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert*
329 *reviews in molecular medicine*. 2011;13:e23.

Pro-resolving factors limit cancer progression

- 330 10. Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiological reviews*.
331 2019;99(2):1223-48.
- 332 11. Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, et al. Inflammation and tumor progression:
333 signaling pathways and targeted intervention. *Signal transduction and targeted therapy*. 2021;6(1):263.
- 334 12. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*.
335 2013;39(1):1-10.
- 336 13. Pluhar GE, Pennell CA, Olin MR. CD8⁺ T Cell-Independent Immune-Mediated Mechanisms
337 of Anti-Tumor Activity. *Critical reviews in immunology*. 2015;35(2):153-72.
- 338 14. Cogdill AP, Andrews MC, Wargo JA. Hallmarks of response to immune checkpoint blockade.
339 *British journal of cancer*. 2017;117(1):1-7.
- 340 15. Workenhe ST, Pol J, Kroemer G. Tumor-intrinsic determinants of immunogenic cell death
341 modalities. *Oncoimmunology*. 2021;10(1):1893466.
- 342 16. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*.
343 2010;140(6):883-99.
- 344 17. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.
- 345 18. Martin P, Gurevich DB. Macrophage regulation of angiogenesis in health and disease. *Seminars
346 in cell & developmental biology*. 2021.
- 347 19. Deyell M, Garris CS, Laughney AM. Cancer metastasis as a non-healing wound. *British journal
348 of cancer*. 2021;124(9):1491-502.
- 349 20. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet (London,
350 England)*. 2001;357(9255):539-45.
- 351 21. Lauret Marie Joseph E, Kirilovsky A, Lecoester B, El Sissy C, Boullerot L, Rangan L, et al.
352 Chemoradiation triggers antitumor Th1 and tissue resident memory-polarized immune responses to
353 improve immune checkpoint inhibitors therapy. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2021;9(7).
- 354 22. Zhang J, Endres S, Kobold S. Enhancing tumor T cell infiltration to enable cancer
355 immunotherapy. *Immunotherapy*. 2019;11(3):201-13.
- 356 23. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*.
357 2017;541(7637):321-30.
- 358 24. Showalter A, Limaye A, Oyer JL, Igarashi R, Kittipatarin C, Copik AJ, et al. Cytokines in
359 immunogenic cell death: Applications for cancer immunotherapy. *Cytokine*. 2017;97:123-32.
- 360 25. Giavridis T, van der Stegen SJC, Eyquem J, Hamieh M, Piersigilli A, Sadelain M. CAR T cell-
361 induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade. *Nature
362 medicine*. 2018;24(6):731-8.
- 363 26. Karki R, Kanneganti TD. The 'cytokine storm': molecular mechanisms and therapeutic
364 prospects. *Trends in immunology*. 2021.
- 365 27. Grégoire H, Roncali L, Rousseau A, Chérel M, Delneste Y, Jeannin P, et al. Targeting Tumor
366 Associated Macrophages to Overcome Conventional Treatment Resistance in Glioblastoma. *Frontiers
367 in pharmacology*. 2020;11:368.
- 368 28. Dosset M, Vargas TR, Lagrange A, Boidot R, Végran F, Roussey A, et al. PD-1/PD-L1
369 pathway: an adaptive immune resistance mechanism to immunogenic chemotherapy in colorectal
370 cancer. *Oncoimmunology*. 2018;7(6):e1433981.

Pro-resolving factors limit cancer progression

- 371 29. Morad G, Helmink BA, Sharma P, Wargo JA. Hallmarks of response, resistance, and toxicity
372 to immune checkpoint blockade. *Cell*. 2021;184(21):5309-37.
- 373 30. Revesz L. Effect of tumour cells killed by x-rays upon the growth of admixed viable cells.
374 *Nature*. 1956;178(4547):1391-2.
- 375 31. Deng J, Yang H, Haak VM, Yang J, Kipper FC, Barksdale C, et al. Eicosanoid regulation of
376 debris-stimulated metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*
377 *America*. 2021;118(41).
- 378 32. Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention
379 and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clinical cancer research : an official journal of*
380 *the American Association for Cancer Research*. 2009;15(2):425-30.
- 381 33. Awad RM, De Vlaeminck Y, Maebe J, Goyvaerts C, Breckpot K. Turn Back the TIME:
382 Targeting Tumor Infiltrating Myeloid Cells to Revert Cancer Progression. *Frontiers in immunology*.
383 2018;9:1977.
- 384 34. Zhang Q, Zhu B, Li Y. Resolution of Cancer-Promoting Inflammation: A New Approach for
385 Anticancer Therapy. *Frontiers in immunology*. 2017;8:71.
- 386 35. Fishbein A, Hammock BD, Serhan CN, Panigrahy D. Carcinogenesis: Failure of resolution of
387 inflammation? *Pharmacology & therapeutics*. 2021;218:107670.
- 388 36. Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB. Inflammation and cancer.
389 *Annals of African medicine*. 2019;18(3):121-6.
- 390 37. Todoric J, Antonucci L, Karin M. Targeting Inflammation in Cancer Prevention and Therapy.
391 *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)*. 2016;9(12):895-905.
- 392 38. Gilligan MM, Gartung A, Sulciner ML, Norris PC, Sukhatme VP, Bielenberg DR, et al.
393 Aspirin-triggered proresolving mediators stimulate resolution in cancer. *Proceedings of the National*
394 *Academy of Sciences of the United States of America*. 2019;116(13):6292-7.
- 395 39. Marelli G, Sica A, Vannucci L, Allavena P. Inflammation as target in cancer therapy. *Current*
396 *opinion in pharmacology*. 2017;35:57-65.
- 397 40. Diakos CI, Charles KA, McMillan DC, Clarke SJ. Cancer-related inflammation and treatment
398 effectiveness. *Lancet Oncol*. 2014;15(11):e493-503.
- 399 41. Montfort A, Colacios C, Levade T, Andrieu-Abadie N, Meyer N, Ségui B. The TNF Paradox
400 in Cancer Progression and Immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1818.
- 401 42. Bertrand F, Montfort A, Marcheteau E, Imbert C, Gilhodes J, Filleron T, et al. TNF α blockade
402 overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. *Nature communications*.
403 2017;8(1):2256.
- 404 43. Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, Lenoir J, et al. Tumor-associated leukemia
405 inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells.
406 *Blood*. 2007;110(13):4319-30.
- 407 44. Sulciner ML, Serhan CN, Gilligan MM, Mudge DK, Chang J, Gartung A, et al. Resolvins
408 suppress tumor growth and enhance cancer therapy. *The Journal of experimental medicine*.
409 2018;215(1):115-40.
- 410 45. Wang Z, Cheng Q, Tang K, Sun Y, Zhang K, Zhang Y, et al. Lipid mediator lipoxin A4 inhibits
411 tumor growth by targeting IL-10-producing regulatory B (Breg) cells. *Cancer letters*. 2015;364(2):118-
412 24.

Pro-resolving factors limit cancer progression

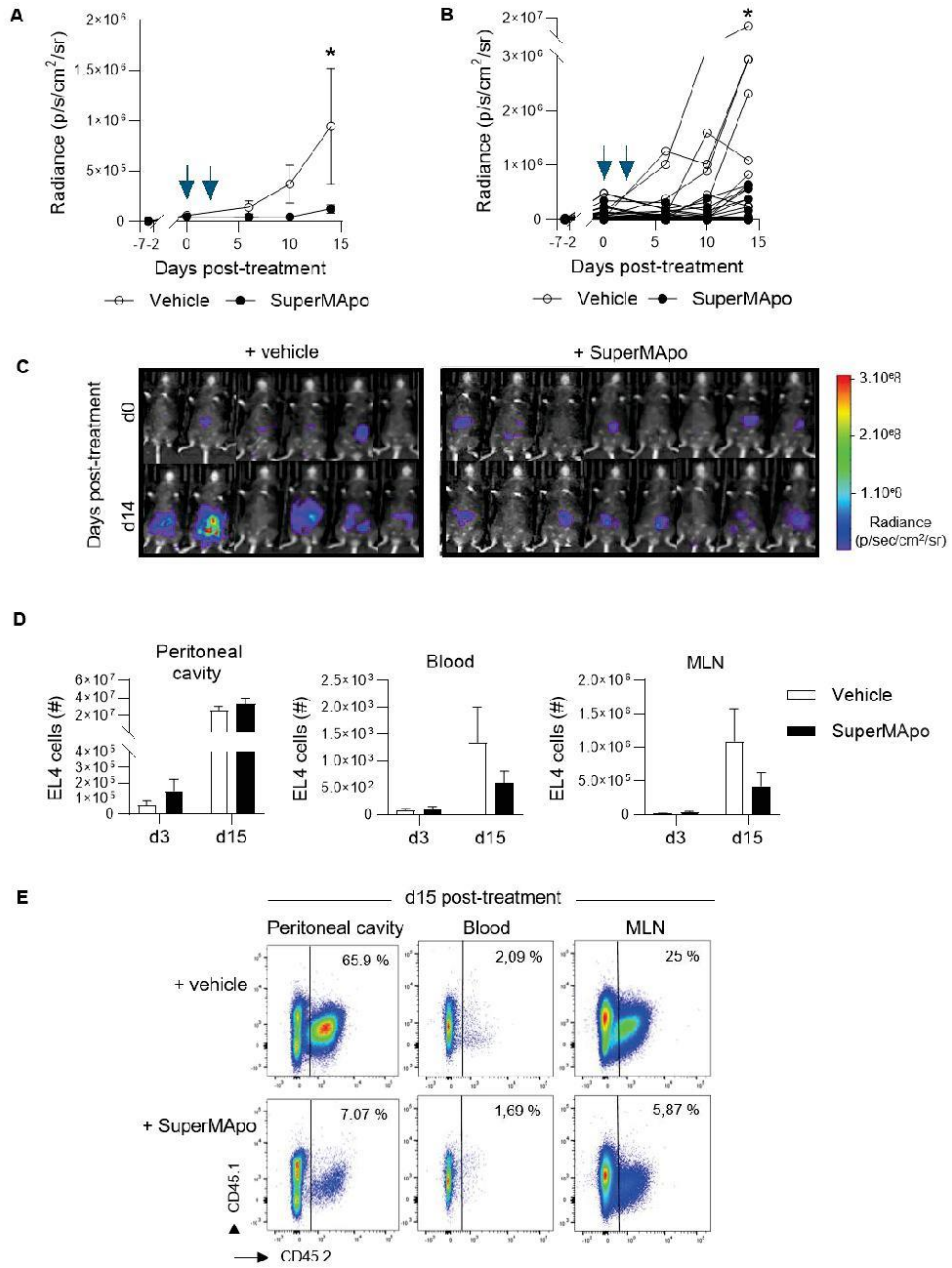
- 413 46. Chen Y, Hao H, He S, Cai L, Li Y, Hu S, et al. Lipoxin A4 and its analogue suppress the tumor
414 growth of transplanted H22 in mice: the role of antiangiogenesis. *Molecular cancer therapeutics*.
415 2010;9(8):2164-74.
- 416 47. Simões RL, De-Brito NM, Cunha-Costa H, Morandi V, Fierro IM, Roitt IM, et al. Lipoxin A(4)
417 selectively programs the profile of M2 tumor-associated macrophages which favour control of tumor
418 progression. *International journal of cancer*. 2017;140(2):346-57.
- 419 48. Zong L, Li J, Chen X, Chen K, Li W, Li X, et al. Lipoxin A4 Attenuates Cell Invasion by
420 Inhibiting ROS/ERK/MMP Pathway in Pancreatic Cancer. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
421 2016;2016:6815727.
- 422 49. Panigrahy D, Gartung A, Yang J, Yang H, Gilligan MM, Sulciner ML, et al. Preoperative
423 stimulation of resolution and inflammation blockade eradicates micrometastases. *The Journal of*
424 *clinical investigation*. 2019;129(7):2964-79.
- 425 50. Liu H, Zeng J, Huang W, Xu Q, Ye D, Sun R, et al. Colorectal Cancer Is Associated with a
426 Deficiency of Lipoxin A(4), an Endogenous Anti-inflammatory Mediator. *Journal of Cancer*.
427 2019;10(19):4719-30.
- 428 51. de-Brito NM, da-Costa HC, Simões RL, Barja-Fidalgo C. Lipoxin-Induced Phenotypic
429 Changes in CD115(+)/LY6C(hi) Monocytes TAM Precursors Inhibits Tumor Development. *Frontiers*
430 *in oncology*. 2019;9:540.
- 431 52. Lavy M, Gauttier V, Poirier N, Barillé-Nion S, Blanquart C. Specialized Pro-Resolving
432 Mediators Mitigate Cancer-Related Inflammation: Role of Tumor-Associated Macrophages and
433 Therapeutic Opportunities. *Frontiers in immunology*. 2021;12:702785.
- 434 53. Güç E, Pollard JW. Redefining macrophage and neutrophil biology in the metastatic cascade.
435 *Immunity*. 2021;54(5):885-902.
- 436 54. Pessina A, Brambilla P, Mocarelli P. Modulation of EL-4 mouse lymphoma cell proliferation
437 by macrophages and tumor related factors. *Blut*. 1984;49(1):45-51.
- 438 55. Ramos RN, Rodriguez C, Hubert M, Ardin M, Treilleux I, Ries CH, et al. CD163(+) tumor-
439 associated macrophage accumulation in breast cancer patients reflects both local differentiation signals
440 and systemic skewing of monocytes. *Clinical & translational immunology*. 2020;9(2):e1108.
- 441 56. Paolini L, Adam C, Beauvillain C, Preisser L, Blanchard S, Pignon P, et al. Lactic Acidosis
442 Together with GM-CSF and M-CSF Induces Human Macrophages toward an Inflammatory Protumor
443 Phenotype. *Cancer immunology research*. 2020;8(3):383-95.
- 444 57. Caux C, Ramos RN, Prendergast GC, Bendriss-Vermare N, Ménétrier-Caux C. A Milestone
445 Review on How Macrophages Affect Tumor Growth. *Cancer research*. 2016;76(22):6439-42.
- 446 58. Jeannin P, Duluc D, Delneste Y. IL-6 and leukemia-inhibitory factor are involved in the
447 generation of tumor-associated macrophage: regulation by IFN- γ . *Immunotherapy*. 2011;3(4
448 Suppl):23-6.
- 449 59. Kosaka A, Ishibashi K, Nagato T, Kitamura H, Fujiwara Y, Yasuda S, et al. CD47 blockade
450 enhances the efficacy of intratumoral STING-targeting therapy by activating phagocytes. *The Journal*
451 *of experimental medicine*. 2021;218(11).
- 452 60. Shan K, Feng N, Cui J, Wang S, Qu H, Fu G, et al. Resolvin D1 and D2 inhibit tumour growth
453 and inflammation via modulating macrophage polarization. *Journal of cellular and molecular medicine*.
454 2020;24(14):8045-56.

