



HAL
open science

Immunité des cancers colorectaux et gastriques avancés, et impact des anti-angiogéniques sur les lymphocytes T régulateurs

Simon Pernot

► To cite this version:

Simon Pernot. Immunité des cancers colorectaux et gastriques avancés, et impact des anti-angiogéniques sur les lymphocytes T régulateurs. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2019. Français. ⟨NNT : 2019UNIP5175⟩. ⟨tel-04047030⟩

HAL Id: tel-04047030

<https://theses.hal.science/tel-04047030v1>

Submitted on 27 Mar 2023

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.



HAL Authorization



UNIVERSITÉ
PARIS
DESCARTES



Université de Paris

Université de Paris

École doctorale Bio Sorbonne Paris cité 562

Laboratoire PARCC-HEGP INSERM U970

Immunité des cancers colorectaux et gastriques avancés, et impact des anti-angiogéniques sur les lymphocytes T régulateurs

Par Simon PERNOT

Thèse de doctorat d'immunologie

Dirigée par Julien Taieb

Présentée et soutenue publiquement le 17 décembre 2019

Devant un jury composé de :

Majid Khatib, DR, rapporteur
Bruno Segui, PU, rapporteur
Nathalie Chaput, PU, examinateur
Laurence Weiss, PUPH, examinateur.
Magali Terme, MCU, examinateur
Julien Taieb, PUPH, directeur de thèse

INSERM U1029, Bordeaux
Centre de recherche en cancérologie de Toulouse
Institut Gustave Roussy
Hôpital Européen Georges Pompidou
Université Paris Descartes
Hôpital Européen Georges Pompidou



Except where otherwise noted, this is work licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Titre : Immunité des cancers colorectaux et gastriques avancés, et impact des anti-angiogéniques sur les lymphocytes T régulateurs

Résumé :

L'immunité joue un rôle dans la survenue et la progression des cancers de l'épithélium digestif glandulaire parmi lesquels le cancer colorectal (CCR) et le cancer gastrique (CG). Cependant les tumeurs induisent des mécanismes d'échappement au système immunitaire, comme l'induction de cellules immunosuppressives, parmi lesquelles les lymphocytes T régulateurs (Treg). Le Bevacizumab (BV) et l'Aflibercept (AFL), deux molécules anti-angiogéniques (AA) ciblant le VEGF, ont montré une efficacité dans le traitement des patients ayant un CCR métastatique (CCRm).

Dans la 1ère partie, je montre le rôle prépondérant de la voie VEGF-A/VEGFR dans ces phénomènes dans un modèle murin de CCR, ainsi que chez des patients atteints de CCRm. En effet, une baisse des Treg était observée chez des patients traités par BV, mais pas dans un groupe contrôle, sans BV. Les anti-VEGF permettaient d'inhiber la prolifération des Treg induits par la tumeur. Il existait une population de Treg exprimant le VEGFR2 chez des souris porteuses de tumeurs. Cette population a été retrouvée chez des patients atteints de cancer, et pourrait être impliquée dans les phénomènes d'immunorégulation en lien avec le microenvironnement tumoral.

Nous avons également étudié la modulation des mécanismes immunorégulateurs induits par l'Aflibercept. Cette molécule cible outre la voie VEGF-2/VEGFR-2 d'autres voies alternatives de l'angiogenèse, qui pourraient être impliquées dans les phénomènes immunomodulateurs. Nous avons pu montrer, dans des modèles murins, et dans le cadre d'études ancillaires d'essais cliniques, que l'aflibercept entraînait une diminution importante des Treg, et plus particulièrement des Treg mémoires, notamment les Treg Th1-like.

Dans une 2ème partie, les Treg circulants, ainsi que d'autres populations suppressives (MDSC circulants et Treg infiltrants la tumeur) ou effectrices (LT CD8⁺, NK) ont été analysés, dans le cadre d'une étude ancillaire d'un essai clinique. Les Treg diminuaient également avec un traitement ciblant HGF/c-Met, voie anti-angiogénique indirecte. De plus, les Tregs circulants étaient moins fréquents chez les patients atteints d'adénocarcinome gastrique de type diffus/mixtes que les types intestinaux. Parallèlement, les patients ayant un CG de type diffus/mixtes avaient une infiltration en cellules effectrices LT CD8⁺ et un taux de NK circulants plus faibles, témoignant d'un phénotype de « cold tumor », ignoré par le système immunitaire. Enfin, les LT CD8⁺ infiltrant et le taux élevé de NK étaient associés à un meilleur pronostic, indépendamment du statut MMR ou du type histologique.

Ces résultats pourraient permettre d'optimiser des stratégies d'immunothérapie ciblant spécifiquement les populations immunosuppressives décrites et les mécanismes impliqués.

Mots clefs : Lymphocytes T régulateurs, Lymphocytes T CD8⁺, Natural killer, cancer colorectal, cancer gastrique, anti-angiogéniques, VEGF

Title: Immunity in advanced colorectal and gastric, and impact of antioangiogenics on T regulatory lymphocytes

Abstract :

Immunity plays a role in the occurrence and progression of cancers of the glandular digestive epithelium including colorectal cancer (CRC) and gastric cancer (GC). However, tumors induce escape mechanisms to the immune system, such as the induction of immunosuppressive cells, including regulatory T cells (Treg). Bevacizumab (BV) and Aflibercept (AFL), two anti-angiogenic (AA) molecules targeting VEGF, have shown efficacy in the treatment of patients with metastatic CRC (mCRC).

In the first part, we showed the preponderant role of the VEGF-A / VEGFR pathway in these phenomena in a mouse model of CCR, as well as in patients with mCRC. Indeed, a decrease of Treg was observed in patients treated with BV, but not in a control group, without BV. Anti-VEGF inhibited the proliferation of tumor-induced Treg. We have also shown that there is a population of Treg expressing VEGFR2 in tumor-bearing mice. This population has also been found in patients with cancer, and may be involved in immunoregulatory phenomena related to the tumor microenvironment.

We also studied the modulation of immunoregulatory mechanisms induced by Aflibercept. This molecule target besides the VEGF-2 / VEGFR-2 pathway other alternative pathway of angiogenesis, which could be involved also in immunomodulatory phenomena. In mouse models, and in the context of ancillary studies of clinical trials, aflibercept led to a significant decrease in Treg, and more particularly in memory Tregs, notably Th1-like Treg.

In a second part, in an ancillary study of a clinical trial, circulating Tregs and others immunosuppressive immune cells (circulating MDSC and tumor infiltrating Treg) and effector immune cells (circulating and infiltrating LT CD8⁺ and NK) were analysed. Treg also decreased with a treatment targeting HGF /c-Met, an indirect antiangiogenic pathway. Circulating Treg were less frequent in patients with diffuse/mixed type gastric adenocarcinoma (SRCC) than in those with intestinal type. In parallel, diffuse/mixed type was associated with less infiltrating LT CD8⁺ and circulating NK, suggesting a "cold tumor" phenotype, ignored by the immune system. Finally, infiltrating LT CD8⁺ and elevated circulating NK proportion were associated with a better prognosis, regardless of MMR status or histological type.

These results could lead to optimize immunotherapy strategies specifically targeting the immunosuppressive populations described and the mechanisms involved.

Keywords : Regulatory T lymphocytes, Lymphocytes T CD8⁺, Natural Killer cells, colorectal cancer, gastric cancer, antiangiogenics, VEGF

Remerciements

Au Professeur Eric Tartour pour sa rigueur scientifique et pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Au Professeur Julien Taieb, pour m'avoir accueilli et accompagné dans son équipe depuis le début de mon internat et jusqu'à la fin de ce doctorat, avec un enthousiasme, une émulation qui m'ont toujours poussé plus loin. Je mesure la chance que j'ai eu de t'avoir eu comme mentor. J'espère que ma migration dans le sud n'empêchera pas de continuer à apprendre à tes côtés.

Au Docteur Magali Terme. Merci pour ton encadrement quasi-maternel et ta patience. Tu m'as enseigné la rigueur et la précision toujours dans la bienveillance et l'excellence. Sans toi, rien n'aurait été possible. J'espère que nous pourrons continuer au-delà de la fin de nos travaux, à collaborer dans de nouveaux projets.

Aux Docteur Majid Khatib et Professeur Bruno Segui qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. J'espère que nous ferons ensemble de beaux travaux dans les années à venir.

Je remercie sincèrement les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail : Professeur Nathalie Chaput, d'avoir accepté de présider ce jury Professeur Laurence Weiss, pour un œil immunologique averti extra-oncologique, et pour les nombreuses collaborations cliniques que nous avons pu mener ces dernières années,

A tous mes collègues de l'équipe 10 que j'ai pu côtoyer de près ou de loin depuis mon master et qui ont contribué à l'ambiance scientifique et humaine propice à un travail serein et de qualité : Federico, Elie, Mevyn, Nadine, Thibault, Anne-Laure, Laure (merci pour les souris !) Alexandra (merci pour les souris aussi !), Oriane, Ariane, Juliette, Nadine, Corinne, Thi, Marion, Alice, Charlotte, Joséphine, Isabelle, Cécile, Laetitia, et tous les autres,

A mes anciens collègues du service d'oncologie digestive de l'HEGP : Céline, Bruno, Jean-Nicolas, Géraldine, Aziz, Alexandra, Widad, Claire, Edouard, et toute les équipes d'oncologie digestive et d'ailleurs à l'HEGP. Pendant ces 7 ans passées à vos côtés, j'ai continuellement appris de votre excellence, et toujours dans la bonne humeur et la modestie.

Au Professeur Philippe Rougier, qui m'a fait découvrir l'oncologie digestive dans tous ses aspects cliniques, scientifiques et humains, et grâce à qui je me suis orienté vers ce domaine, a dirigé ma thèse d'exercice, et dont je peux dire avec fierté qu'il

a été aussi un mentor dont je souhaite continuer à m'inspirer dans ma vie professionnelle future.

A mes anciennes Co chefs : Oriane, Anne-Laure, Jeanne pour avoir formé des équipes chics et de choc. Et particulièrement à Clélia d'avoir partagé mes doutes existentielles et scientifiques pendant cette thèse et de me les avoir faits relativiser !

A mes nouveaux collègues : Serge, Dominique, Marianne, Grégoire et ceux qu'il me reste à découvrir. Merci de m'accueillir dans un environnement bienveillant et stimulant. Merci de votre confiance.

A mes parents, beaux-parents et toute ma famille.

A Lucie, et mes enfants Sacha, Adèle et Oscar qui illuminent chacune de mes journées. Merci Lucie de supporter mes absences et toutes ces soirées de travail. Je vous dédie ce travail en espérant vous rendre aussi fiers que je le suis de vous tous.