Pro-resolving factors limit cancer progression

455 61. Jaime-Sanchez P, Uranga-Murillo I, Aguilo N, Khouili SC, Arias MA, Sancho D, et al. Cell
456 death induced by cytotoxic CD8(+) T cells is immunogenic and primes caspase-3-dependent spread
457 immunity against endogenous tumor antigens. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2020;8(1).

458

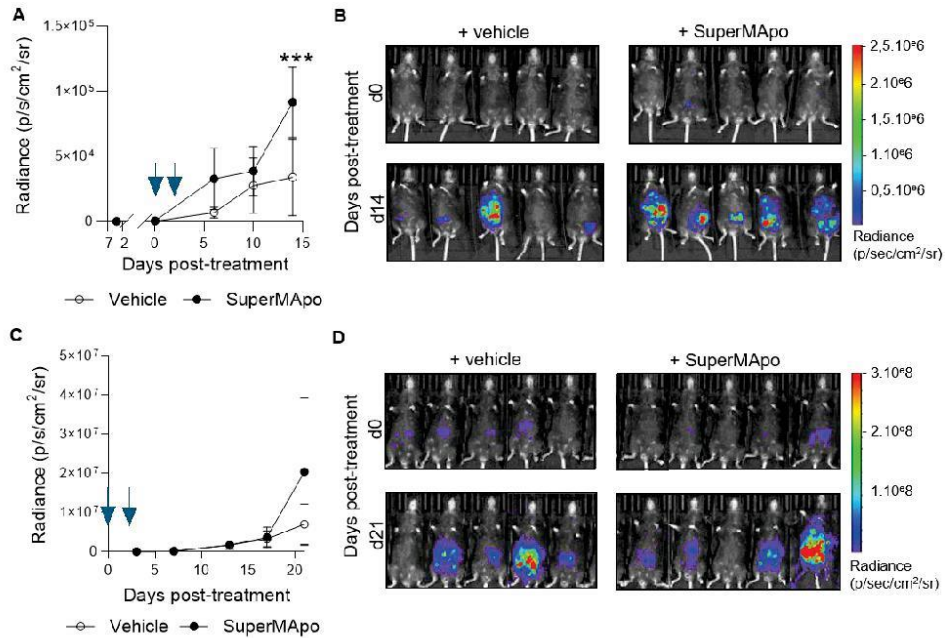
Pro-resolving factors limit cancer progression



459

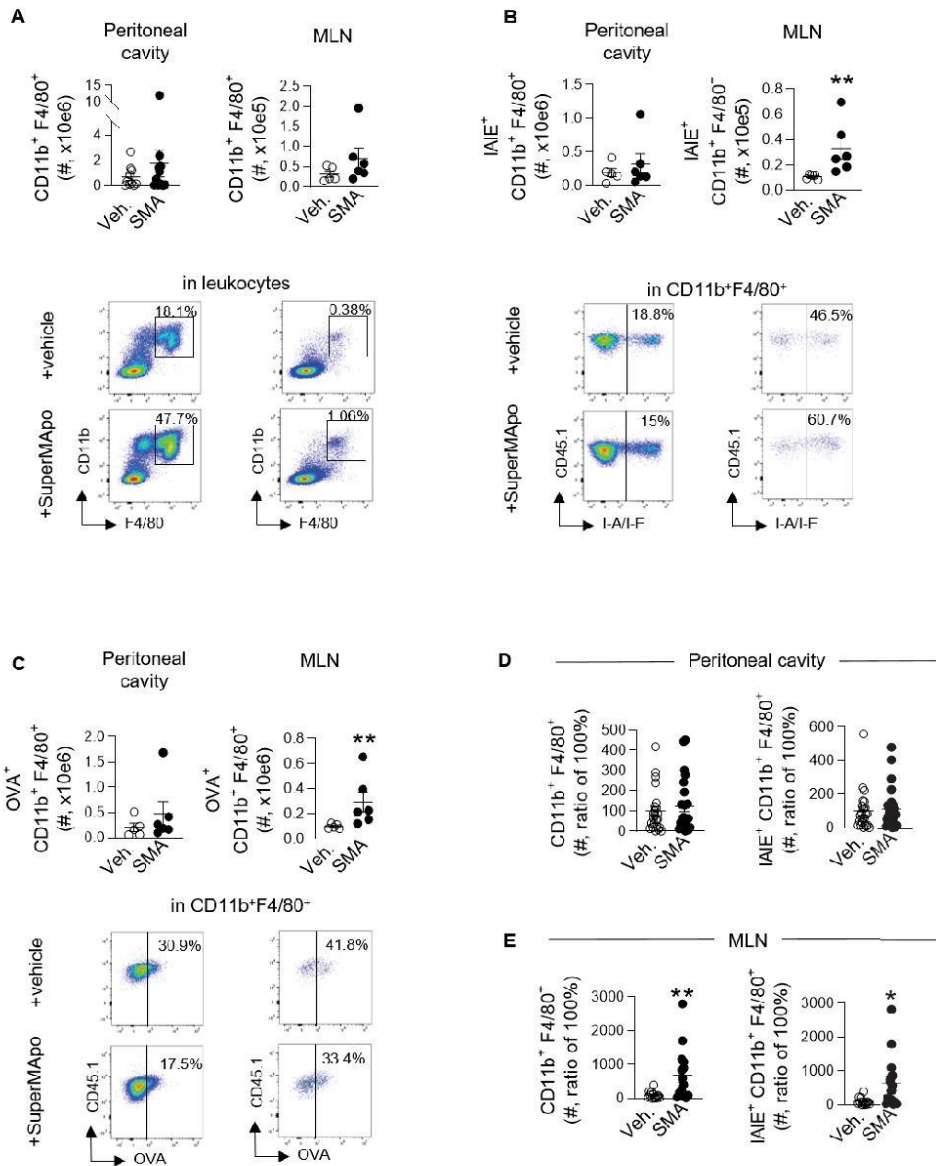
13

460 **FIGURE 1. SuperMApo treatment controls progression of peritoneal cancer model.** (A) C57Bl/6
461 mice received EL4 cancer cells in intraperitoneal 7 days before SuperMApo treatment (1 mL,
462 intraperitoneal, twice, with 48h of interval). Cancer cell progression was followed by bioluminescence
463 evaluation, once to twice a week with luciferin injection in intraperitoneal, radiance mean± SEM is
464 represented with 24 to 28 mice per group, (B) radiance per mice and (C) bioluminescence image
465 representation at day 3 and day 15 post treatment, 3 experiments, * $p < 0,05$ at day 2, two-way ANOVA
466 with Sidak's multiple comparison tests. (D, E) The number of EL4 cancer cell (CD45.1⁻ CD45.2⁺) was
467 determined by flow cytometry, 3 and 15 days post treatment in peritoneal cavity, blood and mesenteric
468 lymph nodes, mean± SEM of 5 to 34 mice per group from 1 to 3 experiments, $p = ns$, two-way ANOVA
469 with Sidak's multiple comparison tests.



470

471 **FIGURE 2. The control of tumor progression is dependent on lymphoid cells and enhances**
 472 **existing anti-tumor immune response.** (A) Immunodeficient RAGγc^{-/-} C57Bl/6 mice received EL4
 473 in intraperitoneal 7 days before SuperMApo treatment (1 mL, intraperitoneal, twice, with 48h of
 474 interval). Cancer cell progression was followed by bioluminescence evaluation, once to twice a week
 475 with luciferin injection in intraperitoneal, radiance mean± SEM is represented with 5 mice per group
 476 from 1 experiment, ****p* < 0,001 two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison tests and (B)
 477 bioluminescence image was represented at day 0 and day 14 post treatment. (C) EL4 bearing C57Bl/6
 478 mice treated by SuperMApo at day 0 (1 mL, intraperitoneal, twice, with 48h of interval) the same day
 479 than EL4 injection, radiance mean± SEM was represented with 5 mice per group from 1 experiment,
 480 *p*= ns two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison tests, and (D) bioluminescence image was
 481 represented at day 0 and day 21 post treatment.



482

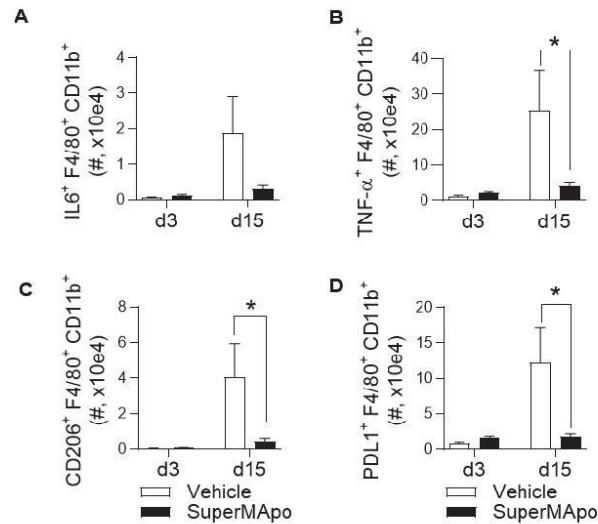
483 **FIGURE 3. SuperMApo treatment triggers early and sustained macrophage activation.** (A)
 484 Number of macrophages (CD11b⁺F4/80⁺) from C57BL/6 mice bearing immunogenic EL4 cells,
 485 treated by SuperMApo (1 mL, intraperitoneal, twice, with 48h of interval) were evaluated by flow
 486 cytometry at day 3 post-treatment in peritoneal cavity and mesenteric lymph nodes (MLN), mean±
 487 SEM of 5 to 11 mice from 1 to 2 experiments, *p*= ns, t test, (B) number of matured macrophages

This is a provisional file, not the final typeset article

Pro-resolving factors limit cancer progression

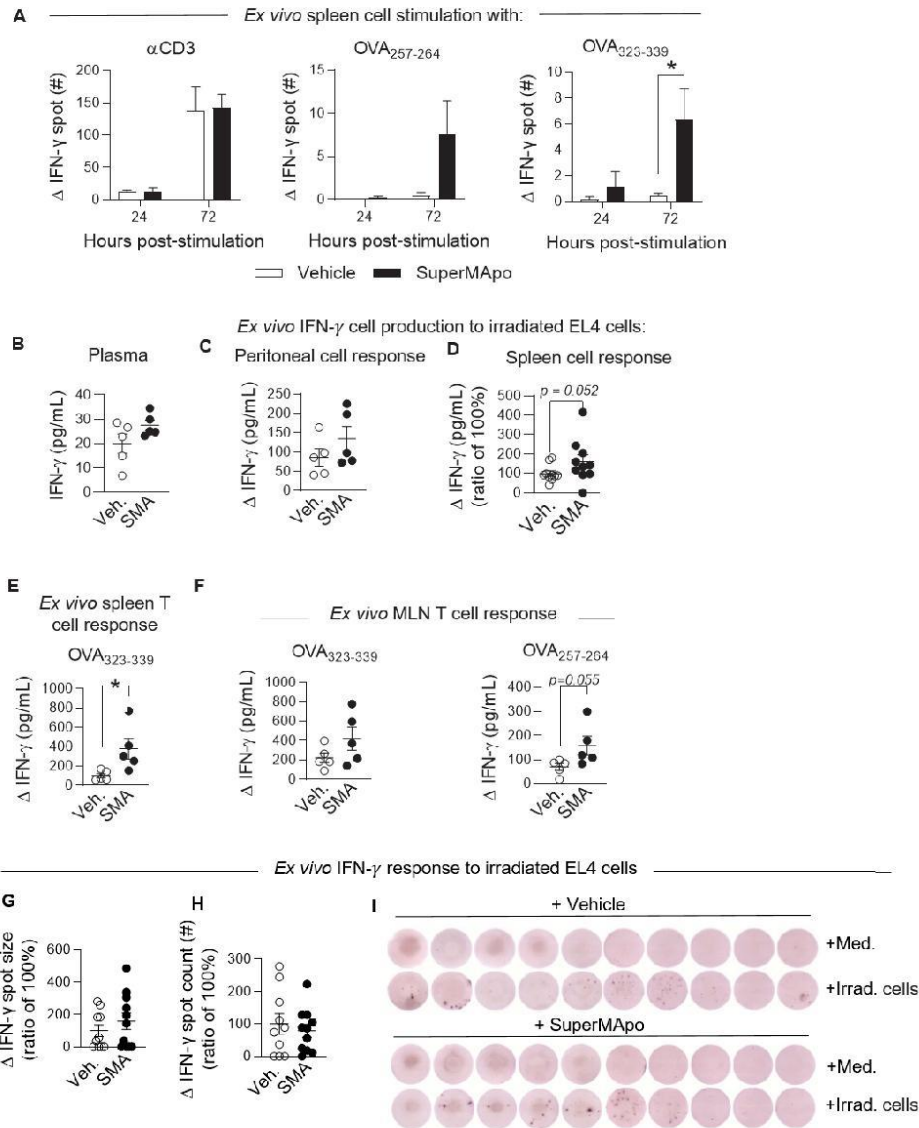
488 (IAIE⁺CD11b⁺F4/80⁺),), mean± SEM of 5 to 6 mice per group from 1 experiment, ** $p < 0,01$, t test,
489 (C) number of macrophages positive for model antigen OVA (OVA⁺CD11b⁺F4/80⁺), mean± SEM of
490 5 to 6 mice per group from 1 experiment, ** $p < 0,01$, t test.(D) number of macrophages subsets
491 (CD11b⁺F4/80⁺ and IAIE⁺CD11b⁺F4/80⁺) 15 days post-treatment in peritoneal cavity, mean± SEM of
492 13 to 14 mice per group from 2 experiments, p= ns, t test, and (E) in mesenteric lymph nodes, mean±
493 SEM of 8 to 9 mice per group from 1 experiment, ** $p < 0,01$, t test.

494



495

496 **FIGURE 4. Modifying macrophage subset prevents the emergence of circulating inflammatory**
 497 **and pro-tumor macrophages.** (A) Number of macrophages (CD11b⁺ F4/80⁺) secreting IL-6, from
 498 C57BL/6 mice bearing immunogenic EL4 cells and treated by SuperMApo (1 mL, intraperitoneal,
 499 twice, with 48h of interval) were evaluated by flow cytometry in kinetic (3 and 15 days post treatment)
 500 in blood sample, (B) number of macrophages secreting TNF- α ⁺, (C) number of macrophages
 501 expressing CD206⁺ and (D) number of macrophages expressing PD-L1⁺. Data were represented in
 502 mean \pm SEM of 5 to 6 mice per group from 1 experiment, * p < 0, 05, t test.



503

504 **FIGURE 5. Early type II IFN response is enhanced by SuperMApo treatment and conserved.**
 505 (A) IFN- γ response was evaluated from C57Bl/6 mice bearing immunogenic EL4 cells and treated by
 506 SuperMApo (1 mL, intraperitoneal, twice, with 48h of interval). Three days post treatment, splenocytes
 507 were stimulated during 24 or 72h with α -CD3, or OVA₂₅₇₋₂₆₄ (for CD8⁺ response) or OVA₃₂₃₋₃₃₉ (for
 508 CD4⁺ response). IFN- γ spot delta between non-stimulated (medium) and stimulated cell response is
 509 evaluated by ELISpot, mean \pm SEM of 5 to 6 mice per group from 1 experiment, * $p < 0, 05$, two-way

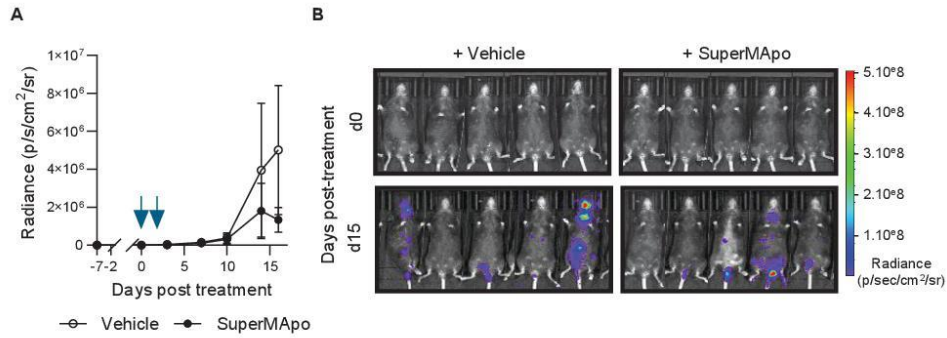
Pro-resolving factors limit cancer progression

510 ANOVA + Sidak's multiple comparison test. **(B)** 15 days post treatment, IFN- γ was quantified by
511 ELISA in plasma, mean \pm SEM is represented of 5 mice per group from 1 experiment, p = ns, t test, **(C)**
512 in peritoneal cavity, cells are stimulated during 72h with irradiated EL4 (4:1), Δ of response vs
513 unstimulated cells (medium), mean \pm SEM of 5 mice per group from 1 experiment, p = ns, t test, **(D)** in
514 spleen, cells are stimulated during 48h with irradiated EL4 (4:1), delta of response vs unstimulated
515 cells (medium), mean \pm SEM of 10 mice per group from 2 experiments, p = 0,052, t test. **(E)**
516 Quantification of T cell response was evaluated in spleen with OVA₃₂₃₋₃₃₉ stimulation during 72h, delta
517 of response vs unstimulated cells (medium), mean \pm SEM of 5 mice per group from 1 experiment, p =
518 ns, t test, **(F)** in mesenteric lymph nodes (MLN) OVA₃₂₃₋₃₃₉ or OVA₂₅₇₋₂₆₄, delta of response vs
519 unstimulated cells (medium), mean \pm SEM of 5 mice per group from 1 experiment, p = ns, t test.

520

521

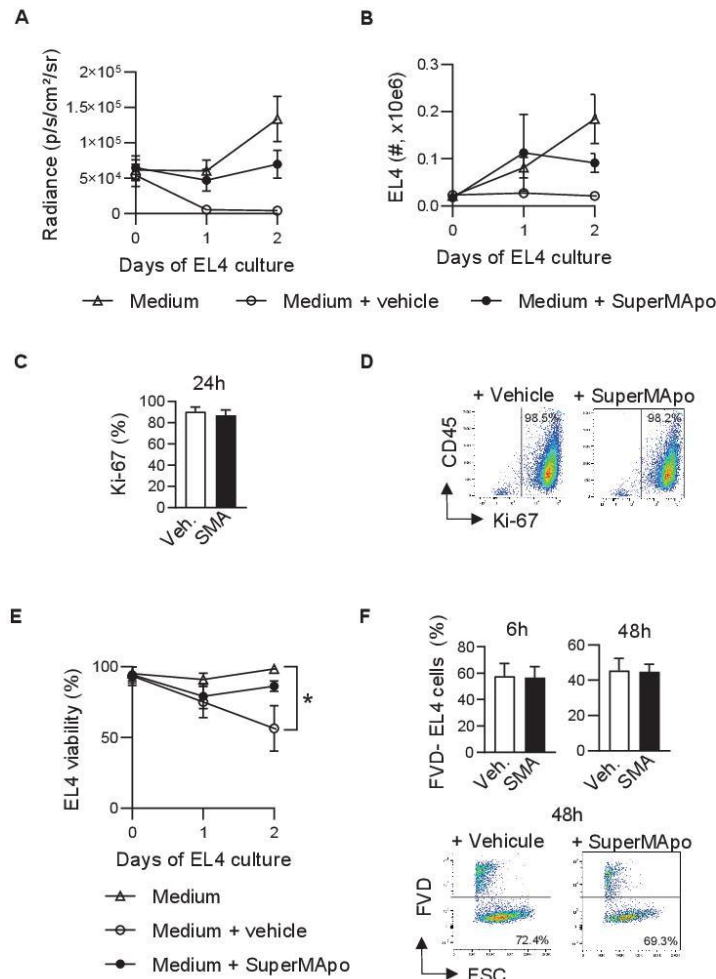
Supplementary Material



522

523 **Supplementary Figure 1. Control of tumor progression was also observed in an intravenous**
 524 **tumor model. (A)** C57Bl/6 mice received EL4 cancer cells intravenously 7 days before SuperMApo
 525 treatment (1 mL, intraperitoneal, twice, with 48h of interval). Cancer cell progression was followed by
 526 bioluminescence evaluation, once to twice a week with luciferin injection in intraperitoneal, radiance
 527 mean± SEM was represented with 5 mice per group from 1 experiment, *p*= ns (Two-way Anova plus
 528 Sidak's multiple comparisons test) and **(B)** bioluminescence image at day 0 and day 15 post-treatment
 529 was represented.

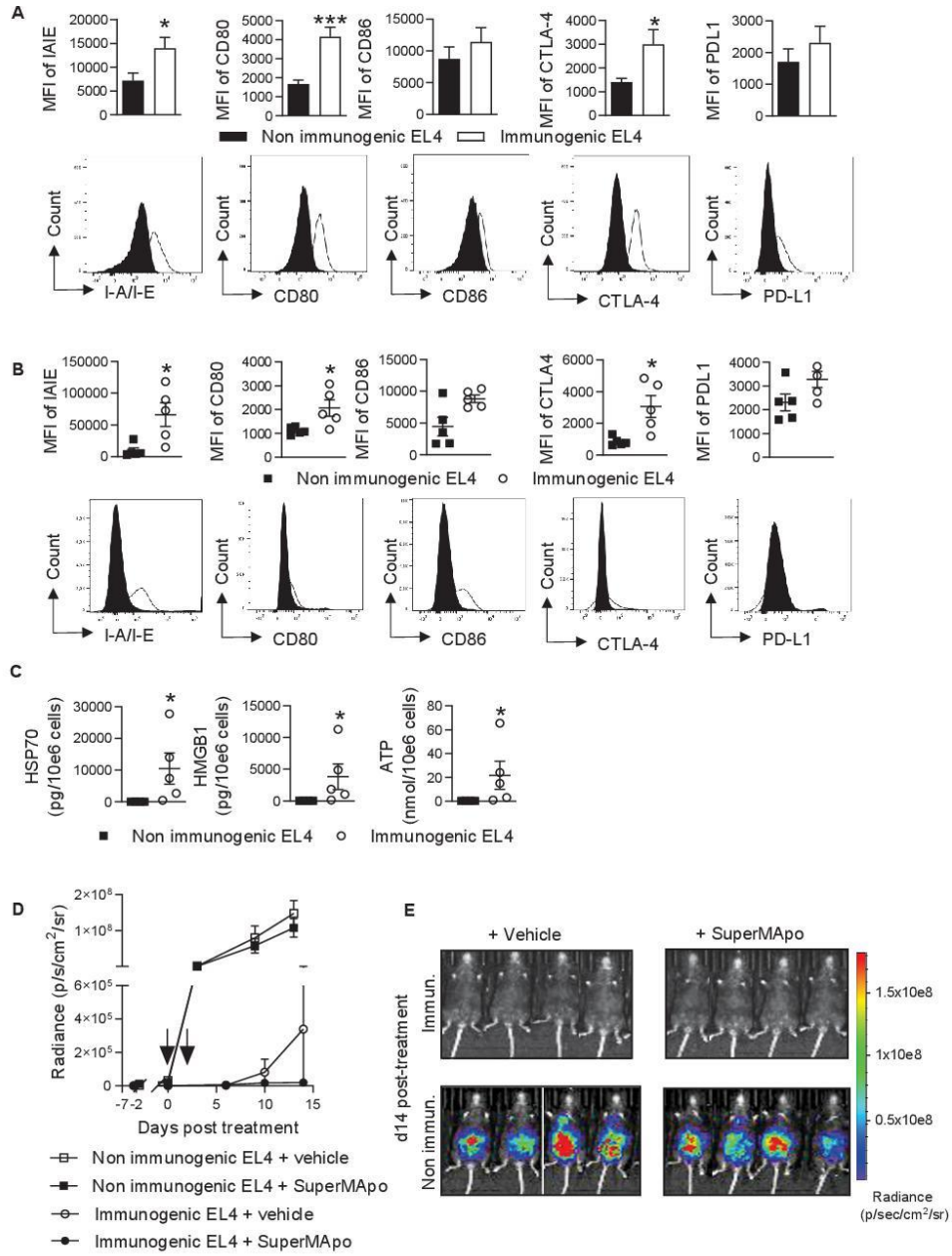
Pro-resolving factors limit cancer progression



530

531 **Supplementary Figure 2. SuperMApo treatment did not act directly on cancer cells.** (A) EL4
 532 (2.10e4 cells/well) were cultured with SuperMApo (or controls medium), EL4 growth was evaluated
 533 by bioluminescence quantification and (B) by counting, mean± SEM of 2 to 3 wells per condition from
 534 3 experiments, $p = ns$, One-way Anova test plus Dunn's post test. (C, D) EL4 proliferation was
 535 determined by flow cytometry (Ki-67⁺), mean± SEM from 3 experiments, $p = ns$, t test. (E) EL4 cell
 536 viability was determined by counting, mean± SEM from 3 experiments, $*p < 0,05$ culture medium vs
 537 culture medium vehicle, One-way Anova test plus Dunn's post test and (F) by Fixable Dye Viability
 538 labelling evaluated by flow cytometry at 6h and 48h of culture, mean± SEM from 3 experiments, $p =$
 539 ns, t test.

Pro-resolving factors limit cancer progression

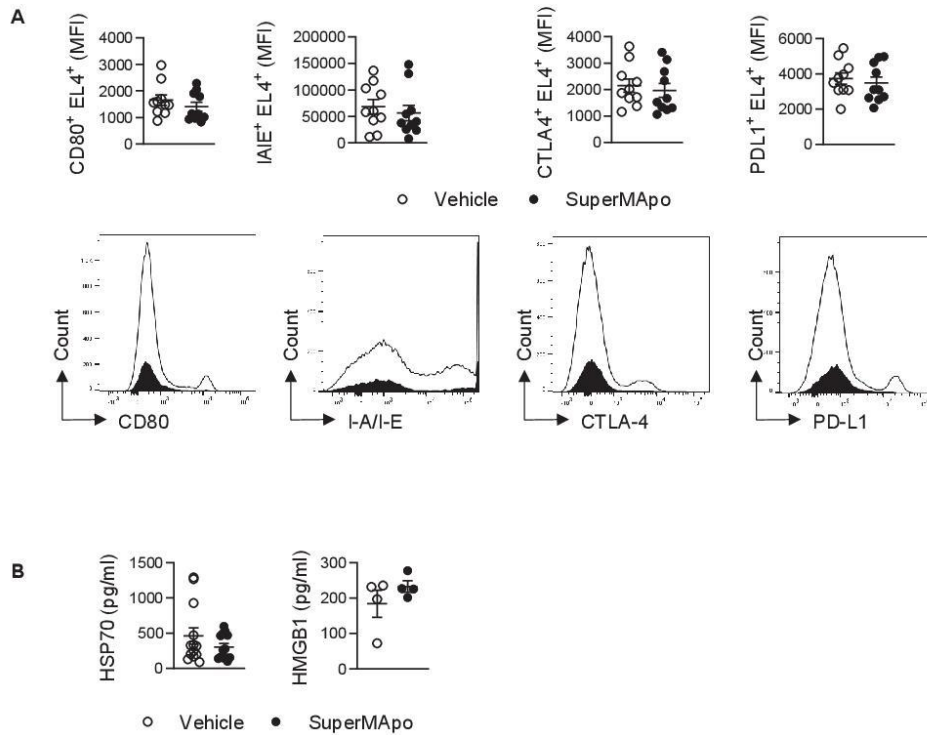


540

23

541 **Supplementary Figure 3. Non-immunogenic EL4 tumor cell line was not sensitive to pro-**
542 **resolving factor-induced anti-tumor immune response. (A)** Mean of fluorescence intensity of I-A/I-
543 E⁺, CD80⁺, CD86⁺, CTLA-4⁺ and PD-L1⁺ of non- or immunogenic EL4 cells, was determined by flow
544 cytometry, *in vitro* before mice injection, mean± SEM was represented from 3 experiments, **p* <
545 0,05 ****p* < 0,01, t test, **(B)** *ex vivo* after 22 days of growth in C57Bl/6 mice, mean± SEM was
546 represented from 1 experiment, **p* < 0,05, t test, **(C)** DAMPs (HSP70, HMGB1 and ATP) were
547 quantified in peritoneal lavage at day 22 post EL4 injection, mean± SEM was represented from 1
548 experiment, **p* < 0,05, t test, **(D)** radiance mean± SEM was represented from bioluminescence
549 evaluation once to twice a week for mice treated by SuperMApo (1 mL, intraperitoneal, twice, with
550 48h of interval) or vehicle, 5 mice per group from 1 experiment, *p*= ns, One-way Anova test plus
551 Dunn's multiple comparisons test and **(E)** and bioluminescence image was represented 14 days post
552 treatment.