Liste des principales abréviations

ADCC	cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADCP	phagocytose cellulaire dépendante des anticorps
CCR	Cancer colorectal
CCRm	Cancer colorectal métastatique
CG	Cancer gastrique
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
CTL	Cytotoxic T Lymphocytes
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DC	cellules dendritiques
dMMR	deficient Mismatch Repair
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
IFN γ	Interferon γ
ICI	Inhibiteur des checkpoint immunitaires
IL	Interleukin
LB	Lymphocytes B
LT	Lymphocytes T
M-CSF	Monocytes colony-stimulating factor
MDSC	Myeloid derived suppressor cells
MMR	Mismatch repair (système de réparation des mésappariements)
MSS	Stabilité des séquences microsatellites
MSI	Instabilité des séquences microsatellites
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T
PBMC	Les cellules mononuclées du sang périphérique
PD-1	Programmed cell death 1
PD-L1	Programmed cell death ligand 1
PIGF	Placental Growth Factor
pMMR	proficient mismatch repair
TAA	Tumor associated antigens
TAM	Tumor associated macrophages
TNF α	Tumor necrosis factor α
Treg	Lymphocytes T régulateurs
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Sommaire

REMERCIEMENTS	4
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	6
SOMMAIRE	7
INTRODUCTION	9
CHAPITRE 1 : IMMUNITE ET CANCER	9
1- LE CONCEPT D'IMMUNOSURVEILLANCE	9
2- LES PRINCIPAUX ACTEURS DE LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE	10
3- LES ACTEURS DE LA REPONSE IMMUNITAIRE ACQUISE	13
4- MECANISMES D'ÉCHAPPEMENT IMMUNITAIRE	18
5- LES BASES DE L'IMMUNOTHERAPIE ANTICANCEREUSE	42
CHAPITRE 2 : IMMUNITE ET CANCERS DIGESTIFS	46
1- SPECIFICITE DE L'IMMUNITE DANS LE CANCER COLORECTAL	46
2- PRINCIPAUX RESULTATS DE L'IMMUNOTHERAPIE DANS LE CANCER COLORECTAL.....	51
4- SPECIFICITE DE L'IMMUNITE DANS LE CANCER GASTRIQUE	54
5- PRINCIPAUX RESULTATS DE L'IMMUNOTHERAPIE DANS LE CANCER GASTRIQUE.....	58
CHAPITRE 3 : ANGIOGENESE ET IMMUNITE	60
1- L'ANGIOGENESE.....	60
2-EFFETS IMMUNITAIRES DES FACTEURS DE L'ANGIOGENESE.....	71
3 -LES ANTI-ANGIOGENIQUES DANS LES CANCERS DIGESTIFS	75
4- EFFETS IMMUNOMODULATEURS DES ANTI-ANGIOGENIQUES DANS LES MODELES PRECLINIQUES.....	79
5- EFFETS IMMUNOMODULATEURS DES ANTI-ANGIOGENIQUES CHEZ L'HOMME.....	81
6-COMBINAISON IMMUNOTHERAPIES/ANTI-ANGIOGENIQUES.....	83
OBJECTIFS DE LA THESE	89
RESULTATS.....	91
PARTIE I : MECANISMES REGULATEURS INDUITS PAR LE VEGF ET LES ANTI-VEGF DANS LE CANCER COLORECTAL	91
PARTIE II : ÉTUDE DE L'IMPACT CLINIQUE DE L'INFILTRAT IMMUNITAIRE ET DES CELLULES IMMUNITAIRES CIRCULANTES DANS LE CANCER GASTRIQUE AVANCE.	120
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	145
CONCLUSION GENERALE.....	158
ANNEXES	160
BIBLIOGRAPHIE	186

TABLE DES MATIERES221

TABLE DES ILLUSTRATIONS227

Introduction

Chapitre 1 : Immunité et cancer

1- Le concept d'immunosurveillance

Le rôle de l'immunité en cancérologie a été suspecté dès 1909, par Ehrlich qui émettait l'hypothèse que le système immunitaire pouvait influencer le développement des carcinomes. Le concept d'immunosurveillance est finalement né en 1957, décrit par Burnett comme la capacité du système immunitaire à réagir contre les antigènes tumoraux permettant la régression de la tumeur avant son expression clinique.

Cependant ce concept d'immunosurveillance a longtemps été remis en question. En effet, en 2000 lorsque Hanahan énonçait les 6 critères nécessaires au développement d'une tumeur, l'immunité n'était pas citée (1).

L'immunosurveillance a en pratique d'abord été suspectée devant la survenue plus fréquente de cancer chez des patients en situation d'immunodéficience. Le suivi de cohortes de patients transplantés et de sujets infectés par le Virus de l'immunodéficience acquise (VIH) a notamment montré une forte augmentation de l'incidence de certains cancers (rénaux, pulmonaires, pancréatiques, coliques, mélanomes) (2,3).

Mais chez l'homme comme chez l'animal cette sur-incidence de néoplasies chez les patients immunodéprimés a longtemps été attribuée par certains au rôle carcinogène de certains agents pathogènes (Epstein Barr Virus (EBV), Human Papilloma Virus (HPV), VIH...) ne reconnaissant pas ainsi le rôle central du système immunitaire dans la prévention de la survenue des cancers. Le concept d'immunosurveillance anti-tumorale a finalement été démontré dans des modèles animaux par les travaux de l'équipe de Schreiber (4). Ces travaux ont porté sur la survenue de néoplasies spontanées chez des souris immunocompétentes ou déficientes durant une longue période. Les animaux étaient élevés dans une animalerie exempte d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) durant 15 à 21 mois. Il a ainsi montré que sur cette période d'observation les souris immunocompétentes ne développaient aucune tumeur maligne, alors que les souris RAG2^{-/-}, déficientes en lymphocytes T et B, développaient des tumeurs malignes essentiellement coliques et pulmonaires (non connues comme étant associées à un agent infectieux) dans environ 50% des cas. Une troisième population d'animaux encore plus

immunodéficients, les souris RAG2^{-/-}/STAT1^{-/-}, déficientes en lymphocytes T et B et insensibles aux interférons de type 1 et 2, développaient une néoplasie dans environ 80% des cas. Depuis de nombreux travaux ont montré l'implication, selon le modèle, d'acteurs de la réponse innée et de la réponse adaptative dans la protection d'un organisme contre la survenue de néoplasies malignes (5).

Au-delà de la capacité du système immunitaire à protéger notre organisme contre l'apparition de néoplasie et de ce concept d'immunosurveillance, il semble qu'il soit aussi capable de limiter la croissance et l'extension de tumeurs établies. De nombreux travaux ont montré le rôle pronostique bénéfique d'infiltrats de cellules immunitaires effectrices comme les lymphocytes T ou NK dans et autour de tumeur solide chez l'homme.

2- Les principaux acteurs de la réponse immunitaire innée

2.1- Les cellules Natural Killer

Les cellules Natural Killer (NK) jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Il s'agit d'acteurs de la réponse immunitaire non spécifique et non restreinte par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (6). Les NK expriment deux types de récepteurs : les récepteurs activateurs, en particulier le NKG2D, et les récepteurs inhibiteurs cytotoxiques (killer inhibitory receptor KIR). NKG2D peut lier différents ligands, qui peuvent être surexprimés par la tumeur en réponse à un stress cellulaire, comme les chaînes liées au CMH classe I (MHC-class I related chains (MIC)), ou les Unique Long 16-binding Protein (ULBP) (7). Le stress cellulaire peut être déclenché par diverses stimuli, comme l'altération de l'ADN, des signaux liés à la prolifération, ou des signaux liés à l'engagement de Toll Like Receptor (TLR). Les récepteurs inhibiteurs reconnaissent au contraire des molécules constitutivement exprimées et de manière ubiquitaire sur les cellules normales, en particulier les molécules du CMH de classe I (7,8). Ainsi, ces récepteurs inhibiteurs préviennent donc la cytotoxicité des NK envers les cellules normales, tandis que l'activation de cette cytotoxicité résulte d'un déséquilibre de la balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs lors d'un stress cellulaire (9). Les cellules NK ont une action cytolytique et pro-apoptotique directe sur les cellules tumorales par l'exocytose de granules cytotoxiques contenant les perforines et granzymes, et par l'activation des voies Fas/FasL et TRAIL-TRAIL-R. De plus, les NK activés peuvent

exercer un effet anti-tumoral par d'autres mécanismes comme la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), ou la sécrétion d' $\text{IFN}\gamma$ (10), induisant ainsi l'expression des molécules du CMH par les cellules tumorales, et la stimulation des LT CD4^+ et CD8^+ . Les NK jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la croissance et de la dissémination tumorale comme cela a été observé dans des modèles murins (11,12) et chez l'homme (13–15). En particulier, les cellules NK pourraient être impliquées dans la protection contre les cellules initiateuses de cancer (CIC) (16). Les CIC se caractérisent par une croissance lente et une résistance aux traitements cytotoxiques et aux radiations et jouent un rôle crucial dans la récurrence de la tumeur. Des données récentes suggèrent que les CIC sont plus sensibles aux NK car ils expriment fortement les ligands NKP30 et NKP44 et expriment de faibles niveaux de molécules de CMH de classe I (16).

2.2- Les macrophages

Les macrophages sont des cellules phagocytaires de l'immunité innée qui éliminent les cellules apoptotiques et sont retrouvées dans la plupart des tissus normaux. Les macrophages reconnaissent les cellules altérées et certains organismes pathogènes grâce à différents récepteurs comme la famille des Lectin-like de type C, ou des récepteurs scavengers. Ils peuvent également exprimer les récepteurs Fc, permettant de détruire des cellules altérées ou pathogènes ciblées par des anticorps par le mécanisme de phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP). L' $\text{IFN}\gamma$ joue également un rôle crucial dans l'activation des macrophages (12). Enfin, les macrophages peuvent aussi exprimer NKG2D, participant à leur activation (17).

Elles interviennent également contre le développement des cellules tumorales (Mantovani 1992). Les macrophages infiltrant la tumeur (Tumor Associated Macrophages TAM) peuvent être séparées en 2 sous-populations distinctes, ayant des rôles différents dans l'immunité anti-tumorale (18): Les TAM M1 ciblent les cellules altérées, produisent des molécules pro-inflammatoires (IL-6, IL-12, IL-23 et $\text{TNF}\alpha$). Ces cellules expriment fortement les molécules du CMH de classe II et de costimulation et participent ainsi à l'activation de la réponse adaptative. Ils peuvent détruire les cellules tumorales par l'ADCP. Les TAM M1 ont donc une action plutôt anti-tumorale. A l'inverse, les TAM M2, physiologiquement impliqués dans des processus de réparation tissulaire, favorisent la progression tumorale par la sécrétion de cytokines immunosuppressive (IL-10, $\text{TGF}\beta$) et de VEGF. La présence de ces deux composants

dans des proportions variées dans les différents types de cancer explique que les macrophages, bien que souvent associés à un moins bon pronostic dans de nombreux types de cancers, soient parfois au contraire associées à une meilleure survie (19).

2.3- Les lymphocytes non conventionnels

Les cellules Natural Killer T (NKT) partagent des caractéristiques des cellules NK et des cellules T (20,21). Comme les cellules T, elles expriment un TCR et le CD3. Cependant ce TCR ne reconnaît pas le complexe CMH/peptide, mais l' α -galactosylceramide (α GalCer), un ligand glycolipidique, présenté par CD1d, une molécule apparentée au CMH de classe I (22). Elles expriment également le NKG2D. Une fois activées, les NKT secrètent de nombreuses cytokines proinflammatoires (INF γ , IL-2, TNF- α) (23,24) et des molécules impliquées dans la mort cellulaire (perforin, Fas-L, TRAIL) (25,26). Les cellules NKT ont donc plutôt un rôle anti-tumoral (27,28). Cependant, plus récemment, des travaux ont permis de distinguer 2 types de NKT : les NKT de type I, au TCR invariant et reconnaissant l' α GalCer, et ayant les activités décrites ci-dessus, et les NKT de type II, exprimant des TCR variables et reconnaissant d'autres ligands que l' α GalCer présentés par CD1d (29,30). Ces derniers auraient un rôle plutôt immunosuppresseur et pourrait favoriser la croissance tumorale (31,32).

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont une population de lymphocytes T périphériques CD4⁻CD8⁻ et exprimant un TCR combinant une chaîne γ et une chaîne δ . Ils sont peu présents dans la circulation périphérique, mais peuvent atteindre jusqu'à 50% des lymphocytes T dans certains tissus épithéliaux comme l'épithélium intestinal et cutané. Ils peuvent reconnaître des ligands non peptidiques phosphorylés, les « phosphoantigènes », qui peuvent être surexprimés par la tumeur (33), et expriment NKG2D par lequel ils peuvent également avoir une action anti-tumorale.

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont montré une activité cytotoxique puissante dans un certain nombre de tumeurs dont les cancers colorectaux (34).