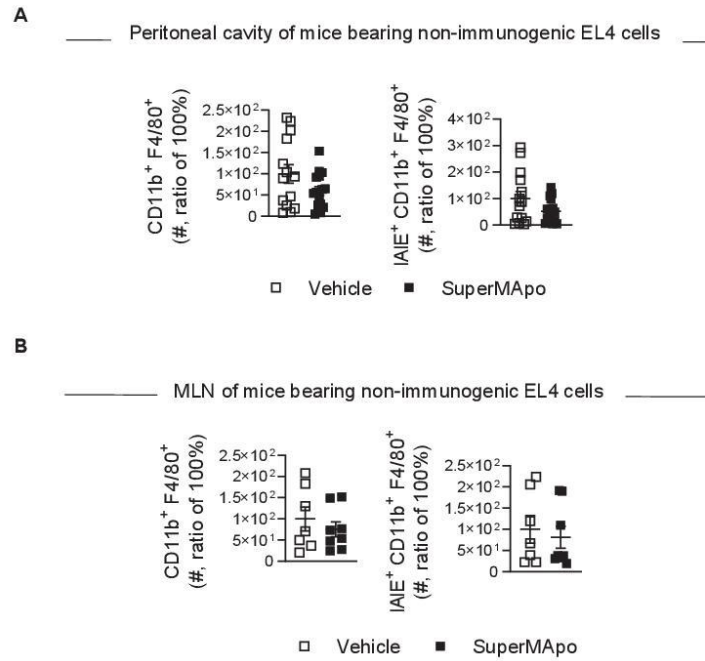
Pro-resolving factors limit cancer progression



553

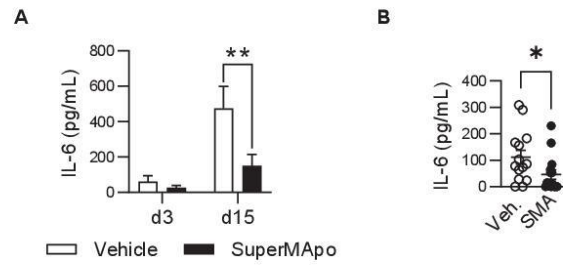
554 **Supplementary Figure 4. EL4 immunogenicity was not affected by SuperMApo treatment *in***
 555 ***vivo*.** (A) Mean of fluorescence intensity of I-A/I-E⁺, CD80⁺, CTLA-4⁺ and PD-L1⁺ of immunogenic
 556 EL4 cells injected in C57Bl/6, 7 days before SuperMApo treatment (1 mL, intraperitoneal, twice, with
 557 48h of interval) was determined by flow cytometry, mean± SEM is represented of 10 mice per group
 558 from 2 experiments, $p=ns$, t test and (B) DAMPs (HSP70 and HMGB1) were quantified by ELISA in
 559 peritoneal lavage 15 days post treatment, 5 to 10 mice per group from 1 to 2 experiments $p=ns$, t test.

Pro-resolving factors limit cancer progression



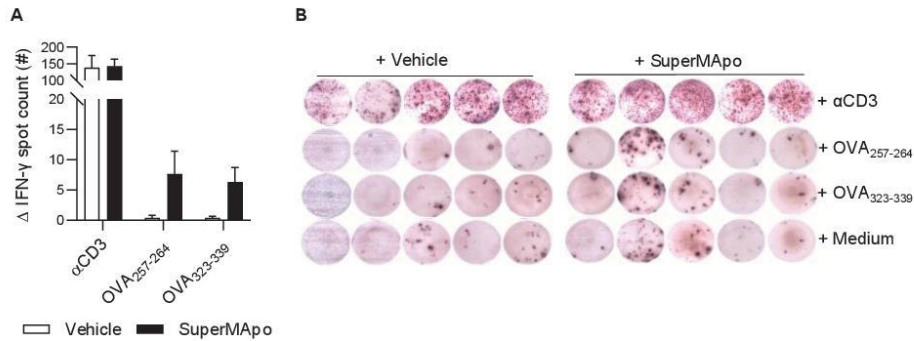
560

561 **Supplementary Figure 5. Macrophage subsets were not activated in non-immunogenic EL4**
 562 **bearing mice after SuperMApo treatment.** (A) Macrophages from C57Bl/6 mice bearing non-
 563 immunogenic EL4 cells, treated by SuperMApo (1 mL, intraperitoneal, twice, with 48h of interval)
 564 were evaluated by flow cytometry at day 15 days post treatment, number of CD11b⁺ F4/80⁺
 565 (macrophages) and CD11b⁺ F4/80⁺ IAIE⁺ (macrophages presenting antigen) were determined in the
 566 peritoneal cavity; mean± SEM of 10 to 12 mice per group from 2 experiments, *p*=ns, t test, and (B) in
 567 mesenteric lymph nodes, mean± SEM of 7 to 8 mice per group from 1 experiment, *p*=ns, t test.



568

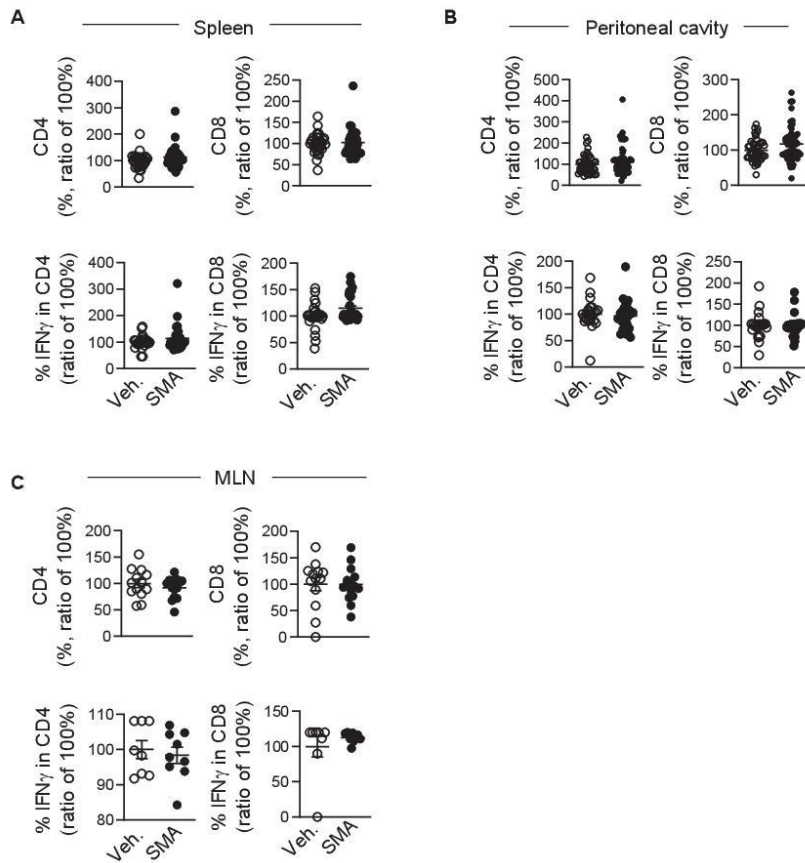
569 **Supplementary Figure 6. IL-6 decreased after SuperMApo treatment.** (A) IL-6 quantification was
 570 evaluated by ELISA in the peritoneal lavage, 3 and 15 days after SuperMApo treatment (1 mL,
 571 intraperitoneal, twice, with 48h of interval) of C57Bl/6 mice bearing EL4 cells, mean± SEM of 5 to 6
 572 mice per group from 1 experiment, ** $p < 0.01$, Two-way Anova test plus Sidak's multiple comparisons
 573 test and (B) in plasma, 15 days post SuperMApo treatment, mean± SEM of 14 to 15 mice per group
 574 from 3 experiments, * $p < 0.05$, t test.



575

576 **Supplementary Figure 7. Early type II IFN response was enhanced by SuperMApo treatment.**
 577 **(A, B)** IFN- γ response was evaluated from C57Bl/6 mice bearing immunogenic EL4 cells and treated
 578 by SuperMApo (1 mL, intraperitoneal, twice, with 48h of interval). Three days post treatment,
 579 splenocytes were stimulated during 72h with α -CD3, or OVA 257-264 (for CD8⁺ response) or OVA
 580 323-339 (for CD4⁺ response). IFN- γ delta between non-stimulated and stimulated cell response is
 581 evaluated by ELISpot, mean \pm SEM of 5 to 6 mice per group from 1 experiment, $p = ns$, Two-way
 582 Anova plus Sidak's multiple comparisons test.

Pro-resolving factors limit cancer progression



583

584 **Supplementary Figure 8. Total CD4⁺, CD8⁺, Th1 and Tc1 were not modified by SuperMAPo**
 585 **treatment.** (A) T cells (CD4⁺, CD8⁺) and effector T cells (IFN- γ ⁺ CD4⁺, IFN- γ ⁺ CD8⁺) from
 586 splenocytes, (B) from peritoneal lavage and (C) from mesenteric lymph nodes of C57Bl/6 mice bearing
 587 immunogenic EL4 cells, were evaluated by flow cytometry 15 days post treatment, mean \pm SEM of 8
 588 to 34 mice per group from 1 to 7 experiments, p =ns, t test.

DISCUSSIONS
&
PERSPECTIVES

Discussions et perspectives

Discussions des principaux résultats

L'étude du rôle du système immunitaire dans le développement du cancer, prend une part importante des recherches fondamentales. L'acquisition de nouvelles connaissances envers les mécanismes anti-tumoraux permet d'améliorer les thérapies actuelles mais également d'évaluer la conception de nouvelles approches thérapeutiques. A l'heure actuelle, le système immunitaire et notamment les réponses inflammatoires sont de plus en plus ciblés dans les nouvelles approches thérapeutiques anti-cancéreuses, avec l'application de nombreuses immunothérapies par exemple. Avec ces travaux de recherche, nous proposons une nouvelle approche innovante dans le traitement des cancers. Dans cette étude, l'utilisation des facteurs pro-résolutifs issus de l'efferocytose, ont été étudiés dans le cadre du traitement de cancers par le traitement SuperMApo, médicament bio-identique aux propriétés pro-résolutives.

1. Impact du traitement SuperMApo suivant les différents modèles expérimentaux de cancers

A. Différentiel de réponse suivant les modèles expérimentaux et les modalités d'injections

Le premier axe de ces travaux de recherche a consisté en l'étude prospective de différents modèles expérimentaux de cancers, dans le but de déterminer le modèle expérimental répondant au traitement SuperMApo. Notre étude exploratoire s'est focalisée principalement sur l'étude de modèles solides. Ces modèles ont été choisis dans un premier temps grâce à la possibilité d'étude du microenvironnement tumoral. Les modèles de tumeurs solides se sont avérés peu répondants, ou répondants de manière aléatoire face au traitement SuperMApo.

Actuellement, les stratégies visant l'inflammation sont des stratégies à base d'anti-inflammatoires, ciblant les voies pro-inflammatoires, ou des immunothérapies modulant l'inflammation, pour réenclencher l'immunosurveillance. Ces dernières années, l'émergence des connaissances sur les facteurs issus de l'efferocytose, comme les médiateurs pro-résolutifs spécialisés dans le développement des cancers, démontre un réel intérêt bénéfique dans leur traitement³. Par exemple, la résolvine permet de limiter la croissance des tumeurs mais également la formation de métastases¹⁰⁵. En effet les modèles expérimentaux, « *knock out* » pour les récepteurs aux résolvines (ALX/FPR2), ont une faculté de développer spontanément des métastases après résection des tumeurs primaires. Dans

ce contexte les approches pro-résolutives, et plus particulièrement le traitement SuperMApo, pourraient être des approches pertinentes dans le traitement des cancers, notamment pour des modèles de cancers solides et de métastases. Cependant à l'heure actuelle il existe encore peu de données disponibles sur un effet bénéfique des approches pro-résolutives pour le traitement des cancers, pour les modèles de cancers dits « liquides ».

Au cours de notre étude prospective, nous avons pu constater que le traitement par facteurs pro-résolutifs permettait de limiter la progression tumorale, de certains modèles de cancers « liquides ». En effet, pour une lignée donnée, la lignée EL4, le potentiel thérapeutique du traitement s'est avéré différent. La même lignée, injectée par voie sous cutanée ou par voie systémique (intraveineuse et intrapéritonéale), ne semble pas répondre de la même manière face au traitement SuperMApo. La voie sous cutanée développant une tumeur solide à partir de l'injection d'autres lignées ne semble pas non plus permettre une réduction reproductible suite au traitement SuperMApo.

Bien que ces observations n'aient pas été réalisées sur un nombre suffisant d'expériences pour la voie sous cutané, ces données suggèrent tout de même que la voie d'injection des cellules cancéreuses puisse impacter le potentiel effet anti-tumoral des médiateurs pro-résolutifs.

B. Impact des lignées cellulaires et des facteurs immunogènes

D'après les résultats aléatoires observés quant à la capacité de réponse des modèles expérimentaux de cancers solides face au traitement SuperMApo, et la surprenante observation du différentiel de réponse suivant la voie d'injection des cellules cancéreuses, l'hypothèse fut que l'effet anti-tumoral du traitement pouvait être dépendant du modèle. En effet, une réponse a semblé être mise en avant pour la lignée B16, pour certaines expérimentations, mais pas pour la lignée EL4 en sous cutanée. Et une réponse anti-tumorale du traitement SuperMApo n'a pas été observée pour toutes les autres lignées étudiées par voie sous cutanée. Dans ce contexte, l'effet du traitement SuperMApo, en plus de sembler dépendre de la voie d'injection des cellules cancéreuses, pourrait dépendre également de la lignée. Les lignées utilisées possèdent différentes caractéristiques à forte ou pauvre capacité immunogène. Par exemple la lignée B16, est caractérisée comme une lignée peu immunogène, comme la lignée LLC1 et la lignée EL4. Contrairement à la lignée CT26 qui est caractérisée comme plus immunogène^{136, 139}. Ces caractéristiques sont principalement définies d'après l'infiltrat tumoral, suite au développement de tumeurs primaires. Par exemple, la lignée B16 est une lignée avec une forte infiltration de cellules myéloïdes avec une capacité immunosuppressive (macrophages de type M2 et MDSC), avec au contraire une faible infiltration lymphocytaire et une faible activité cytotoxique. La lignée LLC1 et la lignée CT26, ont également une infiltration de cellules myéloïdes. La lignée EL4, elle, possède également une infiltration de cellules myéloïdes, une infiltration lymphocytaire, avec une forte

capacité d'immunosuppression (IL-10, PD-L1). La lignée EL4 serait, comme la lignée B16, faiblement immunogène^{136, 139}. Ces différences de capacité immunogène inter-lignées ne permettent cependant pas d'expliquer les différences de réponses suite au traitement SuperMApo. En effet, la lignée la plus immunogène des 4 étudiées serait la lignée CT26, selon la capacité d'infiltration immunitaire. Cependant lors de son utilisation, aucune réponse anti-tumorale sur le suivi de la croissance n'a été observée. Les lignées semblant répondre le plus face au traitement SuperMApo étaient la lignée EL4 et la lignée B16.

Hormis les connaissances fondamentales des différentes lignées, une caractéristique semble en revanche pouvoir impacter la réponse anti-tumorale du traitement SuperMApo. En effet, le modèle de tumeur solide induite par la lignée B16, semble répondre au traitement lorsque celle-ci exprime l'ovalbumine (B16-OVA). L'ovalbumine est une protéine exogène au modèle murin, pouvant alors potentiellement engendrer une réponse du système immunitaire, et rendre la greffe de cette lignée au sein d'un modèle murin plus immunogène. Pour la lignée EL4 exprimant l'OVA (EG7), le rôle de l'ovalbumine a effectivement été montré comme pouvant être immunomodulateur. En effet, la réponse à un traitement par chimiothérapie ne semble pas être similaire suivant la présence ou l'absence d'ovalbumine. Lors de l'utilisation des EL4-OVA (EG7), la réjection d'une seconde injection après chimiothérapie serait plus importante¹³⁰. Ces observations suggèrent que les modèles cellulaires, mais également les modifications apportées aux lignées pourraient engendrer une modification de réponses dans l'étude des traitements anti-cancéreux en préclinique. Ainsi, il apparaîtrait que le traitement SuperMApo, dans un modèle utilisant les lignées exprimant l'OVA, pouvant être associé à un phénotype plus immunogène, serait plus à même d'induire une réponse anti-tumorale. D'après ces observations et ces connaissances, le traitement SuperMApo induirait un effet anti-tumoral dans un contexte de modèle cellulaire à plus forte capacité immunogène.

Dans ces circonstances, une seconde observation nous a permis de renforcer notre hypothèse concernant une réponse dépendant de l'immunogénéité du modèle expérimental. La lignée EL4 majoritairement étudiée dans ces travaux, s'est révélée positive aux tests de détection de mycoplasmes. Nos résultats différentiels et de faible croissance tumorale, nous ont orienté vers ce type d'analyse, se révélant alors positif. De manière surprenante, les données de suivi de progression tumorale associées à un fort effet anti-tumoral du traitement SuperMApo et reproductible, ont été obtenues à partir de cette lignée cellulaire. Il est certain que les lignées contaminées par des mycoplasmes ne sont que peu exploitables en recherche. Cependant dans le cadre de notre étude, cette observation permet d'obtenir plusieurs informations concernant l'effet potentiel du traitement SuperMApo dans des modèles expérimentaux de cancers. Effectivement, les contaminations aux mycoplasmes sont connues comme pouvant modifier les lignées cellulaires, dans leur phénotype, leur croissance, et leur réponse immunitaire associée et de ce fait altérer les études pharmacologiques *in*

vitro. Cependant, il est également connu, que chez l'animal, le passage des lignées chez les modèles murins pourrait permettre de supprimer la contamination¹⁴⁰⁻¹⁴³. Dans ce contexte, la lignée EL4 du laboratoire a été étudiée *in vitro* et *in vivo*, et comparée à une lignée EL4 d'origine connue (ATCC) nouvellement obtenue et dépourvue de contamination. De manière non surprenante la lignée contaminée s'est avérée différente d'un point de vue phénotypique *in vitro* et *in vivo*, suggérant donc bien une dérive. La caractérisation *in vivo* de cette lignée a également permis de mettre en avant une différence de croissance, suggérant donc que la contamination puisse induire une réponse immunitaire différente au sein de l'organisme. De manière intéressante, l'utilisation de ces deux lignées en parallèle, a permis d'observer une réponse anti-tumorale différente quant à l'utilisation du traitement SuperMApo. Ces données confirment que le traitement SuperMApo pourrait avoir un effet anti-tumoral dans des contextes de tumeurs immunogènes. Les modèles de tumeurs solides, associés à l'inflammation (LPS, DSS) ont également permis de rapprocher une action potentielle du traitement dans un contexte inflammatoire pro-tumoral ou anti-tumoral.

Ces différentes observations suggèrent que le traitement SuperMApo induit un effet anti-tumoral pour des modèles expérimentaux potentiellement immunogènes. Afin de comprendre si ces modalités de réponses étaient uniquement dues aux modèles, différentes modalités de traitement ont été étudiées dans le but d'identifier la modalité d'administration du traitement SuperMApo pouvant dispenser le meilleur bénéfice anti-tumoral.

2. Sélection des modalités de traitement SuperMApo

A. Biodisponibilité & distribution du traitement

Lors de cette étude, une seule voie d'injection du traitement SuperMApo a été étudiée. Modalité pour laquelle le traitement SuperMApo a montré des effets dans les modèles expérimentaux de maladies inflammatoires de l'intestin et d'encéphalomyélites¹¹⁴⁻¹¹⁶. Le traitement SuperMApo a été administré tout au long de cette étude à 1 mL répété à 48h d'intervalle, par voie intrapéritonéale. L'injection de médiateurs pro-résolutifs spécialisés, comme la résolvine, dans des modèles de tumeurs solides, semble démontrer des effets anti-tumoraux sur la croissance tumorale, lorsque ces facteurs sont administrés par voie intrapéritonéale, malgré des tumeurs sous cutanées¹⁰⁵. Cependant, dans notre étude, il semblerait que suivant le modèle expérimental étudié, l'accessibilité au traitement soit différente. Cette hypothèse est suggérée par le fait que dans un modèle de tumeurs solides, seule une faible et aléatoire réponse anti-tumorale sur la croissance tumorale est observée suite au traitement SuperMApo. Les facteurs pro-résolutifs sembleraient plus à même de réduire la progression tumorale

dans des modèles de tumeurs liquides que dans des modèles de tumeurs solides, laissant supposer une action dépendante du modèle et/ou de la voie d'administration du traitement. Dans ce contexte, la biodisponibilité du médicament bio-identique pourrait être un paramètre important. Pour des modèles dit « liquides », et avec la même lignée, le traitement semble induire une réponse anti-tumorale. En effet, il serait possible d'envisager que pour une tumeur solide, l'administration du traitement par voie intrapéritonéale ne soit pas la voie permettant aux facteurs pro-résolutifs d'accéder au sein du tissu tumoral, ou que le traitement SuperMApo induise des mécanismes anti-tumoraux incompatibles avec une tumeur solide établie. Bien que le modèle spontané (AOM/DSS) permettait d'observer un potentiel effet anti-tumoral du traitement SuperMApo, ce modèle reste cependant un modèle différent dans le développement dans tumeurs comparativement aux greffes de lignées cancéreuses.

Ces observations tendent à suggérer dans des contextes de tumeurs solides induites par les lignées cancéreuses, que le traitement pourrait permettre un meilleur contrôle de la tumeur s'il était administré directement au niveau du site tumoral, ou éventuellement par voie intraveineuse. Dans le modèle d'arthrite le traitement SuperMApo limite la pathologie d'administration par voie intraveineuse¹¹¹. Le second paramètre, en plus de la voie d'injection, semblant également dépendre de l'effet anti-tumoral observé, serait la période d'administration au cours du développement tumoral.

B. Traitement préventif *versus* curatif & traitement ponctuel *versus* continu

Dans cette étude, différentes modalités d'administration du traitement SuperMApo ont été réalisées. Dans les modèles de tumeurs solides, les réponses aux traitements SuperMApo semblent être associées à une administration curative. En effet, le traitement SuperMApo n'a pas démontré d'effet sur la croissance tumorale lors d'une injection concomitante aux cellules cancéreuses, mais semble avoir un effet lors d'une injection 7 jours après les cellules cancéreuses, ou au moment de l'apparition de la tumeur. Néanmoins, une nuance semble être de mise pour le modèle d'induction spontané suite à l'administration d'un carcinogène et à l'exposition au DSS. En effet, dans ce modèle le traitement semble induire une potentielle action anti-tumorale, au moment de l'induction. Ces différents résultats, dans les modèles de tumeurs solides, suggèrent que le traitement pourrait induire un effet anti-tumoral pour des tumeurs préétablies mais également dans l'initiation tumorale liée à l'inflammation. Dans des modèles de tumeurs solides, les résolvines ont été utilisées en thérapies anti-cancéreuses en traitement curatif, au moment où les tumeurs mesurent environ 100 mm³. Cependant leur utilisation a été réalisée en traitement prolongé à l'aide de mini-pompes¹⁰⁵. Dans nos travaux, différentes modalités de traitement ont été étudiées pour les modèles liquides, modèles pour lesquelles, la réponse au traitement SuperMApo semblait être plus reproductible. Dans les modèles

liquides une injection du traitement SuperMApo, ponctuelle semble démontrer des effets anti-tumoraux sur la progression tumorale. En effet, les traitements 7 jours après les cellules cancéreuses semblent plus à même de contrôler la progression tumorale, qu'un traitement préventif à J0. Nous avons également pu mettre en évidence, qu'un traitement prolongé par SuperMApo, au contraire des SPM, avait tendance à induire une progression tumorale plus importante¹⁰⁵. Ces observations ont été réalisées pour un traitement d'une semaine et de 3 semaines (tous les 2 jours). Pour autant ces données ont été obtenues à partir d'une seule expérimentation et demandent à être confirmées. Ces données suggèrent tout de même qu'un traitement prolongé n'induirait pas d'effet anti-tumoral.

L'ensemble de ces données oriente vers une potentielle action anti-tumorale du traitement SuperMApo lorsque l'administration serait curative et ponctuelle. Un traitement préventif, si le traitement implique la réponse immunitaire, ne permettrait pas de limiter la progression tumorale, si l'initiation tumorale n'était pas totale avec la mise en place de l'immunosurveillance. De plus, l'administration prolongée des facteurs pro-résolutifs pourrait permettre une progression tumorale plus importante. Ceci pourrait être une conséquence d'un excès du contrôle de l'inflammation par les facteurs pro-résolutifs, ne permettant plus une action d'immunosurveillance, mais plutôt permettant l'échappement des cellules cancéreuses.

C. Intention d'associations thérapeutiques

Dans la condition où le traitement SuperMApo pouvait impacter l'inflammation pour induire un effet anti-tumoral, l'étude de différentes combinaisons thérapeutiques a été réalisée³⁰. Les SPM et plus particulièrement les résolvines ont été montrées comme pouvant ajouter, aux thérapies conventionnelles, un apport supplémentaire dans la régression tumorale¹⁰⁵. En effet, les SPM seraient responsables d'une augmentation de la phagocytose des débris cellulaires engendrés par les thérapies conventionnelles comme les chimiothérapies. De plus, les SPM ont été démontrés comme pouvant réduire l'orage cytokinique engendré par les chimiothérapies pour réduire la croissance tumorale¹⁰⁵. Dans ce contexte, l'hypothèse était que le traitement SuperMApo aurait pu potentialiser les effets anti-tumoraux de la chimiothérapie et de la radiothérapie. Lors de ces associations aucun effet bénéfique supplémentaire n'a été observé, sans doute à cause d'une forte régression tumorale initiale, induite par les thérapies conventionnelles. Dans ces conditions, le traitement SuperMApo aurait dû être réalisé dans des situations de résistances aux chimiothérapies, ou challenger de nouveau avec une nouvelle greffe suite à la disparition de tumeurs associées aux thérapies conventionnelles.

La combinaison aux thérapies conventionnelles n'ayant pas permis de démontrer un effet anti-tumoral supplémentaire lors de l'association du traitement SuperMApo, l'examen du LPS associé à la promotion tumorale a été étudié dans le cadre du traitement SuperMApo. Le LPS est un

lipopolysaccharide provenant de *E.coli*. Cette endotoxine a été montrée comme pouvant induire *in vitro* une sécrétion d'IL-6 par les B16 à travers le TLR4. Cette pré-stimulation *in vitro* permet d'induire une régression tumorale^{144, 145}. Cependant le LPS, lorsqu'il est injecté en même temps ou après les cellules cancéreuses, serait à l'origine d'une progression tumorale et la formation de métastases^{120-124, 146}. Lorsque le traitement a été administré au même moment que les cellules cancéreuses au niveau du site d'injection préalable de LPS, il a été observé que le traitement avait tendance à induire une progression tumorale plus importante. Lorsque le LPS est injecté avant les cellules cancéreuses, il serait possible d'envisager qu'une inflammation locale soit mise en place, avec le recrutement des cellules immunitaires. Le fait de traiter les souris au même moment que les cellules cancéreuses, pourrait permettre d'induire un phénotype de résolution au sein du site tumoral et de ce fait les cellules cancéreuses ne seraient pas reconnues par les cellules immunitaires. Ces mécanismes pourraient induire une croissance tumorale plus importante. Ces données sont représentatives d'une seule expérience. Il aurait été nécessaire de réaliser une meilleure mise en place du modèle pour conclure. Ces données suggèrent tout de même que le traitement SuperMApo pourrait moduler l'inflammation au sein du site inflammatoire et tumoral, dans ce contexte. Cette modulation de l'inflammation pourrait être à l'origine de la réduction de progression tumorale observée dans les modèles de tumeurs « liquides ».

3. SuperMApo, soutien de la surveillance immunitaire

Peu d'études, à l'heure actuelle, font état des mécanismes mis en jeu lors de l'utilisation de facteurs pro-résolutifs utilisés comme approche pour traiter les cancers. En effet, les principales stratégies visant l'inflammation ciblent principalement les voies inflammatoires comme la voie NF- κ B, ou encore les cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α), les facteurs de croissances (VEGF), mais également les cellules myéloïdes souvent associées à un phénotype immunosuppresseur comme les macrophages de type M2 ou les MDSC^{34, 45, 147, 148}. L'utilisation des médiateurs pro-résolutifs comme approche thérapeutique, dans le but de viser l'inflammation dans le cancer, reste encore récente, avec peu de données sur les mécanismes mis en jeu. Différentes stratégies ciblant l'inflammation par facteurs pro-résolutifs semblent cependant être prometteuses dans le traitement des cancers et notamment l'utilisation des SPM, montrant de réels intérêts bénéfiques en études précliniques^{68, 105, 149, 150}. Les médiateurs pro-résolutifs spécialisés, ont été décrits comme des facteurs permettant de réduire la croissance tumorale en favorisant le processus d'efferocytose, en diminuant le recrutement des neutrophiles et en limitant la production de cytokines pro-inflammatoires, souvent associée au syndrome d'orage cytokinique.