3- Les acteurs de la réponse immunitaire acquise

3.1- Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) ont été découvertes dans les années 70 dans la rate de souris (35). Les DC regroupent en fait une population très hétérogène, traduisant différents stades d'activation et de maturation. Le processus de maturation des DC peut schématiquement se décrire ainsi :

- Les DC immatures proviennent des progéniteurs des DC et colonisent les tissus périphériques. Dans ces tissus périphériques, elles jouent le rôle de sentinelle, et possèdent des capacités de capture antigéniques puissantes. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la capture antigénique par les DC : 1) la macropinocytose, processus par lequel des invaginations de la membrane forment des vésicules qui captent de manière non sélective des antigènes solubles; 2) l'endocytose faisant intervenir de nombreux récepteurs (Pattern Recognition Receptor, PRR dont les MMR) capables de reconnaître des structures communes à différents pathogènes, les Pathogen associated molecular Patterns (PAMP) ou libérées lors de lésions tissulaires, les Damage associated molecular Patterns (DAMP) ; 3) la phagocytose de corps apoptotiques, où l'internalisation de corps apoptotique est médiée par les récepteurs membranaires FC ou les récepteurs du complément (36).

- Les DC s'engagent alors dans un processus de migration vers les organes lymphoïdes secondaires et de maturation,

- Lors de cette maturation, a lieu un phénomène d'apprêtement des antigènes, et la formation des complexes CMH/peptide.

- Cette maturation s'accompagne également de l'expression de différentes molécules membranaires dont les molécules de co-stimulation B7-1 ou CD80, B7-2 ou CD86, CD40, les molécules comme ICAM-1, LFA-1 ou des récepteurs de chimiokines favorisant leur migration, et la sécrétion de cytokines participant à la polarisation de la réponse effectrice.

Ces DC matures acquièrent ainsi leur fonction de CPA et perdent en parallèle leur capacité d'endocytose.

Elles constituent l'interface privilégiée entre la réponse immune innée et adaptative. En effet, d'une part elles sont sensibles aux modifications du microenvironnement local induites par certains pathogènes, et produisent localement des chimiokines capables de déclencher une réaction inflammatoire et une réponse immunitaire innée. D'autres part elles sont considérées

comme les principales CPA, et enclenchent l'activation des LT pour une réponse adaptative spécifique ou au contraire un maintien de la tolérance.

Outre le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative, une sous population de DC, les IKDC, régule la réponse immunitaire tumorale en constituant la principale source d'IFN γ , cytokine essentielle pour l'immunosurveillance (37).

La maturation des DC est régulée par différents facteurs du microenvironnement tumoral produits par les cellules de l'immunité innée ou par les cellules tumorales comme l'IL-1, l'IL-15, le TNF- α , le GM-CSF et, comme nous le verrons plus tard le VEGF.

3.2- Les lymphocytes B

Les lymphocytes B, lors de leur activation, se différencient en plasmocytes, et produisent des anticorps. Les cellules exprimant les antigènes reconnus par ces anticorps sont alors détruites soit par un mécanisme direct, soit par un mécanisme indirect mettant en jeu l'ADCC. Bien que des anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux soient retrouvés chez la plupart des patients atteints de cancer, la réponse humorale semble jouer un rôle mineur dans l'immunité anti-tumorale. Les anticorps spécifiques sont cependant largement utilisés en thérapeutique. D'autres mécanismes impliquant les LB peuvent participer à la réponse immunitaire anti-tumorale. Une cytotoxicité directe, liée à l'expression de FasL a été décrite (38). Ils peuvent également moduler la réponse immunitaire cellulaire, par la production de cytokines, tel que le CCL22 (39), et en jouant le rôle de CPA dans la tumeur (40). Enfin, il a également été mis en évidence des sous-populations de LB régulatrices, produisant des cytokines immunosuppressives ou exprimant le PD -L1, susceptibles de favoriser la croissance tumorale (41).

3.3- Les lymphocytes T CD4⁺

3.3.1 Généralités sur les LT CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ sont des lymphocytes dit auxiliaires, qui n'agissent généralement pas directement sur leur cible mais exercent leur action en régulant d'autres types cellulaires. Ils jouent un rôle important pour la prolifération des LT CD8⁺ et des LB, en particulier via la sécrétion d'IL-2.

Une fois activés, les LT CD4⁺ peuvent se différencier en différentes sous-populations largement étudiées et aux fonctions différentes. Les principales sous populations effectrices sont les Th1, les Th2, et les Th17. D'autres populations ont plus récemment été décrites, comme les Th22, les Th9 et les Tfh. Les CD4⁺ peuvent également se différencier en sous-populations régulatrices, les Treg, qui seront abordés ultérieurement.

La polarisation des CD4⁺ en l'une ou l'autre sous-population est régulée essentiellement pendant l'activation (priming) par l'environnement cytokinique, qui lui-même dépend de la CPA et des cellules de l'immunité innée activées par le pathogène, et d'autres facteurs du microenvironnement. Ces signaux activent différentes voies de signalisations, STAT, qui vont induire différents facteurs de transcription à l'origine de marqueurs membranaires et d'une production de cytokine spécifique à chacune des sous-populations. Les différentes sous-populations effectrices jouent des rôles différents dans le cancer.

3.3.2-La polarisation des LT CD4⁺

LT CD4⁺ Th1

La polarisation Th1 est favorisée par la production d'IL-12 et d'IFN γ par les CPA, à un stade précoce de l'activation des LT naïfs. La différenciation Th1 implique l'activation séquentielle des voies de signalisations STAT1 et STAT3, et le facteur de transcription Tbet (42). Les Th1 favorisent la réponse immunitaire cellulaire par la production d'IFN γ , ce qui crée également une boucle de rétrocontrôle positif stabilisant la réponse Th1, et d'autres cytokines comme l'IL-2, TNF α , GM-CSF et M-CSF. Les Th1 ont plusieurs mécanismes d'actions. Les principaux sont l'activation des macrophages, la participation à l'induction de l'activité cytotoxique des LT CD8⁺ et des NK, l'activation des DC par l'engagement de CD40L, et la génération de LT mémoires (43–45). Les Th1 favorisent donc une réponse anti-tumorale efficace, et l'infiltrat tumoral Th1 est associé à un meilleur pronostic dans de nombreux types de tumeurs comme les cancers du sein, du larynx, de l'ovaire, colorectaux, cérébraux et cutanés (46–49).

Les LT CD4⁺ Th2

La polarisation Th2 est favorisée par l'IL-4 (50,51). L'activation de l'IL-4R active la voie de signalisation STAT6, qui induit le facteur de transcription GATA3. Les Th2 sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-9, de l'IL-10 et de l'IL-13. Une différenciation Th2 est induite par différentes cellules de l'immunité innée, par exemple en réponse contre les parasites de type

helminthes, ou l'allergie. Les cytokines de type Th2 stimulent la différenciation et la maturation des LB. Dans la réponse immunitaire anti-tumorale, les Th2 sont plutôt jugés délétères. Cela pourrait être lié à la sécrétion d'IL-10, susceptible d'altérer la maturation des DC et d'induire des Treg (Ellyard Tissue antigens 2007 ; Kennedy Immunol Rev 2008), Cependant certaines études dans des modèles murins retrouvent une activité anti-tumorale des Th2 (52–55), tandis que d'autres études dans différents cancers retrouvent une valeur pronostique positive des Th2 (56,57). En fait, le rôle immunosuppresseur des Th2 pourrait être lié en partie à une balance Th1/Th2 au détriment de la réponse Th1 (58–60).

Les LT CD4+ Th17

Les cellules Th17 ont été initialement identifiées dans le contexte de la maladie auto-immune. Leur processus de différenciation est contrôlé par les facteurs de transcription STAT3 et ROR γ t et nécessite une exposition à différentes cytokines dont IL-6, TGF β , puis IL-23 à un stade plus tardif de leur différenciation (61,62). Les Th17 produisent de l'IL-17, de l'IL-22 et de l'IL-23 (63–66). L'IL-17 active le recrutement des polynucléaires neutrophiles et l'IL-22 agit directement sur les cellules épithéliales (67). Les Th17 ont été retrouvés dans de nombreux types de tumeurs (68). La fonction de ces cellules dans la réponse anti-tumorale dépend fortement du contexte. En effet, des effets favorisant la tumeur et inhibant la tumeur ont tous deux été rapportés. De nombreuses données suggèrent un effet pro-tumoral de l'IL-17, en empêchant l'apoptose des cellules tumorales, en diminuant les réponses anti-tumorales, en augmentant l'angiogenèse et en stimulant la diffusion métastatique (69). A l'inverse, d'autres études montrent que l'IL-17 peut être suppresseur de tumeur. Bien que le mécanisme précis ne soit pas élucidé, l'IL-17 pourrait avoir une fonction anti-tumorale en modulant les réponses immunitaires adaptatives via le recrutement de lymphocytes T, et en augmentant l'action des cellules NK, favorisant ainsi la prolifération et l'activation des CTL. Les différents mécanismes d'action pro et anti tumoral des Th17 sont résumé dans la figure suivante.

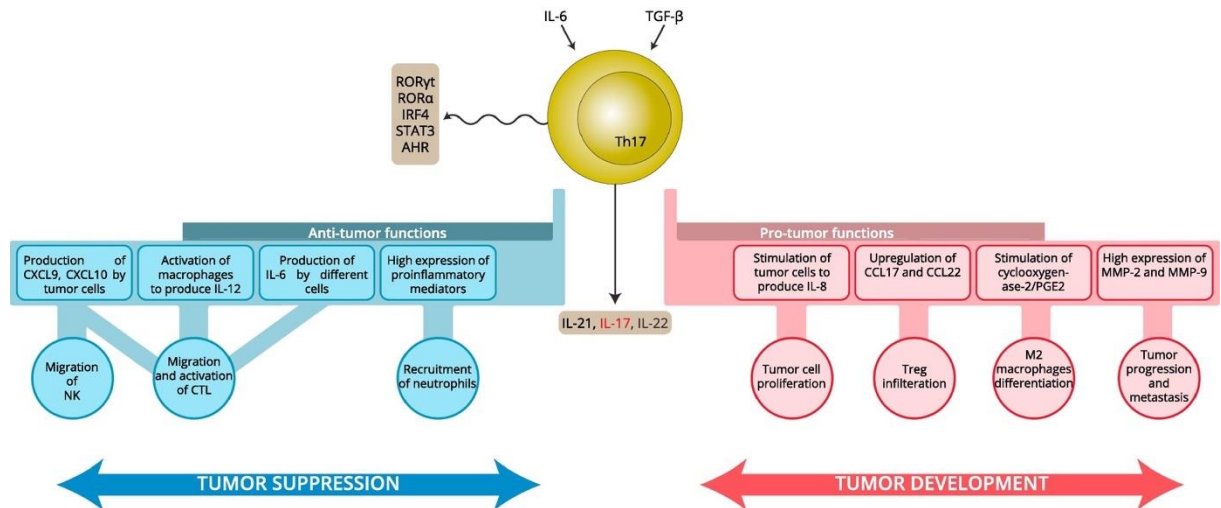


Figure 1. Effets pro et anti-tumoraux des Th17

D'après Asadzadeh Cell Immunol 2017

3.4- Les lymphocytes T CD8⁺ ou LT cytotoxiques (CTL)

Les LT CD8⁺ reconnaissent, par leur T cell receptor (TCR), un antigène tumoral spécifique lié au CMH I à la surface d'une CPA. Les LT CD8⁺ naïfs sont ainsi activés au niveau des ganglions suite à leur contact avec les CPA, principalement les DC. En bref, les CPA capturent, traitent et présentent les antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD8 via le CMH de classe I. L'activation des lymphocytes T nécessite 3 signaux : (1) reconnaissance du peptide antigénique présenté par les CPA; (2) un signal délivré par les molécules co-stimulatrices (CD80 / CD28, CD40 / CD40L); et (3) la production de cytokines (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IFN γ). Les cellules T CD8 activées peuvent reconnaître et lyser les cellules tumorales grâce aux systèmes perforine/granzyme et Fas/Fas-ligand. Les CTL jouent un rôle majeur dans l'immunosurveillance (70). L'infiltrat tumoral en CTL a été démontré comme un facteur pronostique majeur dans de nombreux types tumoraux incluant les cancers du poumon, du sein, de la prostate, colorectaux, ORL, des ovaires, de la vessie, du pancréas, du foie, et les mélanomes (46).