A. Modulation de l'environnement inflammatoire

Les SPM ont été démontrés dans le cancer comme pouvant augmenter la capacité des macrophages à phagocyter les débris de cellules cancéreuses, issus de traitement par chimiothérapie, mais également de permettre à ces macrophages de limiter la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ces données ont également été montrées chez les monocytes circulants de patients atteints de cancers de la prostate¹⁰⁵. Ainsi, les SPM pourrait permettre d'augmenter la phagocytose et de réduire l'inflammation. Nos données indiquent également que le traitement SuperMApo permettrait une modulation des cytokines pro-inflammatoires à l'origine potentielle d'une réduction tumorale. En effet, le traitement SuperMApo diminuerait le taux d'IL-6 au sein du péritoine. Cette diminution d'IL-6 après traitement par SuperMApo a également été observé en systémique à partir du plasma. L'IL-6 est une cytokine inflammatoire permettant la conversion de macrophages en macrophages associés à la tumeur plutôt caractérisés comme des phénotypes de type M2 dans des cas d'ascites malines^{71, 151}. L'ensemble de ces connaissances et ces données tendent à arborer le potentiel de l'utilisation de facteurs pro-résolutifs afin de limiter l'inflammation pouvant être pro-tumorale et le traitement SuperMApo pourrait y contribuer. Les cellules infiltrant les tumeurs EL4, ont été définies comme un infiltrat pauvre en récepteur à l'IL-6¹³⁶. Les cytokines inflammatoires, et plus particulièrement l'IL-6, peuvent être sources d'augmentation de l'hématopoïèse au sein de la moelle osseuse et augmenter le recrutement de cellules myéloïdes, comme les neutrophiles et les monocytes, au sein de la circulation mais également au sein des sites tumoraux^{34, 86, 152, 153}. Les neutrophiles, ainsi sollicités vont à leur tour favoriser la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et induire le recrutement d'autres cellules immunitaires innées. Parmi ces cellules, les monocytes vont être retrouvés au sein de la circulation sanguine, avec un risque que ces cellules acquièrent un phénotype immunosuppresseur, comme les MDSC ou les macrophages pro-tumoraux par exemple.

B. Cellules myéloïdes et immunosuppression

Il existe différentes cellules myéloïdes au sein d'une tumeur, notamment les macrophages à phénotypes pro- ou anti-tumoraux. Les cellules myéloïdes associées à la tumeur peuvent être résidentes du tissu ou recrutées. Les cellules myéloïdes ainsi recrutées proviennent des cellules circulantes issues de l'hématopoïèse, comme les monocytes et les neutrophiles^{34, 86, 152, 153}. Dans le contexte de tumeur dite liquide, présentée dans cette étude, ce sont notamment ces cellules circulantes qui auraient été intéressantes à étudier. Les données issues de l'étude du lavage péritonéal,

pouvant être caractérisé dans ce modèle comme microenvironnement tumoral, suggèrent l'observation d'éventuels effets anti-tumoraux du traitement SuperMApo. Les cellules myéloïdes issues de l'hématopoïèse au cours du processus tumoral, sont induit par un environnement fortement inflammatoire au sein du site tumoral. Nos données suggèrent qu'en systémique et au sein du péritoine, le traitement SuperMApo aurait tendance à réduire le taux d'IL-6. Cette diminution potentielle d'inflammation pourrait moduler l'hématopoïèse et impacter le recrutement de nouvelles cellules immunitaires innées au sein de la circulation sanguine et au sein du péritoine. Or, ce n'est pas ce qui a été observé lors de l'étude des cellules myéloïdes au sein du péritoine après traitement par SuperMApo. Bien qu'un plus faible taux d'IL-6 soit détecté au sein du péritoine et du plasma, pour autant le traitement SuperMApo n'induit pas une baisse du nombre de CD11b+ au sein de péritoine et de la rate. En revanche, au sein des ganglions, 13 jours après traitement SuperMApo, le nombre de CD11b+ augmente. Ces données suggèrent bien un impact du traitement SuperMApo sur l'inflammation et les cellules myéloïdes mais en n'inhibant pas forcément leur recrutement au contraire, mais à une polarisation vers un profil anti-tumoral.

Le traitement SuperMApo étant constitué de TGF- β , l'impact du traitement sur le phénotype des cellules myéloïdes a été étudié. La voie du TGF- β est souvent associée à un mauvais pronostic dans le cancer, notamment dans son rôle d'induction d'immunosuppression à l'origine de la progression tumorale^{34, 66, 154-156}. Le TGF- β peut contribuer au phénotype tumoral des cellules cancéreuses, induire des Treg et inhiber l'action anti-tumorale des LT, mais également induire les TAM³⁴. Le taux de TGF- β au sein du péritoine ne semble pas être impacté par le traitement SuperMApo, ni le nombre de Treg. Dans le péritoine, le phénotype immunosuppresseur des cellules myéloïdes a été étudié afin de vérifier que le traitement SuperMApo n'induit pas une immunosuppression par les cellules myéloïdes. De manière intéressante, bien que le traitement SuperMApo ne limite pas l'infiltration des cellules au sein des organes lymphoïdes et du péritoine, il n'engendre pas pour autant un phénotype immunosuppresseur des cellules immunitaires innées. En effet, le nombre de cellules exprimant PD-L1 n'augmente pas ni les cellules immunosuppressives (« MDSC » *like*). La hausse potentielle du nombre de cellules myéloïdes dans les ganglions serait due à une augmentation du nombre d'APC actives (CD11b+ IAIE+) et de macrophages (CD11b+ F4/80+) aux profils anti-tumoraux^{34, 35}.

C. Réponse lymphocytaire spécifique de la tumeur

Dans le contexte où le traitement SuperMApo tend à augmenter l'infiltrat des cellules immunitaires innées et induirait potentiellement une reprogrammation vers un profil anti-tumoral, sans induire de réponse Treg, la réponse des LT CD4+ et CD8+ pourrait être garant de l'immunosurveillance. Dans ce

contexte l'étude de la réponse IFN- γ des lymphocytes T a été étudiée. Aucune différence du nombre de lymphocytes T n'a été observé après traitement SuperMApo, dans la rate et le péritoine. En revanche la réponse spécifique en IFN- γ , face aux cellules cancéreuses irradiées semble augmenter. Cette augmentation serait dû à une capacité de réponse accrue par les lymphocytes T et plus particulièrement des lymphocytes T CD4+ et CD8+. En effet, il semblerait que suite à une stimulation des peptides OVA, ces lymphocytes T semblent plus à même de sécréter de l'IFN- γ . Si le nombre de LT n'augmente pas mais que la réponse est plus forte, les APC seraient plus à même de stimuler et activer les LT. Cette réponse lymphocytaire pourrait ainsi être à l'origine d'une augmentation cytotoxique spécifique vis-à-vis des cellules cancéreuses, à l'origine d'une diminution de la progression tumorale, suite au traitement SuperMApo.

4. Potentiels mécanismes anti-tumoraux du traitement SuperMApo & cas d'échecs thérapeutiques

Le traitement SuperMApo, dans un contexte de tumeurs solides, ne permet que de manière ponctuelle et aléatoire, de limiter la progression tumorale, contrairement aux modèles de tumeurs « liquides ». Différentes observations pourraient suggérer une réponse différentielle suivant le modèle de greffes des cellules cancéreuses. Dans le modèle de tumeur liquide induite par la greffe de cellules EL4, le traitement semble moduler les cellules immunitaires innées vers un phénotype moins immunosuppresseur et plus anti-tumoral. Ce changement permettant potentiellement d'induire une augmentation de la réponse anti-tumorale de lymphocytes T spécifiques. Dans les modèles de tumeurs solides induites, les proportions de cellules myéloïdes immunosuppressives tendent à augmenter avec le traitement SuperMApo. Ainsi, il se pourrait que dans ce modèle le traitement ne permette pas de moduler la réponse innée immunosuppressive⁸⁵. Ceci pourrait impacter la réponse des lymphocytes T. En effet, lorsque les LT sont triés et stimulés par les cellules cancéreuses, ces cellules seraient plus à même d'induire une réponse IFN- γ , comparativement à des splénocytes totaux, selon des données préliminaires. Ces observations pourraient suggérer que dans une tumeur solide établie les cellules myéloïdes bloquent l'action des LT. L'effet anti-tumoral du traitement serait donc bien impacté par les cellules immunitaires innées dans le modèle solide. De plus, une différence de cellules myéloïdes semble se dégager pour les cas où le traitement SuperMApo n'induit pas une réduction tumorale. La proportion de cellules myéloïdes (CD11b+ IAIE+) aurait tendance à diminuer lors d'un échec thérapeutique contrairement aux cas de succès sur la croissance tumorale. De plus, il serait possible que pour un échec thérapeutique les LT au potentiel controversé dans le cancer comme les Th17 et les

Treg, soient augmentés¹⁴⁸. Ces données pourraient permettre d'identifier les voies par lesquelles le traitement SuperMApo induit une réponse anti-tumorale.

Résultats complémentaires & perspectives

Lors de cette étude, le traitement SuperMApo, par l'injection de facteurs pro-résolutifs, a permis de montrer de potentiels effets anti-tumoraux dans le traitement de cancer, dans certains modèles expérimentaux de cancer. L'injection de facteurs pro-résolutifs semble montrer un effet thérapeutique pour des modèles de cancers liquides, notamment pour le modèle de cancer péritonéal. Les mécanismes, associés à cet effet anti-tumoral sont dépendant du système immunitaire ; avec une potentielle action sur l'environnement inflammatoire, les cellules immunitaires innées mais également sur la réponse des cellules adaptatives. La voie menant à une réponse anti-tumorale doit cependant être approfondie par des expérimentations supplémentaires, afin de cibler de manière précise les mécanismes induit par l'injection de facteurs pro-résolutifs pour le traitement des cancers. L'étude précise des mécanismes permettront de mieux comprendre la place de la résolution de l'inflammation comme approche en thérapie anti-cancéreuse, afin de permettre aux patients atteints de cancers de nouvelles stratégies de traitements, lors d'impasse thérapeutique par exemple.

1. Effet dépendant du système immunitaire ?

Lors de cette étude, il a pu être observé que l'utilisation des facteurs pro-résolutifs dans le traitement de modèles expérimentaux de cancers semblait être efficace seulement chez l'animal et non directement sur les cellules cancéreuses *in vitro*. Ces données suggèrent l'effet conditionnel du traitement SuperMApo dans le cadre d'un organisme entier, conduisant à la nécessité du système immunitaire pour induire un effet anti-tumoral. Les études réalisées chez des souris RAG γ ^{-/-}, ont pu mettre en évidence que le traitement SuperMApo n'avait aucun impact sur la progression tumorale. Les souris RAG γ ^{-/-} sont des animaux dépourvus de système immunitaire, car déficientes en cellules T, B et NK. L'utilisation de ces animaux permettent dans un premier temps d'étudier l'effet du traitement, sans l'action des lymphocytes mais avec une réponse immunitaire innée, puisque ces animaux présentes des cellules myéloïdes. Ainsi, ces données confirment la nécessité du système immunitaire pour un effet anti-tumoral du traitement. Ces données pourront également être comparées avec des animaux ayant reçu des liposomes chargés en clodronate permettant d'éliminer les populations myéloïdes et plus particulièrement les macrophages, mais également d'inhiber le recrutement des

cellules myéloïdes par l'utilisation d'antagonistes CSF1R. Ces expérimentations permettront également de confirmer que les cellules myéloïdes sont nécessaires pour la réponse anti-tumorale du traitement SuperMApo, et permettant d'induire une réponse T.

2. Origine de la réduction d'inflammation ?

Lors de l'utilisation de médiateurs pro-résolutifs spécialisés comme la résolvine, les études ont démontré une réduction de croissance tumorale par l'augmentation de la phagocytose par les macrophages des débris cellulaires générés par chimiothérapies¹⁰⁵. Ce phénomène permettrait de diminuer l'inflammation et de ce fait réduire la progression tumorale dans des modèles de tumeurs liquides. Dans notre étude, le traitement SuperMApo, semble également diminuer des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6. Cependant l'origine et la conséquence de cette réduction potentielle d'inflammation, n'a pas été définie de manière claire dans les mécanismes mis en place par le traitement. Si cette cytokine est nécessaire pour l'action anti-tumorale du traitement SuperMApo, il serait envisageable de la depleter et/ou de l'induire afin d'étudier l'impact de l'absence ou de la surexpression de cette cytokine sur l'effet du traitement. De plus, afin de déterminer l'origine de cette potentielle réduction d'IL-6, l'effet du traitement sur la phagocytose *in vivo* devrait être définie. En effet de premiers résultats *in vitro*, n'ont pas permis de mettre un lien entre le traitement SuperMApo et le processus de phagocytose. L'expression de SIRP- α au niveau des macrophages après traitement SuperMApo et l'expression de CD47 sur les cellules cancéreuses, a été étudiée. Cependant lors de ces expérimentations *in vitro*, aucun effet du traitement SuperMApo a été observé sur l'expression de ces marqueurs. De plus, des résultats préliminaires ne démontrent pas d'augmentation de phagocytose des cellules cancéreuses irradiées par les macrophages, en présence de SuperMApo, *in vitro*. Ces données suggèrent que le traitement, *in vitro*, n'impact pas les capacités de phagocytose des macrophages. Cependant, la phagocytose dans le modèle de tumeur liquide pourrait être moduler au sein du péritoine à l'issu du traitement SuperMApo dans les modèles de tumeurs « liquides ». L'étude *ex vivo* du marqueur CD47 exprimé par les cellules cancéreuses après traitement SuperMApo ne semble pas être modulé. L'activité de phagocytose des macrophages, issus du péritoine de souris greffées par les cellules EL4, traitées ou non par SuperMApo devrait être étudié. Ceci dans le but de déterminer si le traitement permettrait de reprogrammer les macrophages *in vivo* vers un profil de résolution de l'inflammation par l'augmentation de la phagocytose. Si tel est le cas, le traitement SuperMApo pourrait induire plus de phagocytose *in vivo* et serait à l'origine d'une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires.

3. SuperMApo soutient de l'action anti-tumorale des macrophages ?

Si une potentielle inhibition de l'inflammation, par une réduction de cytokines pro-inflammatoires, est associée aux mécanismes anti-tumoraux du traitement SuperMApo, il serait envisageable d'étudier les cellules circulantes. Le traitement SuperMApo ne limiterait pas le nombre de cellules myéloïdes au niveau des organes lymphoïdes secondaires et du péritoine, mais au contraire le traitement aurait plutôt tendance à augmenter leur nombre dans les organes lymphoïdes secondaires. Dans ce cadre, il serait intéressant de comprendre par l'étude des monocytes circulants si cette augmentation provient d'une plus forte infiltration monocyttaire à partir des cellules circulantes. Des données préliminaires dans notre étude, suggèrent que les cellules circulantes à savoir les lymphocytes T (CD4+ et CD8+) et les cellules myéloïdes (CD11b+) seraient moins présentes dans le sang, au contraire une augmentation dans le péritoine a été observé. Ces données inspirent au recrutement des cellules immunitaires dans le péritoine à partir des cellules circulantes.