3.5- Les antigènes associés aux tumeurs (Tumor associated antigens, TAA)

Les antigènes associés à la tumeur sont présentés aux LT par les CMH ou directement par le BCR (B cell receptor) des lymphocytes B. De nombreux antigènes tumoraux immunogéniques ont été isolés. Les TAA sont classés en 5 groupes :

-Les antigènes spécifiques du groupe cancer testis (exemples : MAGE1-10 , NY-ESO-1) exprimés par les cellules normales et germinales.

-Les antigènes de différenciation (exemples : MART-1, gp100, PSA) spécifiques à un tissu donné. -Les antigènes surexprimés par la tumeur (exemples : Her2/Neu, ACE).

-Les antigènes uniques et spécifiques de tumeurs issus de mutation qu'on appelle des néoantigènes (exemples : β -catenin, CDK-4, Ras).

-Les antigènes viraux (exemples : HPV, VHB, VHC, EBV).

4- Mécanismes d'échappement immunitaire

La plupart des cancers survenant chez des patients immunocompétents, les cellules tumorales vont cependant réussir à l'aide de divers mécanismes, à contourner cette immunosurveillance dans un certain nombre de cas.

4.1-Mécanismes intrinsèques à la cellule tumorale

4.1.1 Régulation négative de l'expression du CMH de classe I

La diminution de l'expression du Human Leukocyte Antigen class I (HLA-I), le CMH de classe I humain, est un mécanisme d'échappement immunitaire développé par la tumeur décrit depuis de nombreuses années. Elle est à l'origine d'une diminution de la réponse T cytotoxique intratumorale (71). Elle est retrouvée dans 35 à 90% des cancers chez l'homme en fonction du

type tumoral, et est associé à la diffusion métastatique. La perte d'expression du CMH I est associée à une moins bonne survie globale dans certains cancers (72,73). Différents mécanismes peuvent conduire à cette régulation négative, pouvant conduire dans certains cas à une perte complète et irréversible, et dans d'autres cas à une diminution de l'expression réversible.

Altérations structurelles du CMH I

Une perte complète d'HLA-I peut être due à des altérations structurelles, par exemple, des délétions homozygotes, une instabilité des micro-satellites (MSI), des mutations et une perte d'hétérozygotie. Cependant ces anomalies sont finalement assez rarement retrouvées à l'exception de l'inactivation du gène de la β 2-microglobuline retrouvé plus fréquemment dans certains types de cancers, en particulier les mélanomes, les cancers colorectaux et les cancers du poumons (74–78).

Régulation épigénétique du CMH I

Sur le plan épigénétique, la méthylation de l'ADN et l'intervention des inhibiteurs des histones deacetylase (HDAC) a été décrite, pouvant conduire par exemple à la régulation négative de l'expression de LMP7/TAP2 (79–82). Cette modulation au niveau épigénétique semble être lié à l'IFN γ , qui pourrait réguler positivement l'expression du CMH de classe I (83), en particulier au niveau transcriptionnel. Des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle variés ont récemment été décrits. Les acteurs de cette régulation appartiennent aux familles des RNA-binding proteins (RBP) et des microRNAs (miRNA) (82).

Impact de la perte d'expression du CMH I

Impact pronostic

La perte d'expression du CMH I a un impact sur le pronostic des patients atteints de cancer. Dans une étude portant sur plus de 450 patients atteints de cancer colorectaux opérés, les tumeurs présentant une faible expression de CMH I étaient associées à une survie spécifique nettement plus courte (moyenne 41 mois, IC 95% : 26-56) par rapport aux tumeurs présentant

une expression élevée de CMH I (moyenne 68 mois, IC 95% : 63 -74). De manière surprenante, les patients présentant une tumeur avec une perte complète de l'expression de CMH I avaient un pronostic similaire à celui des patients avec une expression élevée (survie spécifique moyenne 60 mois, IC 95% : 50-69). Ceci peut être dû à une activation des cellules NK contre les cellules tumorales HLA-I-négatives.

Impact thérapeutique

Le mécanisme de la perte d'expression peut également avoir un impact direct sur l'efficacité thérapeutique. En effet il est établi que la régulation négative de l'expression du CMH I pourrait être une voie de résistance acquise aux immunothérapies actuellement utilisées, dépendant directement des mécanismes impliqués. Les pertes complètes liés aux altérations génétiques des molécules du CMH I sont irréversibles, et la pression immunitaire sous immunothérapie conduit à la sélection clonale de cellules tumorales portant ces altérations (Zaretsky NEJM 2016). Au contraire, les régulations négatives du CMH I d'origines épigénétiques, transcriptionnelles ou post-transcriptionnelles pourraient être réversibles lors d'une immunothérapie, sous l'effet de cytokines de type Th1 (71)

4.1.2 Autres mécanismes d'échappement intrinsèques à la cellule tumorale

D'autres mécanismes d'échappement tumoral ont été décrit :

- l'absence d'expression de CD80/CD86 par les cellules tumorales, alors qu'ils ont la capacité de présenter l'antigène par le CMH I (84), peut aboutir à l'anergie des cellules T, induite par l'absence de signal de co-stimulation lors de l'engagement du TCR.
- l'échappement à l'apoptose ; Pour échapper aux signaux d'apoptose médiés par la voie Fas/FasL, les cellules tumorales peuvent réguler négativement l'expression de Fas, libérer du Fas soluble ou encore induire des anomalies dans la cascade du signal de transduction de Fas (85).

- L'expression de cytokines immunosuppressives par la cellule tumorale, comme le TGF- β , le VEGF, le Prostaglandine E2 (PGE2), et l'IL-10 (85).

- la diminution ou la perte de l'expression des antigènes par la tumeur, par sélection clonale ou par régulation post-transcriptionnelle (86).

4.2 - Les mécanismes extrinsèques à la cellule tumorale

Une des principales stratégies utilisées par les cellules tumorales pour échapper au système immunitaire, est l'induction de cellules immunosuppressives empêchant la réaction de l'hôte contre la tumeur. Parmi elles, deux populations ont particulièrement été étudiées au cours des 10 dernières années, les lymphocytes T régulateurs (Treg) et les cellules myéloïdes suppressives (Myeloid derived suppressor cells ou MDSC). D'autres mécanismes d'immunorégulation ont également été décrits.

4.2.1 - Les Lymphocytes T régulateurs

La tolérance du soi est maintenue par différents mécanismes. Un des principaux mécanismes est la tolérance centrale. Elle correspond à l'élimination des lymphocytes T spécifiques des antigènes du soi au niveau des organes lymphoïdes primaires, lors de la maturation des LT, par un processus de sélection négative, à l'origine de la destruction des LT qui lie les complexes CMH/peptide du soi avec une trop forte affinité. Cependant, certains LT auto-réactifs échappent à cette sélection négative, et des mécanismes de tolérance périphériques rentrent alors en jeu. Parmi ces mécanismes, les lymphocytes T régulateurs sont des cellules immunosuppressives capitales pour la maintenance de la tolérance du soi.

Les premières preuves expérimentales de cellules dérivées du thymus jouaient un rôle dans la tolérance périphérique datent des années 60. En effet, chez des souris thymectomisées, et donc échappant à la tolérance centrale, une greffe de thymus au 7^e jour (87) permettait d'éviter le développement de maladie auto-immunes, que l'on observait chez les souris non greffées. Dans d'autres expériences, des souris thymectomisés bénéficiaient des transferts de cellules

thymiques associées à une greffe de moelle (88) ce qui permettait d'induire une tolérance vis à vis d'injection répétées de globules rouges de mouton, qui n'était pas retrouvée après greffe de moelle seule.

Cependant, ces cellules thymiques régulatrices ont longtemps été négligées, et il a fallu attendre la fin des années 90 pour que la communauté scientifique s'accorde sur l'existence d'une telle population.

Plusieurs études ont alors suggéré l'existence de deux populations LTCD4⁺ distinctes. Tout d'abord, dans des modèles murins de maladies auto-immunes, il a été montré que le transfert de LT CD4⁺ d'animaux histocompatibles permettait d'empêcher le développement de ces maladies auto-immunes (89–93). En parallèle, il était montré que les LTCD4⁺ étaient au contraire impliqués dans le développement de maladies auto-immunes, en aidant les lymphocytes B à produire des autoanticorps et en induisant les réponses immunes cellulaires. Enfin, Olivarez-villagomes et al. et Van de Keere et al. mettaient en évidence deux fonctions opposées des LT CD4⁺ dans des modèles transgéniques de souris produisant des CD4⁺ exprimant un TCR reconnaissant des antigènes du soi (94,95). Dans ces modèles, l'injection de CD4⁺ normaux prévenait l'apparition des désordres auto-immuns. Ces expériences ont donc mis en évidence différentes populations de LT CD4⁺ avec deux fonctionnalités distinctes : l'une favorisant le développement de maladies auto-immunes, l'autre les inhibant, et que la coexistence des deux permettait une homéostasie.

Sakaguchi et al. ont alors permis la caractérisation de cette population de CD4⁺ tolérogène, en séparant les CD4⁺ en fonction de leur expression de la chaîne α du récepteur de l'interleukine 2 (CD25). Dans ces expériences, le transfert de cellules LT CD4⁺CD25⁻ chez des souris athymiques (nude) entraînait le développement de maladies auto-immunes. En revanche, le cotransfert de cellules LT CD4⁺CD25⁺ empêchait ce développement (96).

Le gène Foxp3, membre de la famille des régulateurs transcriptionnels Forkhead/winged-helix, a ensuite été découvert comme un régulateur clé des Treg. En effet, il a été observé que l'inactivation de ce gène chez des souris entraînait des maladies auto-immunes fatales(97). Par ailleurs, la mutation de Foxp3 chez l'homme conduit à un syndrome rare de dérégulation immunitaire, le syndrome IPEX, à l'origine de troubles auto-immuns multiples (98). Enfin, l'équipe de Sakaguchi a montré que la transfection de Foxp3 dans des cellules CD4⁺CD25⁻

naïves pouvaient convertir ces cellules en CD4⁺CD25⁺, montrant le rôle clé de ce facteur de transcription dans la régulation des Tregs (96).

Ainsi, les Treg ont initialement été identifiées par l'expression de CD25 et FOXP3. Cependant, chez l'homme, FOXP3 est également exprimé dans d'autres populations de cellules T, hétérogènes dans leur fonction et phénotype, comprenant des cellules non suppressives et immunosuppressives (99). En particulier, des cellules T CD4⁺ naïves, lorsqu'elles sont activées, peuvent exprimer transitoirement FOXP3 sans pour autant être suppressives (100,101). Ainsi d'autres marqueurs phénotypiques ont été identifiés afin de caractériser plus précisément ces Treg. L'expression de CD127 a été montrée comme étant inversement corrélée aux fonctions suppressives des Treg, et à l'expression de Foxp3. Les cellules T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127^{low} permettent de discriminer ainsi les Treg chez l'homme.

4.2.1.1- *Ontogénie des Treg*

Il a été montré plus récemment que les Tregs étaient en fait constitués de 2 compartiments d'origine différente : les Tregs « naturels » ou thymiques (tTreg) et les Treg « induits ». Les fonctions de ces 2 compartiments semblent cependant redondantes, bien que les tTreg pourraient être importants dans la prévention de l'auto-immunité, et d'une manière générale, permet d'établir un seuil minimal d'activation pour l'ensemble des réponses immunitaires, alors que les Treg induits seraient plus spécialisées dans le maintien d'un environnement non inflammatoire dans la lumière intestinale, et contrôler les réponses aux allergènes alimentaires et environnementaux (102). Chez la souris, le facteur de transcription Helios a été proposé comme marqueur discriminant les Treg thymiques (Helios⁺) et les Treg induits (Helios⁻) (103). Chez l'homme certains marqueurs de surface lié à Helios tel que TIGIT ou FCRL3 mais la valeur discriminante reste plus controversée (104).