De plus, il a été observé que le traitement SuperMApo pourrait diminuer les cellules myéloïdes immunosuppressives. De ce fait, il serait également nécessaire d'étudier la fonctionnalité immunosuppressive de ces cellules *ex vivo*, à savoir leur action vis-à-vis de lymphocytes T activés. Le traitement en réduisant une potentielle action immunosuppressive permettrait en revanche une possible activation des cellules myéloïdes aux phénotypes anti-tumoraux. Dans le but de confirmer une potentielle reprogrammation de ces cellules, il serait également nécessaire de réaliser des MLR (*Mixed lymphocyte reaction*). Ces observations pourraient être acquises grâce à la co-culture de lymphocytes OT-II et OT-I (souris transgéniques pour le TCR spécifique de l'OVA) et de cellules myéloïdes extraites de souris traitées ou non par SuperMApo afin d'étudier la capacité activatrice des cellules immunitaires innées dans ce contexte. Notre étude suggère que les APC permettraient une activation spécifique plus importante des lymphocytes T. En effet, les cellules CD45+ OVA+ (*H2-Kb bound to SIINFEKL*) augmente dans les organes lymphoïdes secondaires après traitement par SuperMApo.

4. Fonction effectrice des lymphocytes T ?

Si le traitement SuperMApo permet d'induire une potentielle reprogrammation des cellules myéloïdes, l'activation et la capacité de lymphocytes T à induire une réponse anti-tumorale serait à étudier. En effet, lors de cette étude, le traitement SuperMApo a démontré de potentiels effets sur la capacité des lymphocytes T à sécréter de l'IFN- γ suite aux stimulations spécifiques des cellules cancéreuses, sans pour autant induire plus de lymphocytes T CD4+ et CD8+. Il semblerait donc que le traitement

SuperMApo permette aux lymphocytes T une plus forte capacité de réponse anti-tumorale. Dans ce contexte l'étude *ex vivo* des lymphocytes T semble être pertinente. Il serait souhaitable d'étudier la lyse des cellules tumorales face aux lymphocytes T activés, et leur mort. Ces données pourraient ainsi expliquer la réduction de progression tumorale suite au traitement SuperMApo.

Conclusion générale

Les cancers sont des maladies complexes impliquant directement le système immunitaire, source d'une richesse de cellules et de molécules inflammatoires pouvant être utilisées en faveur des cellules cancéreuses pour leur progression. Les stratégies thérapeutiques sont actuellement principalement axées sur l'aptitude de l'immunosurveillance, permettant l'élimination des cellules cancéreuses par les cellules du système immunitaire. Cependant, ces stratégies connaissent bien souvent des obstacles avec notamment des effets secondaires, des phénomènes de résistances et de rechutes.

La place de la résolution de l'inflammation dans les mécanismes anti-tumoraux, reste à l'heure actuelle peu connue et peu utilisée en thérapies anti-cancéreuses. Des travaux récents suggèrent que certains facteurs pro-résolutifs permettraient de résoudre l'inflammation engendrée par l'utilisation de thérapies conventionnelles et permettraient une diminution de progression tumorale. Dans ce contexte, notre étude a consisté en la prospection de modèles expérimentaux de cancers répondants, dans le cadre de l'utilisation de facteurs pro-résolutifs issus de l'efferocytose en traitement. Nos données suggèrent une activité anti-tumorale du traitement SuperMApo pour les modèles expérimentaux de cancers liquides, et plus particulièrement le modèle de cancer péritonéal. Lors de l'éditions des cancers, les cellules du système immunitaire sont recrutées et veillent à l'homéostasie en éliminant les cellules cancéreuses par la mise en place d'une réaction inflammatoire. L'interaction entre cellules cancéreuses et cellules immunitaires engendre l'élaboration par les cellules cancéreuses de mécanismes immunosuppresseurs pour leur permettre de progresser face à cette surveillance immunitaire. Nous avons pu observer que dans le cadre de l'administration de facteurs pro-résolutifs, le taux de cytokine inflammatoire IL-6 diminue, en parallèle du profil suppressif des cellules myéloïdes. Le traitement SuperMApo permet alors de maintenir une veille immunitaire par l'augmentation des macrophages anti-tumoraux associée à une augmentation de la réponse spécifique vis-à-vis de la tumeur par les lymphocytes T. Ce constat suggère que l'administration de facteurs pro-résolutifs dans un modèle expérimental de cancer péritonéal, soutiendrait la surveillance immunitaire et contrebalancerait l'échappement tumorale en réduisant l'immunosuppression et l'inflammation des cellules myéloïdes. Ces différentes observations, issues des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse quant aux mécanismes anti-tumoraux pouvant être mis en place lors de l'administration du traitement SuperMApo, sont synthétisés dans la Figure **33**.

Ces travaux ouvrent de nombreuses questions, quant aux rôles et à la place de la résolution de l'inflammation dans l'édition des cancers mais également dans leur traitement. Ainsi, l'administration de facteurs pro-résolutifs s'avère être une approche novatrice et encourageante pour le traitement des cancers.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

1. Chen, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **9**, 7204-7218 (2018).
2. Serhan, C.N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* **6**, 1191-1197 (2005).
3. Serhan, C.N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* **510**, 92-101 (2014).
4. Fullerton, J.N. & Gilroy, D.W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature reviews. Drug discovery* **15**, 551-567 (2016).
5. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology* **7**, 678-689 (2007).
6. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820 (2010).
7. Jeannin, P., Jaillon, S. & Delneste, Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Current opinion in immunology* **20**, 530-537 (2008).
8. Liew, P.X. & Kubes, P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiological reviews* **99**, 1223-1248 (2019).
9. Koh, T.J. & DiPietro, L.A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine* **13**, e23 (2011).
10. Barnay-Verdier, S., Maréchal, V. & Borde, C. [HMGB1: a link between innate and adaptive immunity]. *Revue francophone des laboratoires : RFL* **2009**, 59-68 (2009).
11. Qian, C. & Cao, X. Dendritic cells in the regulation of immunity and inflammation. *Seminars in immunology* **35**, 3-11 (2018).
12. Cronkite, D.A. & Strutt, T.M. The Regulation of Inflammation by Innate and Adaptive Lymphocytes. *Journal of immunology research* **2018**, 1467538 (2018).
13. Moro-García, M.A., Mayo, J.C., Sainz, R.M. & Alonso-Arias, R. Influence of Inflammation in the Process of T Lymphocyte Differentiation: Proliferative, Metabolic, and Oxidative Changes. *Frontiers in immunology* **9**, 339 (2018).
14. Germolec, D.R., Shipkowski, K.A., Frawley, R.P. & Evans, E. Markers of Inflammation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1803**, 57-79 (2018).
15. Dong, C. Cytokine Regulation and Function in T Cells. *Annual review of immunology* **39**, 51-76 (2021).
16. Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **121**, 1-14 (2007).
17. Dunn, G.P., Old, L.J. & Schreiber, R.D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **21**, 137-148 (2004).
18. Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J. & Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991-998 (2002).

19. Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D. & Smyth, M.J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology* **27**, 16-25 (2014).
20. Zhang, Q., Zhu, B. & Li, Y. Resolution of Cancer-Promoting Inflammation: A New Approach for Anticancer Therapy. *Frontiers in immunology* **8**, 71 (2017).
21. Greten, F.R. & Grivnenikov, S.I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* **51**, 27-41 (2019).
22. Coussens, L.M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-867 (2002).
23. Grivnenikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-899 (2010).
24. Fishbein, A., Hammock, B.D., Serhan, C.N. & Panigrahy, D. Carcinogenesis: Failure of resolution of inflammation? *Pharmacology & therapeutics* **218**, 107670 (2021).
25. Galaine, J., Godet, Y. & Adotévi, O. [Not Available]. *Bulletin du cancer* **103 Suppl 1**, S127-s131 (2016).
26. Yu, Y.R. & Ho, P.C. Sculpting tumor microenvironment with immune system: from immunometabolism to immunoediting. *Clinical and experimental immunology* (2019).
27. Chen, D.S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1-10 (2013).
28. Mattiuz, R. et al. Type 1 conventional dendritic cells and interferons are required for spontaneous CD4(+) and CD8(+) T-cell protective responses to breast cancer. *Clinical & translational immunology* **10**, e1305 (2021).
29. Aymeric, L. (Université Paris Sud - Paris XI, 2011).
30. Lauret Marie Joseph, E. et al. Chemoradiation triggers antitumor Th1 and tissue resident memory-polarized immune responses to improve immune checkpoint inhibitors therapy. *Journal for immunotherapy of cancer* **9** (2021).
31. Pluhar, G.E., Pennell, C.A. & Olin, M.R. CD8⁺ T Cell-Independent Immune-Mediated Mechanisms of Anti-Tumor Activity. *Critical reviews in immunology* **35**, 153-172 (2015).
32. Vakkila, J. & Lotze, M.T. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nature reviews. Immunology* **4**, 641-648 (2004).
33. Cogdill, A.P., Andrews, M.C. & Wargo, J.A. Hallmarks of response to immune checkpoint blockade. *British journal of cancer* **117**, 1-7 (2017).
34. Güç, E. & Pollard, J.W. Redefining macrophage and neutrophil biology in the metastatic cascade. *Immunity* **54**, 885-902 (2021).
35. Murray, P.J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14-20 (2014).
36. Ramos, R.N. et al. CD163(+) tumor-associated macrophage accumulation in breast cancer patients reflects both local differentiation signals and systemic skewing of monocytes. *Clinical & translational immunology* **9**, e1108 (2020).
37. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology* **23**, 549-555 (2002).

38. Sinha, P., Clements, V.K. & Ostrand-Rosenberg, S. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J Immunol* **174**, 636-645 (2005).
39. Hagemann, T. et al. "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. *The Journal of experimental medicine* **205**, 1261-1268 (2008).
40. Qian, B.Z. & Pollard, J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39-51 (2010).
41. Lavy, M., Gauttier, V., Poirier, N., Barillé-Nion, S. & Blanquart, C. Specialized Pro-Resolving Mediators Mitigate Cancer-Related Inflammation: Role of Tumor-Associated Macrophages and Therapeutic Opportunities. *Frontiers in immunology* **12**, 702785 (2021).
42. Kusmartsev, S. & Gabrilovich, D.I. STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol* **174**, 4880-4891 (2005).
43. Quatromoni, J.G. & Eruslanov, E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *American journal of translational research* **4**, 376-389 (2012).
44. Atrekhany, K.S. et al. TNF Neutralization Results in the Delay of Transplantable Tumor Growth and Reduced MDSC Accumulation. *Frontiers in immunology* **7**, 147 (2016).
45. Lauret Marie Joseph, E. et al. Immunoregulation and Clinical Implications of ANGPT2/TIE2(+) M-MDSC Signature in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer immunology research* **8**, 268-279 (2020).
46. Veglia, F. & Gabrilovich, D.I. Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Current opinion in immunology* **45**, 43-51 (2017).
47. Akasaki, Y. et al. Induction of a CD4+ T regulatory type 1 response by cyclooxygenase-2-overexpressing glioma. *J Immunol* **173**, 4352-4359 (2004).
48. Bruchard, M. & Ghiringhelli, F.J.M.S. Microenvironnement tumoral. **30**, 429-435 (2014).
49. Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Serhan, C.N., Stockinger, B. & Tak, P.P. The resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology* **13**, 59-66 (2013).
50. Kourtzelis, I., Hajishengallis, G. & Chavakis, T. Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation. *Frontiers in immunology* **11**, 553 (2020).
51. Rodriguez-Vita, J. & Lawrence, T. The resolution of inflammation and cancer. *Cytokine & growth factor reviews* **21**, 61-65 (2010).
52. McArthur, S. et al. Annexin A1 drives macrophage skewing to accelerate muscle regeneration through AMPK activation. *The Journal of clinical investigation* **130**, 1156-1167 (2020).
53. Porta, C. et al. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology* **214**, 761-777 (2009).
54. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436-444 (2008).
55. Demaria, S. et al. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* **33**, 335-351 (2010).
56. Sugiyama, M. et al. Antagonism of VEGF by genetically engineered dendritic cells is essential to induce antitumor immunity against malignant ascites. *Molecular cancer therapeutics* **10**, 540-549 (2011).

57. Preverte, N. et al. Formyl peptide receptor 1 suppresses gastric cancer angiogenesis and growth by exploiting inflammation resolution pathways. *Oncoimmunology* **6**, e1293213 (2017).
58. Bernard, A. et al. Cleaved Caspase-3 Transcriptionally Regulates Angiogenesis-Promoting Chemotherapy Resistance. *Cancer research* **79**, 5958-5970 (2019).
59. Singh, N. et al. Inflammation and cancer. *Annals of African medicine* **18**, 121-126 (2019).
60. Diakos, C.I., Charles, K.A., McMillan, D.C. & Clarke, S.J. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol* **15**, e493-503 (2014).
61. Marelli, G., Sica, A., Vannucci, L. & Allavena, P. Inflammation as target in cancer therapy. *Current opinion in pharmacology* **35**, 57-65 (2017).
62. Paraíso, I. (Université de Poitiers, 2016).
63. Todoric, J., Antonucci, L. & Karin, M. Targeting Inflammation in Cancer Prevention and Therapy. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* **9**, 895-905 (2016).
64. Greene, E.R., Huang, S., Serhan, C.N. & Panigrahy, D. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins & other lipid mediators* **96**, 27-36 (2011).
65. Zhao, X., Xu, Z. & Li, H. NSAIDs Use and Reduced Metastasis in Cancer Patients: results from a meta-analysis. *Scientific reports* **7**, 1875 (2017).
66. Han, S. et al. Dexamethasone Inhibits TGF-beta1-Induced Cell Migration by Regulating the ERK and AKT Pathways in Human Colon Cancer Cells Via CYR61. *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association* **48**, 1141-1153 (2016).
67. Chae, Y.K. et al. Statins as anti-cancer therapy; Can we translate preclinical and epidemiologic data into clinical benefit? *Discovery medicine* **20**, 413-427 (2015).
68. Gilligan, M.M. et al. Aspirin-triggered proresolving mediators stimulate resolution in cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**, 6292-6297 (2019).
69. Johnson, D.E., O'Keefe, R.A. & Grandis, J.R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nature reviews. Clinical oncology* **15**, 234-248 (2018).
70. Chang, C.H. et al. Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *International journal of cancer* **132**, 1977-1985 (2013).
71. Duluc, D. et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* **110**, 4319-4330 (2007).
72. Ray, A.L., Berggren, K.L., Restrepo Cruz, S., Gan, G.N. & Beswick, E.J. Inhibition of MK2 suppresses IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha-dependent colorectal cancer growth. *International journal of cancer* **142**, 1702-1711 (2018).
73. Jones, S.A. & Jenkins, B.J. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nature reviews. Immunology* **18**, 773-789 (2018).
74. Kang, S., Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. *Immunity* **50**, 1007-1023 (2019).
75. Siersbæk, R. et al. IL6/STAT3 Signaling Hijacks Estrogen Receptor α Enhancers to Drive Breast Cancer Metastasis. *Cancer cell* **38**, 412-423.e419 (2020).
76. Suzuki, K. et al. Phase 1 study in Japan of siltuximab, an anti-IL-6 monoclonal antibody, in relapsed/refractory multiple myeloma. *International journal of hematology* **101**, 286-294 (2015).