Développement des Treg thymiques dans le thymus

Plusieurs conditions sont nécessaires pour le développement des Treg dans le thymus des souris. Les cellules stromales thymiques, incluant des cellules endothéliales corticales et médullaires et des cellules dendritiques permettent la présentation du complexe CMH-peptide du soi. Lors de la maturation des LT CD4⁺ dans le thymus, une première étape de sélection positive permet aux thymocytes ayant un TCR reconnaissant le CMH de l'individu de survivre. Lors de la

deuxième étape, de sélection négative, les thymocytes CD4⁺ exprimant des TCR ayant une trop forte affinité pour les complexes CMH-peptide du soi sont normalement éliminés. Cependant, certains thymocytes, avec une affinité intermédiaire, vont échapper à cette sélection négative, permettant à cette étape le développement des tTreg. Les mécanismes permettant à ces tTreg d'échapper à la sélection négative, bien qu'incomplètement élucidés, ont été étudiés. Globalement, la sélection et maturation des Treg nécessitent :

- une interaction forte entre ces complexes et le TCR des Treg (105,106).
- un signal de costimulation (via les molécules CD40, CD28) (107)
- la présence de certaines cytokines, comme IL2, IL7 (108)

Un modèle en deux étapes a été proposé par Lio et al. (109), dans lequel une interaction forte entre le TCR et le complexe CMH/peptide entraînerait l'expression de CD25, et l'IL2 activerait des voies de signalisation, indépendantes du TGF- β , conduisant à l'expression de Foxp3.

Chez l'homme, il a de plus été mis en évidence des structures thymiques spécialisées, les corpuscules de Hassal, qui sécrète le thymic stromal lymphopoietin (TSLP), capable d'activer des DC immatures et de stimuler l'expression de molécules de costimulation (110,111). Les DC ainsi activés semblent pouvoir induire l'expression de FOXP3 dans des thymocytes CD4⁺CD8⁻CD25⁻. Ces DC pourraient permettre une sélection positive des thymocytes ayant une forte affinité pour les peptides du soi, en favorisant leur différenciation en Treg (112).

Induction de Treg en périphérie

La différenciation de CD4⁺ naïfs en Treg est également possible en périphérie, lors d'une stimulation antigénique et en présence d'une combinaison cytokinique appropriée. On parle alors de *peripherally induced Treg* (pTreg) Bien que les cellules pTreg ne constituent qu'un faible pourcentage de la totalité des Treg, certains organes sont particulièrement riches en pTreg, en particulier l'intestin et le placenta. Cela laisse penser que ces pTreg sont particulièrement importants dans l'établissement de la tolérance aux bactéries commensales, aux aliments, et à la tolérance materno-fœtale (113–117)(118).

Plusieurs conditions favorisant l'induction des pTreg ont été identifiées (119):

- Une activation sous-optimale des DC (119)
- Une dose sous-immunogénique de peptide agoniste (120)

- Une administration muqueuse du peptide (121)
- La présence de certaines cytokines, en particulier TGF- β et IL-2 (113,122,123)

En particulier, le TGF- β a été montré comme étant un facteur primordial du développement des Treg induits (113). En effet, le TGF- β est capable d'induire directement l'expression de Foxp3 dans des LT CD4⁺ naïfs. Par ailleurs, Marie et al. (124) ont montré que des souris déficientes en TGF- β avaient un développement normal des tTreg, mais une diminution des Treg induits. Plus récemment, la voie de signalisation du TGF- β pour l'induction de Foxp3 a été mise en évidence. Le TGF- β entraîne la phosphorylation et activation de Smad2 et Smad3, qui vont alors former un hétérodimère avec Smad4. La fixation de cet hétérodimère à une séquence intronique non codante (CNS1) de Foxp3 est un élément clé de la régulation de l'induction de ces pTreg. En effet, il a été montré que cette induction était absente chez des souris déficientes en Smad2 ou Smad3 ou en CNS1 (125–130).

D'autres facteurs participent à l'induction des pTreg, comme l'Acide rétinoïque (131,132). L'activité de l'acide rétinoïque passe par la même voie de signalisation et module la liaison du complexe Smad3 au CNS1, en entraînant une acétylation du site de fixation à Smad3 sur le CNS1, permettant d'augmenter la fixation de Smad3 phosphorylé (128).

4.2.1.2- Fonctions suppressives des Treg

On distingue différents rôles des Treg :

- Maintien de **la tolérance périphérique** :

Contrôle des LT autoréactifs échappant à la sélection négative thymique

- Maintien de **l'homéostasie lymphocytaire périphérique** :

Contrôle du niveau de la réponse

Limitation de la prolifération et de l'activité des effecteurs

Clôture de la réponse immune

Les mécanismes suppressifs des Tregs sont très diverses et peuvent cibler plusieurs populations effectrices, en fonction de leur localisation, leur contexte d'activation, et les signaux spécifiques. Les différents mécanismes sont :

1 La sécrétion de cytokines suppressives

Les Treg peuvent produire plusieurs cytokines immunosuppressives en particulier TGF- β , IL-10, et IL-35. Ces cytokines participant à l'inhibition de la différenciation, la prolifération et l'activation des cellules T effectrices. De plus, elles favorisent la conversion de cellules T activées en cellules immunosuppressives. TGF- β et IL-35 favorisent la conversion cellules T CD4⁺ conventionnelles en Treg induit de phénotype CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (chez la souris) (133,134). L'IL-10 convertit les Tconv en cellules suppressives Tr1, produisant également du TGF- β et de l'IL-10 (135).

2 L'expression élevée de co-récepteurs inhibiteurs (CTLA-4, PD-1, Lag3), entrainant une compétition avec les cellules effectrices T et les CPA

Les deux molécules co-inhibitrices les plus impliqués dans l'immunorégulation liée aux Treg sont CTLA-4 et Lag-3. En effet les Treg expriment constitutivement CTLA-4, inhibiteur de CD80 ou CD86, en compétition avec CD28, mais présentant une plus grande affinité que ce dernier (136). Il bloque ainsi le signal de co-stimulation nécessaire à l'activation des lymphocytes effecteurs d'une part, et entraîne également des mécanismes de régulation négative de la présentation de l'antigène par la CPA (136–138).

3 La lyse des effecteurs par les granzymes A/B

De même que les cellules NK ou les LT cytotoxiques, le Treg peuvent sécréter du granzyme A et B, qui participe à ses propriétés immunosuppressives, en ayant une activité cytolytique ciblée sur ces cellules effectrices suite à leur interaction (139,140).

4 L'épuisement métabolique

Plusieurs mécanismes d'épuisement métabolique ont été décrits. La déplétion en IL-2, facteur essentiel à l'activation et la prolifération des LT effecteurs, est un mécanisme connu depuis de nombreuses années. Elle passe d'une part par la consommation d'IL-2 par son récepteur de haute affinité, CD25 (141,142) et d'autre part par l'inhibition de la transcription d'IL-2 par les cellules T effectrices (103,143). Par ailleurs, les Treg peuvent exprimer les molécules CD39 et CD73, induisant une dégradation de l'ATP et l'ADP en AMP d'une part et une production d'adénosine d'autre part. Ces modifications métaboliques entraînent une inhibition de la maturation des DC et leur confèrent un profil tolérogène, et inhibent la prolifération et l'activité des LT effecteurs et des NK (144).

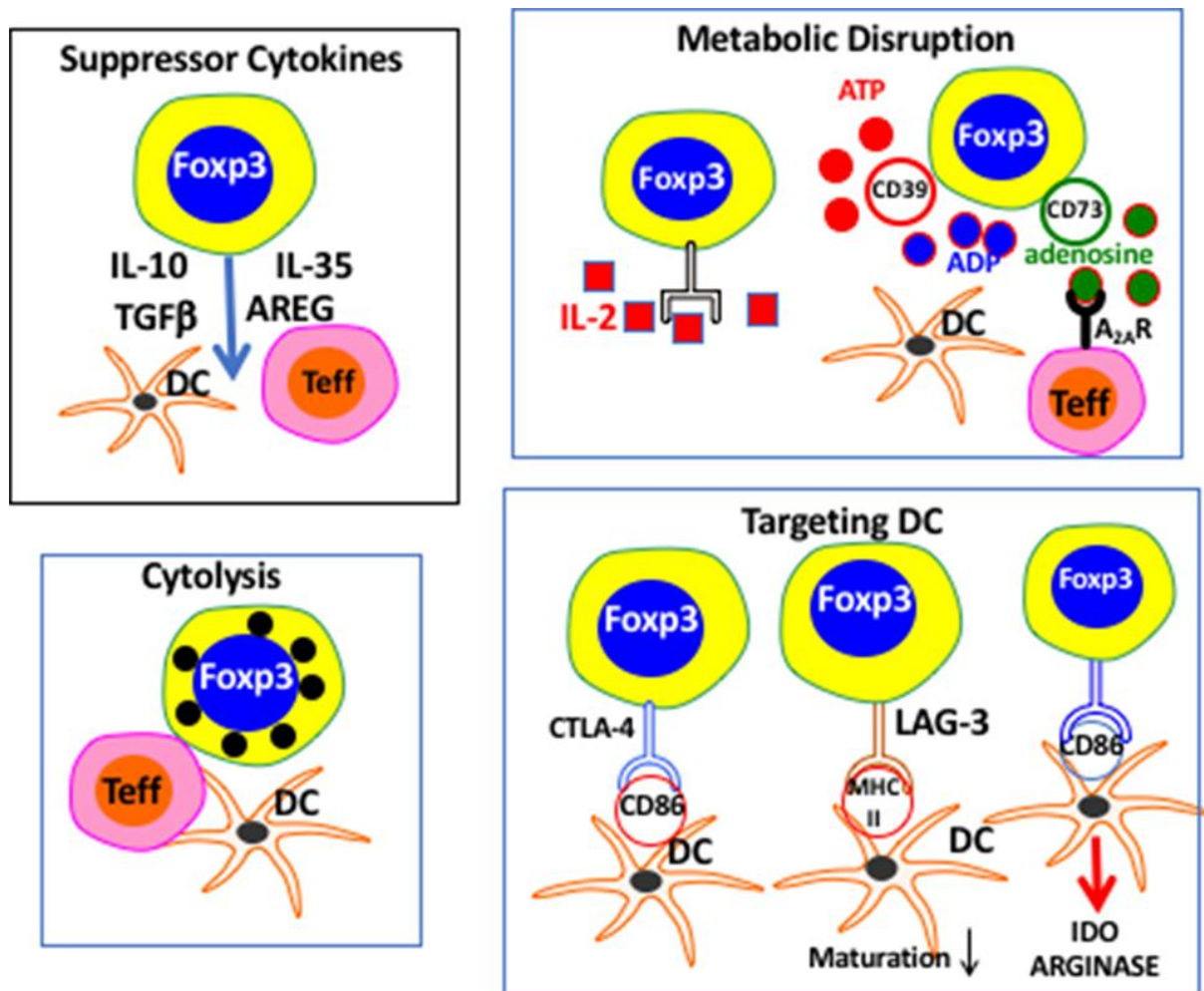


Figure 2 : Fonctions suppressives des Treg

D'après Shevach EM Front. Immunol. 2018 (145)

4.2.1.3-Les sous populations de Treg

Les Treg sont très hétérogènes sur un plan fonctionnel et phénotypique. Il existe en effet plusieurs catégories de Treg, et plusieurs façons de les classer. Récemment, la cytométrie de masse a permis de détecter 22 sous populations distinctes de Treg (146).

Tout d'abord, l'expression de CD45RA ou CD45RO permet de distinguer deux classes : les Treg effecteurs et les Treg naïfs. Ces deux marqueurs ont une expression mutuellement exclusive dans les Treg (147–150).

Les Treg Naïfs

Les Treg naïfs sont caractérisés par l'expression de CD45RA (CD45RA⁺) ou l'absence d'expression de CD45RO (CD45RO⁻), ainsi qu'un plus faible niveau d'expression de FOXP3 (FOXP3^{low}). Ce compartiment de Treg naïfs représente en réalité plutôt un compartiment de cellules quiescentes périphériques que strictement naïf. En effet, il est montré chez la souris que le maintien des Treg en périphérie nécessite une stimulation continue par l'antigène (151). Ces Treg proviennent du compartiment thymique. En revanche, ces Treg ne prolifèrent pas comme le montre l'absence d'expression de Ki67 (147). Sur le plan fonctionnel, ces cellules montrent une activité suppressive, et ont la capacité de proliférer après activation du TCR *in vitro*. Lors de cette activation, elles démontrent une capacité de résistance à l'apoptose (150). Il est admis que la large majorité des cellules Treg naïves sont des cellules Treg thymiques, car elles portent le marqueur CD31 qui signe leur migration depuis le thymus (147,150).

Les Treg effecteurs

Les Treg effecteurs sont eux caractérisés par l'expression de CD45RO et un plus haut niveau d'expression de FOXP3 (CD45RO⁺FOXP3⁺). Contrairement aux Treg naïfs, il s'agit de Treg montrant un haut degré de prolifération (147,152) et sont probablement des Treg activés et fonctionnellement différenciés à partir des Treg naïfs. Ils nécessitent néanmoins une stimulation du TCR pour exercer leur activité suppressive (153,154). Ils sont également moins résistants à l'apoptose lors de leur stimulation du TCR (155). Parmi ces Treg effecteurs, il existe un niveau supplémentaire d'activation. En effet l'expression d'HLA-DR confère une prolifération et des fonctions suppressives augmentées et plus rapide chez ces Treg (156), et pourrait correspondre à un état de différenciation terminale de ces Treg (figure 3)

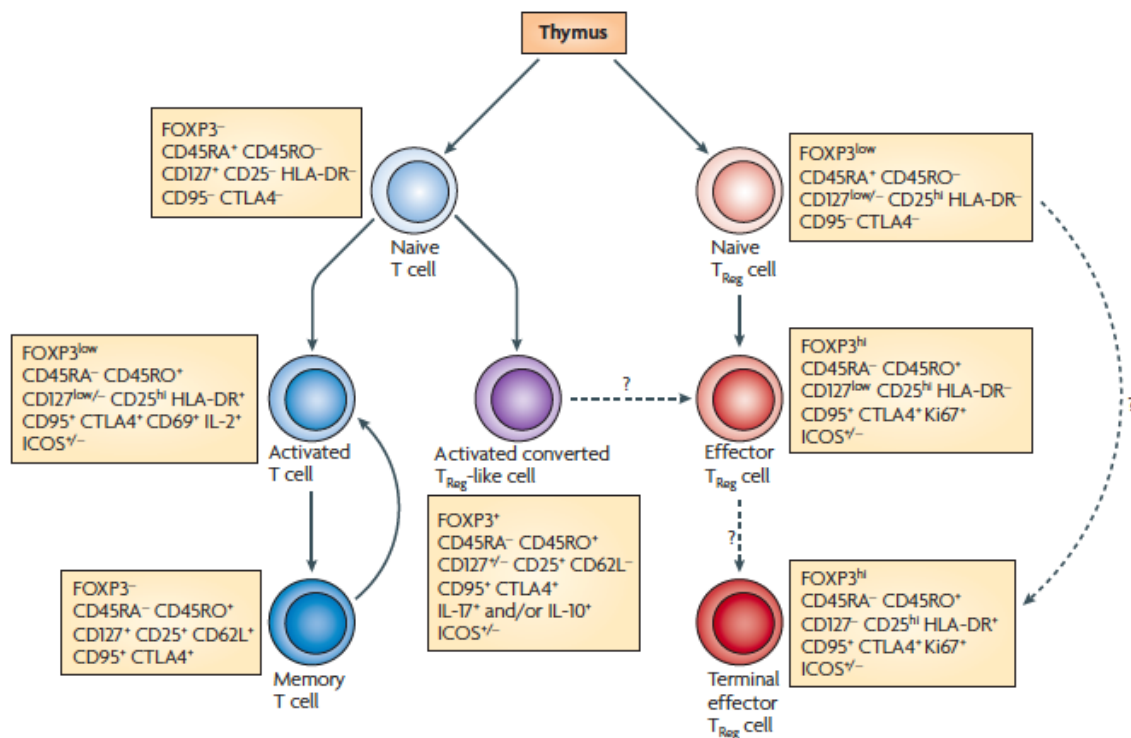


Figure 2 | T_{Reg} cell differentiation. Phenotypic markers are indicated during CD4⁺ T cell differentiation into the conventional T cell and regulatory T (T_{Reg}) cell lineages. All T cell lineages originate in the thymus and emigrate as naive CD45RA⁺ T cells. Activation of naive T cells in the periphery induces their differentiation into both conventional and regulatory subsets. Conventional T cells can further differentiate into memory T cells, which can then be reactivated. Although conventional memory formation has not been described, T_{Reg} cells have been shown to differentiate into terminal effector T_{Reg} cells with unique cell surface marker expression. Also contributing to the CD45RA⁻ peripheral T_{Reg} cell compartment are converted T_{Reg}-like cells, which are derived from conventional T cells. These converted T_{Reg}-like cells have cell surface marker expression similar to that expressed by natural T_{Reg} cells. CTLA4, cytotoxic T lymphocyte antigen 4; FOXP3, forkhead box P3; ICOS, inducible T cell co-stimulator; IL, interleukin.

Figure 3. Différentiation des Treg

Sakaguchi et al Nature review Immunology 2010

Parmi les Treg effecteurs, plusieurs sous-populations fonctionnelles ont été décrites. Tout d'abord, l'expression d'ICOS semble discriminer deux sous populations ICOS⁻ et ICOS⁺ aux fonctions différentes, produisant respectivement du TGFβ ou de l'IL10 (157).

La polarisation des Treg

Enfin, plus récemment, ont été décrites plusieurs sous-populations fonctionnellement distinctes basées sur l'expression de récepteurs de chimiokines, et impliquant différentes voies de signalisation.

Il a d'abord été montré dans des modèles murins que les Treg utilisaient différents programmes de transcription pour réguler les réponses Th1, Th2 ou Th17, liés à l'expression ou à l'activation de facteurs de transcription spécifiques associés au Th (158–161). Ces différentes populations ont ensuite été observées chez l'homme en condition non pathologique (162).

Les Treg Th-1 like

Cette sous-population est contrôlée par le facteur de transcription T-bet. Elle a été mise en évidence dans des modèles murins (159,160,163) et également décrite chez l'humain en conditions non pathologiques (160,162). Lors d'une réponse Th-1, les cytokines IFN γ et IL27 entraînent l'expression de T-bet par les Treg (164). T-bet induit l'expression de CXCR3 qui permet leur migration vers le site de l'inflammation. Cette expression spécifique de CXCR3 est utilisée pour les caractériser chez la souris comme chez l'homme. Le rôle de T-bet est central dans cette différenciation. En effet, dans un modèle murin, les Treg déficients en T-bet ne contrôlent pas la réponse Th-1 (159,163). La fonction de ces Treg Th-like implique un programme transcriptionnel induisant en particulier l'expression de molécules co-inhibitrices, Lag-3 en particulier, et du Granzyme B (160). Il est également décrit une expression importante de CTLA-4 et Helios (165).

Les Treg Th2-like

Les Treg Th2-like sont contrôlés par les facteurs de transcriptions GATA-3 et IRF4 (161). Chez l'homme ils sont caractérisés ainsi : CCR6⁻CXCR3⁻CXCR4⁺. Les Treg TH2-like expriment moins le CD25 et FoxP3 comparé aux autres sous-populations, mais ont une expression augmentée de TIGIT. Il semble que, dans le cancer, les Treg Th2-like possèdent une capacité migratoire importante, permettant leur accumulation préférentielle, grâce à l'expression de CCR8, ligand de CCL17/22 volontiers retrouvés dans les tumeurs. Cependant, alors qu'une action préférentielle pour la sous-population effectrice a été supposée pour les Th1-like et les Th17-like, il semble in vitro que ce ne soit pas le cas des Th2-like. Au contraire, les Th2-like diminuent moins la prolifération des Th2 effecteurs que les autres populations Treg (166), alors qu'ils possèdent des capacités suppressives identiques aux autres populations pour les effecteurs Th1 et Th17. Cette accumulation préférentielle dans les tissus tumoraux, et leur activité suppressives favorisant les effecteurs Th2 au détriment des Th1, semble être exacerbée dans les tumeurs afin de maintenir un environnement anti-inflammatoire favorisant la croissance tumorale.

Les Treg Th-17-like et Th-22 like

Le contrôle de la réponse Th-17 par les Treg est contrôlé par STAT-3, entraînant l'expression de CCR6 qui permet chez la souris la caractérisation de cette population (158). Chez l'homme, dans cette population CCR6+, il est parfois individualisé une population Th-22-like, caractérisé par l'expression de CCR10 (162), alors que d'autres études identifient une population mixte Th1/Th17-like, exprimant à la fois CXCR3 et CCR6 (166). Les Th17 semblent avoir des fonctions suppressives importantes, en particulier sur la réponse Th17. En effet, la délétion de STAT-3 spécifiquement au niveau des Treg entraînait dans un modèle murin, le développement d'une colite, avec une réponse cytokinique Th17 augmentée caractérisée par la production d'IL-17 et IL-22, alors que les réponses Th1 et Th2 étaient inchangées (158). Une autre étude chez l'homme a montré que les Th17-like exprimant IL-17 peuvent perdre transitoirement leur fonction suppressive et avoir une fonction pro-inflammatoire mais regagnent leurs fonctions suppressives ensuite, permettant une certaine plasticité fonctionnelle en fonction des stimuli (167).

Spécificités fonctionnelles des différentes sous-population

Les différentes sous-populations de Treg caractérisées par l'expression de récepteurs de chimiokines ont des fonctions sensiblement différentes, et expriment des cytokines différentes. Le contrôle des réponses Th spécifiques par la sous-population Treg correspondante Th-like a été montré chez la souris pour les Th17-like et les Th1-like (158,159,163). Cependant, les Th2-like semble avoir un effet plus large, permettant un contrôle des différents sous-types effecteurs et non restreint aux Th2 (161,168,169), voir même parfois décrit comme favorisant la réponse Th2 in vitro et in vivo, en particulier dans les tissus tumoraux (166). En fait, en sus d'une spécificité fonctionnelle intrinsèque, l'observation d'une fonction préférentielle de ces différentes sous-populations sur leur équivalent effecteur est probablement liée d'une en partie à deux phénomènes : d'une part à la capacité migratoire spécifique de chacune via l'expression des mêmes récepteurs de chimiokines (170); d'autre part à leur prolifération spécifique en parallèle de celle de la population Th correspondante, en réponse à une stimulation antigénique particulière (Th-17 et Th-17-like pour C. Albicans, Th-1 et Th-1-like pour HCMV) (162). Ces phénomènes permettent leur colocalisation spatiale et temporelle, aboutissant à des régulations spécifiques au détriment de leur équivalent effecteur ou parfois en faveur de ceux-ci pour les Th2 (166).

Plasticité des différentes sous-population

Enfin, si le phénotype de ces Treg apparaît stable en condition neutre (162), une certaine plasticité fonctionnelle et phénotypique existe en condition cytokinique polarisante (170). En effet, une régulation transitoire et alternative de -Tbet et Gata-3, en particulier, a été décrite, et apparaît essentielle dans le maintien dynamique de l'homéostasie (171).

4.2.1.4- Treg et cancer

Les Treg semblent jouer un rôle majeur dans le développement et la progression tumorale. Dans la grande majorité des cancers chez l'homme, ainsi que dans les modèles murins de tumeurs, la fréquence des Treg dans le sang périphérique est augmentée, ainsi que leurs fonctions immunosuppressives, comparé aux individus sains (172,173). On retrouve également une forte infiltration en Treg en intratumoral dans une grande majorité de cancers (174–180) comme présenté en figure 4.