77. Trikha, M., Corringham, R., Klein, B. & Rossi, J.F. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**, 4653-4665 (2003).
78. Coward, J. et al. Interleukin-6 as a therapeutic target in human ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 6083-6096 (2011).
79. Montfort, A. et al. The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. *Frontiers in immunology* **10**, 1818 (2019).
80. Wang, X. & Lin, Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta pharmacologica Sinica* **29**, 1275-1288 (2008).
81. Balkwill, F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer metastasis reviews* **25**, 409-416 (2006).
82. Bertrand, F. et al. TNF α blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. *Nature communications* **8**, 2256 (2017).
83. Grégoire, H. et al. Targeting Tumor Associated Macrophages to Overcome Conventional Treatment Resistance in Glioblastoma. *Frontiers in pharmacology* **11**, 368 (2020).
84. Jeannin, P., Paolini, L., Adam, C. & Delneste, Y. The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophages. *The FEBS journal* **285**, 680-699 (2018).
85. Paolini, L. et al. Lactic Acidosis Together with GM-CSF and M-CSF Induces Human Macrophages toward an Inflammatory Protumor Phenotype. *Cancer immunology research* **8**, 383-395 (2020).
86. Casbon, A.J., Lohela, M. & Werb, Z. Delineating CSF-1-dependent regulation of myeloid cell diversity in tumors. *Oncoimmunology* **4**, e1008871 (2015).
87. Kosaka, A. et al. CD47 blockade enhances the efficacy of intratumoral STING-targeting therapy by activating phagocytes. *The Journal of experimental medicine* **218** (2021).
88. Lin, D. et al. Efferocytosis and Its Associated Cytokines: A Light on Non-tumor and Tumor Diseases? *Molecular therapy oncolytics* **17**, 394-407 (2020).
89. Serhan, C.N. & Levy, B.D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *The Journal of clinical investigation* **128**, 2657-2669 (2018).
90. Zhang, J., Endres, S. & Kobold, S. Enhancing tumor T cell infiltration to enable cancer immunotherapy. *Immunotherapy* **11**, 201-213 (2019).
91. Wang, Y.J., Fletcher, R., Yu, J. & Zhang, L. Immunogenic effects of chemotherapy-induced tumor cell death. *Genes & diseases* **5**, 194-203 (2018).
92. Showalter, A. et al. Cytokines in immunogenic cell death: Applications for cancer immunotherapy. *Cytokine* **97**, 123-132 (2017).
93. Garg, A.D. et al. Trial watch: Immunogenic cell death induction by anticancer chemotherapeutics. *Oncoimmunology* **6**, e1386829 (2017).
94. Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nature reviews. Immunology* **17**, 97-111 (2017).
95. Deng, J. et al. Eicosanoid regulation of debris-stimulated metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118** (2021).

96. Revesz, L. Effect of tumour cells killed by x-rays upon the growth of admixed viable cells. *Nature* **178**, 1391-1392 (1956).
97. Topalian, S.L., Taube, J.M., Anders, R.A. & Pardoll, D.M. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* **16**, 275-287 (2016).
98. Boustani, J. et al. Anti-PD-1/Anti-PD-L1 Drugs and Radiation Therapy: Combinations and Optimization Strategies. *Cancers* **13** (2021).
99. Hodi, F.S. Overcoming immunological tolerance to melanoma: Targeting CTLA-4. *Asia-Pacific journal of clinical oncology* **6 Suppl 1**, S16-23 (2010).
100. Rubio, M.T., Galaine, J., Borg, C. & Daguindau, É. Biologie, concepts et principes des CAR-T cells. *Bulletin du cancer* **105 Suppl 2**, S135-s146 (2018).
101. Neelapu, S.S. Managing the toxicities of CAR T-cell therapy. *Hematological oncology* **37 Suppl 1**, 48-52 (2019).
102. Giavridis, T. et al. CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade. *Nature medicine* **24**, 731-738 (2018).
103. Bonavita, E., Pelly, V.S. & Zelenay, S. Resolving the dark side of therapy-driven cancer cell death. *The Journal of experimental medicine* **215**, 9-11 (2018).
104. Preverte, N. et al. New perspectives in cancer: Modulation of lipid metabolism and inflammation resolution. *Pharmacological research* **128**, 80-87 (2018).
105. Sulciner, M.L. et al. Resolvins suppress tumor growth and enhance cancer therapy. *The Journal of experimental medicine* **215**, 115-140 (2018).
106. Saas, P., Daguindau, E. & Perruche, S. Concise Review: Apoptotic Cell-Based Therapies-Rationale, Preclinical Results and Future Clinical Developments. *Stem Cells* **34**, 1464-1473 (2016).
107. Marcelo de Carvalho Bittencourt, S.P., Emmanuel Contassot, Stephanie Fresnay, Marie-Helene Baron, Régis Angonin, Francois Aubin, Patrick Herve, Pierre Tiberghien, and Philippe Saas Intravenous injection of apoptotic leukocytes enhances bone marrow engraftment across major histocompatibility barriers. *Blood* **98** (2001).
108. Perruche, S. et al. Intravenous infusion of apoptotic cells simultaneously with allogeneic hematopoietic grafts alters anti-donor humoral immune responses. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **4**, 1361-1365 (2004).
109. Saas, P., Bonnefoy, F., Toussirot, E. & Perruche, S. Harnessing Apoptotic Cell Clearance to Treat Autoimmune Arthritis. *Frontiers in immunology* **8**, 1191 (2017).
110. Vallion, R. et al. Transforming growth factor-beta released by apoptotic white blood cells during red blood cell storage promotes transfusion-induced alloimmunomodulation. *Transfusion* **55**, 1721-1735 (2015).
111. Bonnefoy, F. et al. Factors Produced by Macrophages Eliminating Apoptotic Cells Demonstrate Pro-Resolutive Properties and Terminate Ongoing Inflammation. *Frontiers in immunology* **9**, 2586 (2018).
112. Bonnefoy, F. et al. Plasmacytoid dendritic cells play a major role in apoptotic leukocyte-induced immune modulation. *J Immunol* **186**, 5696-5705 (2011).
113. Bonnefoy, F. et al. Apoptotic cell infusion treats ongoing collagen-induced arthritis, even in the presence of methotrexate, and is synergic with anti-TNF therapy. *Arthritis research & therapy* **18**, 184 (2016).

114. Gauthier, T. (Université Bourgogne Franche-Comté, 2017).
115. Martin-Rodriguez, O. (Université Bourgogne Franche-Comté, 2017).
116. Martin-Rodriguez, O. et al. Pro-Resolving Factors Released by Macrophages After Efferocytosis Promote Mucosal Wound Healing in Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in immunology* **12**, 754475 (2021).
117. Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Nakagama, H. & Tanaka, T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* **27**, 162-169 (2006).
118. Neufert, C., Becker, C. & Neurath, M.F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nature protocols* **2**, 1998-2004 (2007).
119. Olson, B., Li, Y., Lin, Y., Liu, E.T. & Patnaik, A. Mouse Models for Cancer Immunotherapy Research. *Cancer discovery* **8**, 1358-1365 (2018).
120. Harmey, J.H. et al. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. *International journal of cancer* **101**, 415-422 (2002).
121. Jiang, M. et al. Systemic inflammation promotes lung metastasis via E-selectin upregulation in mouse breast cancer model. *Cancer biology & therapy* **15**, 789-796 (2014).
122. Li, S. et al. Lipopolysaccharide induces inflammation and facilitates lung metastasis in a breast cancer model via the prostaglandin E2-EP2 pathway. *Molecular medicine reports* **11**, 4454-4462 (2015).
123. Lu, Z. et al. A size-shrinkable nanoparticle-based combined anti-tumor and anti-inflammatory strategy for enhanced cancer therapy. *Nanoscale* **10**, 9957-9970 (2018).
124. Luo, J.L., Maeda, S., Hsu, L.C., Yagita, H. & Karin, M. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer cell* **6**, 297-305 (2004).
125. Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet (London, England)* **357**, 539-545 (2001).
126. Balkwill, F., Charles, K.A. & Mantovani, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer cell* **7**, 211-217 (2005).
127. Khanna, C. & Hunter, K. Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* **26**, 513-523 (2005).
128. Pulaski, B.A. & Ostrand-Rosenberg, S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Current protocols in immunology* **Chapter 20**, Unit 20.22 (2001).
129. Damsky, W.E., Theodosakis, N. & Bosenberg, M. Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. *Oncogene* **33**, 2413-2422 (2014).
130. Salem, M.L., El-Naggar, S.A., Mahmoud, H.A., Elgharabawy, R.M. & Bader, A.M. Cyclophosphamide eradicates murine immunogenic tumor coding for a non-self-antigen and induces antitumor immunity. *International journal of immunopathology and pharmacology* **32**, 2058738418796591 (2018).
131. Liu, B., Podack, E.R., Allison, J.P. & Malek, T.R. Generation of primary tumor-specific CTL in vitro to immunogenic and poorly immunogenic mouse tumors. *J Immunol* **156**, 1117-1125 (1996).
132. Logan, G.J., Spinoulas, A., Alexander, S.I., Smythe, J.A. & Alexander, I.E. CD4 expression on EL4 cells as an epiphenomenon of retroviral transduction and selection. *Immunology and cell biology* **82**, 132-135 (2004).

133. Chen, L. et al. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *The Journal of experimental medicine* **179**, 523-532 (1994).
134. Ando, H. et al. B7.1 immunogene therapy effectively activates CD(4+) tumor-infiltrating lymphocytes in the central nervous system in comparison with B7.2 gene therapy. *International journal of oncology* **20**, 807-812 (2002).
135. Stremmel, C., Greenfield, E.A., Howard, E., Freeman, G.J. & Kuchroo, V.K. B7-2 expressed on EL4 lymphoma suppresses antitumor immunity by an interleukin 4-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine* **189**, 919-930 (1999).
136. Zhong, W. et al. Comparison of the molecular and cellular phenotypes of common mouse syngeneic models with human tumors. *BMC genomics* **21**, 2 (2020).
137. Simões, R.L. et al. Lipoxin A(4) selectively programs the profile of M2 tumor-associated macrophages which favour control of tumor progression. *International journal of cancer* **140**, 346-357 (2017).
138. Shan, K. et al. Resolvin D1 and D2 inhibit tumour growth and inflammation via modulating macrophage polarization. *Journal of cellular and molecular medicine* **24**, 8045-8056 (2020).
139. Lechner, M.G. et al. Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* **36**, 477-489 (2013).
140. Stackpole, C.W., Alterman, A.L. & Fornabaio, D.M. Host immunity to mycoplasma antigens introduced into B16 melanoma cells: effect on tumor growth rate and metastasis. *Clinical & experimental metastasis* **6**, 271-284 (1988).
141. Yang, C., Chalasani, G., Ng, Y.H. & Robbins, P.D. Exosomes released from Mycoplasma infected tumor cells activate inhibitory B cells. *PloS one* **7**, e36138 (2012).
142. Heidegger, S. et al. Mycoplasma hyorhinis-Contaminated Cell Lines Activate Primary Innate Immune Cells via a Protease-Sensitive Factor. *PloS one* **10**, e0142523 (2015).
143. Weng, J. et al. Elimination of Mycoplasma Contamination from Infected Human Hepatocyte C3A Cells by Intraperitoneal Injection in BALB/c Mice. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **7**, 440 (2017).
144. Andreani, V., Gatti, G., Simonella, L., Rivero, V. & Maccioni, M. Activation of Toll-like receptor 4 on tumor cells in vitro inhibits subsequent tumor growth in vivo. *Cancer research* **67**, 10519-10527 (2007).
145. Núñez, N.G. et al. IFN β produced by TLR4-activated tumor cells is involved in improving the antitumoral immune response. *Cancer research* **72**, 592-603 (2012).
146. Fu, X.Q. et al. Activation of STAT3 is a key event in TLR4 signaling-mediated melanoma progression. *Cell death & disease* **11**, 246 (2020).
147. Piazuolo, M.B., Riechelmann, R.P., Wilson, K.T. & Algood, H.M.S. Resolution of Gastric Cancer-Promoting Inflammation: A Novel Strategy for Anti-cancer Therapy. *Current topics in microbiology and immunology* **421**, 319-359 (2019).
148. Chung, A.S. et al. An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature medicine* **19**, 1114-1123 (2013).
149. Panigrahy, D., Gilligan, M.M., Serhan, C.N. & Kashfi, K. Resolution of inflammation: An organizing principle in biology and medicine. *Pharmacology & therapeutics*, 107879 (2021).
150. Ye, Y. et al. Anti-cancer and analgesic effects of resolvin D2 in oral squamous cell carcinoma. *Neuropharmacology* **139**, 182-193 (2018).

151. Jeannin, P., Duluc, D. & Delneste, Y. IL-6 and leukemia-inhibitory factor are involved in the generation of tumor-associated macrophage: regulation by IFN- γ . *Immunotherapy* **3**, 23-26 (2011).
152. Coffelt, S.B., Wellenstein, M.D. & de Visser, K.E. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nature reviews. Cancer* **16**, 431-446 (2016).
153. Waight, J.D., Hu, Q., Miller, A., Liu, S. & Abrams, S.I. Tumor-derived G-CSF facilitates neoplastic growth through a granulocytic myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism. *PloS one* **6**, e27690 (2011).
154. Novitskiy, S.V. et al. Deletion of TGF- β signaling in myeloid cells enhances their anti-tumorigenic properties. *Journal of leukocyte biology* **92**, 641-651 (2012).
155. Medicherla, S. et al. Antitumor activity of TGF-beta inhibitor is dependent on the microenvironment. *Anticancer research* **27**, 4149-4157 (2007).
156. Principe, D.R. et al. TGF-beta: duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* **106**, djt369 (2014).