Table I. Increased prevalence of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with various cancers

Cancer type	Tissues where Treg cells were detected
Gastric cancer	TDLN, TIL and PBMC
Gastrointestinal cancer	PBMC, tumor site and ascites
Head and neck cancer	PMMC
Hepatocellular cancer	PBMC and TIL, tumor tissue, and ascites
Melanoma	PBMC, TIL and TDLN
Pancreatic cancer	PBMC
Prostate cancer	PBMC, tumor site
Renal cell cancer	PBMC, Tumor site
Ovarian cancer	TIL, tumor site, tumor associated lymphocytes
Cervical cancer	TDLN
Endometrial cancer	TDLN
Glioma	Tumor tissue
Esophageal cancer	PBMC, TIL
Epithelial cancer	PBMC
Lung cancer	TIL, PBMC, tumor site, pleural effusion
Breast cancer	PBMC, TIL, tumor tissue
Wilms' tumor	PBMC
Multiple myeloma	PBMC
Adult T cell leukemia/lymphoma	Tumor itself has a Treg cell phenotype
Chronic lymphocytic leukemia	PBMC
Acute myeloid leukemia	PBMC
Non-Hodgkin lymphoma	TIL
Hodgkin's lymphoma	TIL

TDLN, tumor-draining lymph nodes; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; TIL, tumor-infiltrating lymphocytes.

Figure 4. Prévalence augmentée des Treg dans plusieurs types de cancer

Origine des Treg intratumoraux

Le recrutement de Treg par la tumeur implique plusieurs mécanismes (figure 5).

1 La conversion de CD4 conventionnels en pTreg (181).

Le microenvironnement tumoral semble jouer un rôle majeur dans cette conversion (182), en particulier par la sécrétion de TGF β et d'IL-10 via différents sous-populations régulatrices comme les cellules dendritiques myéloïdes immatures (183) ou les MDSC (184).

2 Le recrutement et rétention de Treg dans la tumeur.

Il est favorisé par l'expression par les cellules tumorales ou du microenvironnement tumoral de chimiokines, en particulier CCL22 ou CCL17 (185–187) ligands du récepteur CCR4, ou CCL28 (188), ligands des récepteurs CCR3 et CCR10, qui peuvent être eux exprimés par les Treg périphériques permettant leur recrutement.

3 L'expansion d'un compartiment de Treg résidents dans les tissus.

En effet certains Treg se spécialisent en fonction de leur localisation spécifique et en fonction de l'organe et du tissu. On parle de Treg résidents (189). L'importance de ces Treg résidents dans le cancer est mal connue chez l'homme.

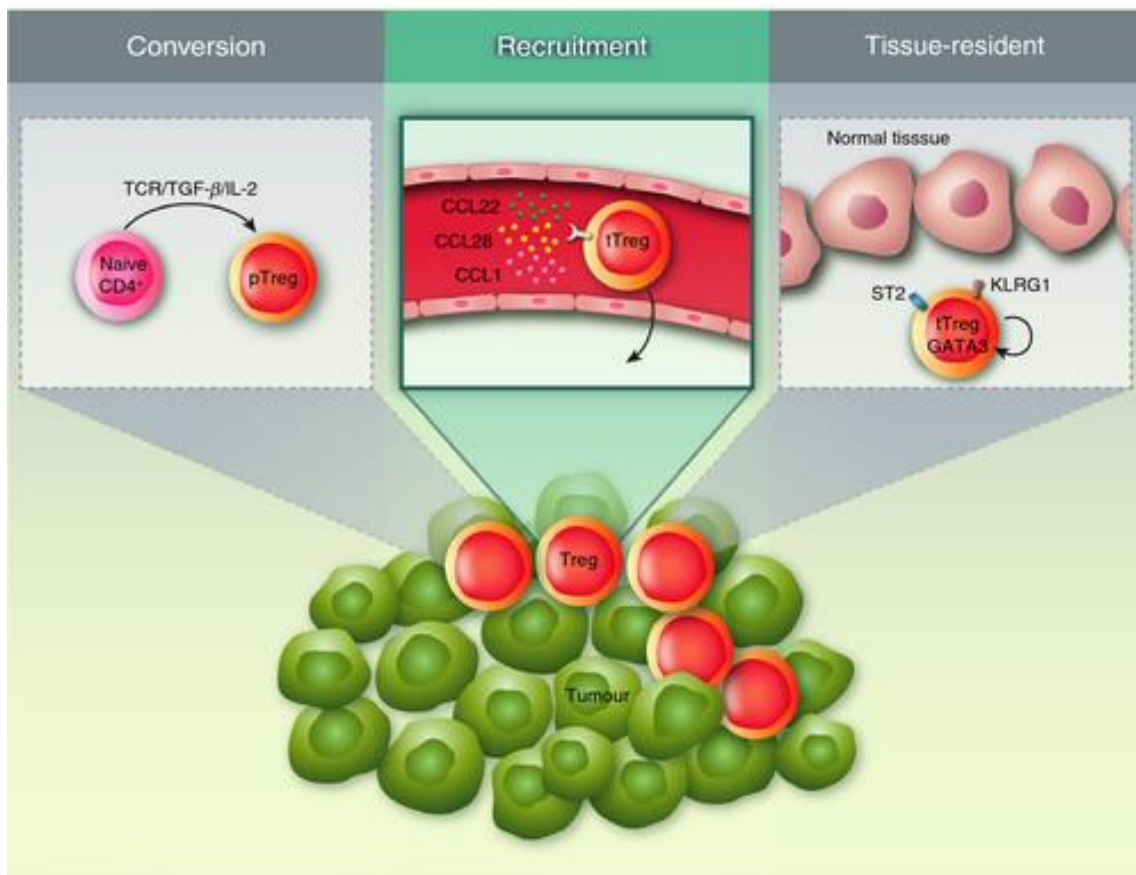


Figure 5 : Origine des Treg intratumoraux

D'après Stockis Immunology 2019

Régulation des Treg dans le cancer

La prolifération et les fonctions des Treg sont modulées d'une part par des récepteurs co-stimulateurs et inhibiteurs impliquant des interactions avec les cellules tumorales et du microenvironnement, et d'autres part par des cytokines du microenvironnement tumoral (figure 6).

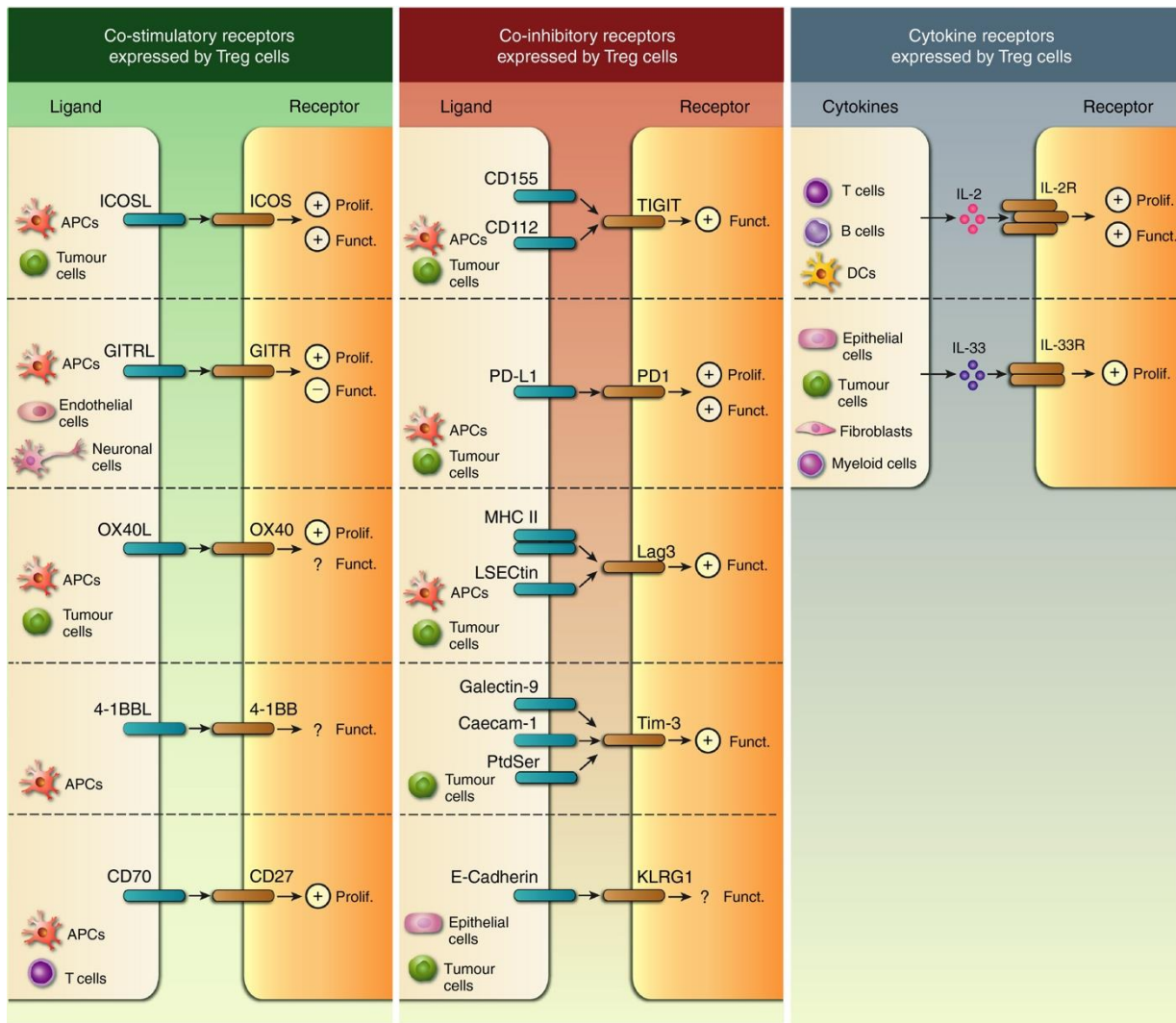


Figure 6 : régulation des Treg dans les cancers

D'après Stockis Immunology 2019

1 Récepteurs costimulateurs

Plusieurs récepteurs costimulateurs ont été décrits à la surface des Tregs, comme ICOS, GITR, OX40, 4-1BB ou CD27. Les ligands de ces récepteurs peuvent parfois être exprimés par les cellules tumorales, comme ICOSL ou OX40L, ou parfois être induit par un environnement cytokinique sur les CPA, comme GITRL, induit par le TGF β (180,190,191). L'interaction de ces ligands avec leur récepteur favorise la prolifération des Treg, et parfois leur fonction (157,180,192–195).

2 Récepteurs co-inhibiteurs

Différents récepteurs co-inhibiteurs peuvent réguler positivement la fonction et la prolifération des Treg dans le cancer. Les plus connus sont les récepteurs PD1, Lag3 et Tim-3, dont les ligands peuvent être exprimés par les cellules tumorales ou induits sur les CPA (180). TIGIT semble également jouer un rôle important dans l'échappement immunitaire, en particulier en régulant préférentiellement les effecteurs Th1 et Th17 mais pas les Th2, plutôt pro-tumoraux. En effet, TIGIT est préférentiellement exprimé par les Treg Th2-like, qui migrent en parallèle des effecteurs Th2 dans les tissus tumoraux et permettent l'expansion préférentielle des Th2 au détriment des Th1 et Th17 (166). Enfin, l'activation du récepteur inhibiteur killer cell lectin-like receptor G1 (Klrg1) serait plutôt un régulateur négatif de la fonction suppressive des Treg. La perte d'expression de son ligand E-Cadhérine est retrouvée dans certains cancers et pourrait favoriser la régulation positive des Treg (196,197).

3 Cytokines

Le microenvironnement tumoral induit la sécrétion directe ou indirecte de certaines molécules qui vont favoriser la prolifération des Treg. En particulier, l'IL2 et le TGF β .

En dehors de ces éléments de régulation majeurs, d'autres molécules du microenvironnement tumoral semblent jouer un rôle important dans la régulation des Treg, comme l'IL-33, ou encore le VEGF, comme abordé dans le chapitre « angiogenèse et immunité ».

Rôle pronostic des Treg dans le cancer

Les Treg intratumoraux et circulants sont généralement associés à un moins bon pronostic comme cela a été décrit dans un grand nombre de cancers, comme les cancers du sein, les cancers du poumon, les hépatocarcinomes, les cancers de l'ovaire, les cancers du rein, les cancers pancréatiques, les cancers gastriques et les cancers de l'ovaire (178,179). Dans les cancers colorectaux, cependant, le rôle pronostique des Treg est controversé, certaines études retrouvant un effet défavorable, d'autres un effet favorable (198,199).

4.2.2- Myeloid-derived suppressor cells (MDSC)

Les MDSC constituent une population hétérogène de cellules immatures myéloïdes ayant stoppé leur différenciation à différents stades, qui peuvent exercer une activité immunosuppressive dans le microenvironnement tumoral (200).

4.2.2.1- Induction des MDSC

Les cellules myéloïdes sont activées lors d'une réponse immunitaire innée par différents pathogènes, via les TLR, et les PRR reconnaissant les PAMP et les DAMP, résultant en une mobilisation de neutrophiles et de monocytes, une régulation positive du CMH II et la production de cytokines pro-inflammatoires. Lors d'une activation classique par un pathogène, la réponse est rapide et de courte durée, en réponse à un signal fort et aigu. Lors d'une inflammation chronique et non résolue, comme le cancer, les cellules myéloïdes sont activées par des signaux faibles et de longue durée, aboutissant à la différenciation en MDSC. Une activation en 2 étapes a été décrites : l'expansion de cellules myéloïdes immatures, et leur activation pathologique. L'expansion de ces cellules est induite par différents signaux présents liés à l'inflammation chronique et parfois produits par les tumeurs, comme le GM-CSF, G-CSF, M-CSF, S-CSF, VEGF et les acides gras poly-insaturés (PUFA). Ces signaux induisent certains facteurs de transcription comme STAT3, STAT5, IRF8, C/EBP β et NOTCH. L'activation pathologique des MDSC est induite par les facteurs de transcription NF- κ B, STAT1 et STAT6. Elle est favorisée par des cytokines inflammatoires comme IFN γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-13 et TNF, et par l'activation de TLR par le ligand HMGB1 (201,202).

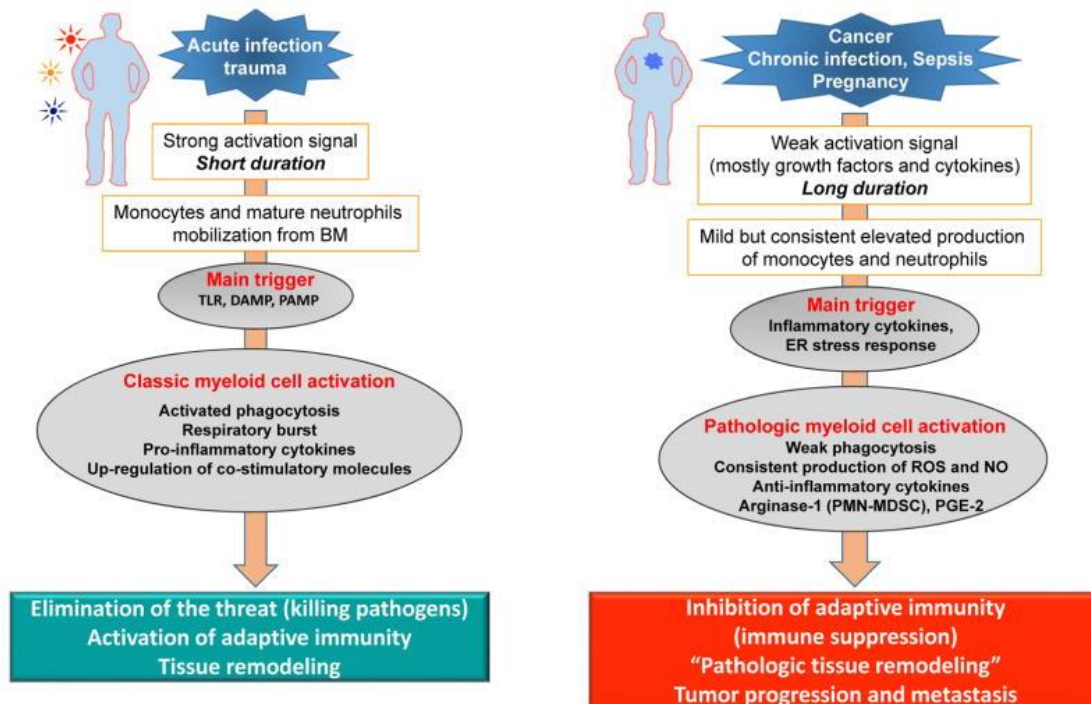


Figure 7 : Induction et fonctions des MDSC

4.2.2.2-Caractérisation phénotypique des MDSC

On distingue deux grandes catégories de MDSC : les MDSC granulocytiques ou les MDSC monocytiques. Les MDSC granulocytiques (G-MDSC) sont définies chez la souris par le phénotype $CD11b^+Ly6G^+LyC^{Low}$ et leur structure (side scatter SSC) élevée en cytométrie, et sont difficile à distinguer des neutrophiles infiltrant la tumeur. Chez l'humain, les G-MDSC sont caractérisés par $CD11b^+CD14^-CD15^-$. Ils se différencient des neutrophiles chez l'humain par leur différence de densité.

Les MDSC monocytiques (M-MDSC) chez la souris sont définis par le phénotype $CD11b^+Ly6G^-LyC^{high}$, et une SSC basse. Ils sont différenciés des monocytes par l'absence des marqueurs CD11c et HLA de classe II. Chez l'humain ils sont caractérisés par le phénotype $CD11b^+CD14^+CD15^-CD33^+HLA-DR^{-/low}$, tandis que les monocytes sont $HLA-DR^+$ (201).

4.2.2.3-Fonctions immunosuppressives des MDSC

Les MDSC sont des cellules immunosuppressives, contrairement aux monocytes et neutrophiles. Les mécanismes immunosuppressifs des MDSC sont médiés par la production de $TGF\beta$, de cyclooxygénase (COX2), d'arginase (ARG1), d'oxyde nitrique synthase (iNOS), de prostaglandine 2 (PGE2) et de dérivés réactifs de l'oxygène (Reactive oxygen species ROS) (203,204). Ils peuvent également augmenter la glycolyse et induire une phosphorylation oxydative (Hammami and Jolicoeur BMC cell biology 2012). Enfin, les MDSC peuvent produire des cytokines suppressives comme l'IL-10 et le $TGF\beta$. Ces mécanismes contribuent à stopper le cycle cellulaire des cellules T, altérer leur TCR, et limiter leur migration dans les tumeurs (205–207). Ils diminuent également la formation de complexe peptide/CMH par la tumeur (208), et favorisent le recrutement de Treg (209). Les M-MDSC sont théoriquement plus immunosuppresseurs que les G-MDSC (210,211). Les G-MDSC entraînent une immunosuppression des cellules T spécifiques des antigènes dans les organes lymphoïdes alors que les M-MDSC inhibent les réponses T spécifiques et non spécifiques. Dans la tumeur, les G-MDSC inhibent la réponse T spécifique et meurent rapidement. Sous l'effet de l'hypoxie et de la répression de STAT3 dans le microenvironnement tumoral, les M-MDSC sont rapidement différenciés en TAM (212,213).

4.2.2.4-Rôle des MDSC dans le cancer

Si le rôle des MDSC a été bien établi dans des modèles murins de cancer, l'observation de leur impact clinique est plus récente. Il a été observé que le nombre de MDSC circulants chez des patients atteints de cancer était positivement corrélé au stade et à la présence de métastases dans les cancers du sein, colorectaux, de la thyroïde, des poumons (non à petites cellules), de la vessie, les mélanomes et les carcinomes hépatocellulaires (214–221). Le taux de MDSC circulants est également associé à une moins bonne survie dans différents types de tumeurs solides (222), en particulier dans les cancers colorectaux (223,224). Les deux sous-populations G-MDSC et M-MDSC, lorsqu'elles sont différenciées, semblent toutes deux associées à ce mauvais pronostic(220,225). Le rôle des MDSC intratumoraux, du fait de la difficulté de leur caractérisation, n'a cependant pas été établi.

Le taux de MDSC a également été associé à une moins bonne réponse thérapeutique à l'immunothérapie chez des patients traités par anticorps anti-CTLA-4 ou anti-PD1 pour un mélanome (226–229). Des stratégies de potentialisation des immunothérapies par l'inhibition des MDSC sont donc en cours d'étude et ont montré une certaine efficacité dans des modèles murins (230–232).

4.2.3- Autres cellules régulatrices.

D'autres types de cellules immunorégulatrices ont été décrites comme jouant un rôle dans l'échappement immunitaire à la réponse anti-tumorale à des degrés variables. Les Th17, les DC et les TAM M2 peuvent avoir un rôle immunosuppresseur comme décrit dans les chapitres précédents. Les Tr1 et les LB régulateurs (Breg) sont deux populations régulatrices dont le rôle est encore peu exploré dans le cancer. Les Breg pourrait favoriser la progression tumorale en inhibant les CTL et les CD4⁺ par l'expression de cytokines suppressives et par l'expression de PD-L1 (233,234).

4.2.4- Régulation positive des molécules co-inhibitrices et épuisement des LT

L'expression de molécules co-inhibitrices de la réponse immunitaire est un mécanisme d'échappement immunitaire majeur, et particulièrement exploré ces dernières années du fait du succès thérapeutique d'anticorps monoclonaux ciblant ces molécules. Ils inhibent les LT, en se liant aux récepteurs de co-stimulation B7-1 et B7-2.

Plusieurs molécules ont été décrites, comme CTLA-4, PD1, Lag-3, Tim-3. Ces molécules peuvent être exprimés par plusieurs cellules immunitaires et par les cellules tumorales.

Les récepteurs co-inhibiteurs

Le CTLA-4 fait partie de la même famille des immunoglobulines que le récepteur de co-stimulation CD28, nécessaire à l'activation des cellules T, et reconnaît les mêmes ligands B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86). Le CTLA-4 a cependant une affinité plus forte pour ses ligands (235). Le CTLA-4, à l'inverse du CD28 exprimé constitutivement par les cellules T, n'est exprimé qu'à la surface des cellules T activées et des Treg. Il inhibe les LT par plusieurs mécanismes : la compétition avec CD28 (236); l'induction de signaux négatifs pour la fonction des LT (237) ; la stimulation des Treg (136) ; la régulation de la fonction et du phénotype des CPA (238). Le PD1 est un autre récepteur co-inhibiteur dont le fonctionnement est proche, et qui lie les ligands PD-L1 et PD-L2, de la famille B7. Outre les LT, PD1 peut être exprimé par les LB, les NK, les NKT, les monocytes activés, et les DC (84). CTLA-4 et PD1 sont les deux molécules co-inhibitrices les plus étudiées du fait de leur implication thérapeutique récente, mais d'autres molécules ont récemment été décrites tel que LAG3, Tim3 et TIGIT (84).

Expression des ligands des récepteurs co-inhibiteurs

La cellule tumorale peut exprimer les ligands de ces récepteurs co-inhibiteurs, entraînant la régulation positive de l'expression de ces récepteurs. Parmi ces ligands, l'expression de PD-L1 et PD-L2 est retrouvée dans de nombreux types de tumeurs, et peut être induit sur la tumeur soit par des voies de signalisation oncogéniques intrinsèques, soit par la pression immunitaire (239–242). En effet, l'IFN γ induit l'expression de PD-L1 sur la cellule tumorale. D'autres ligands peuvent être surexprimés, comme CD80/CD86 ou la Galectine 9.

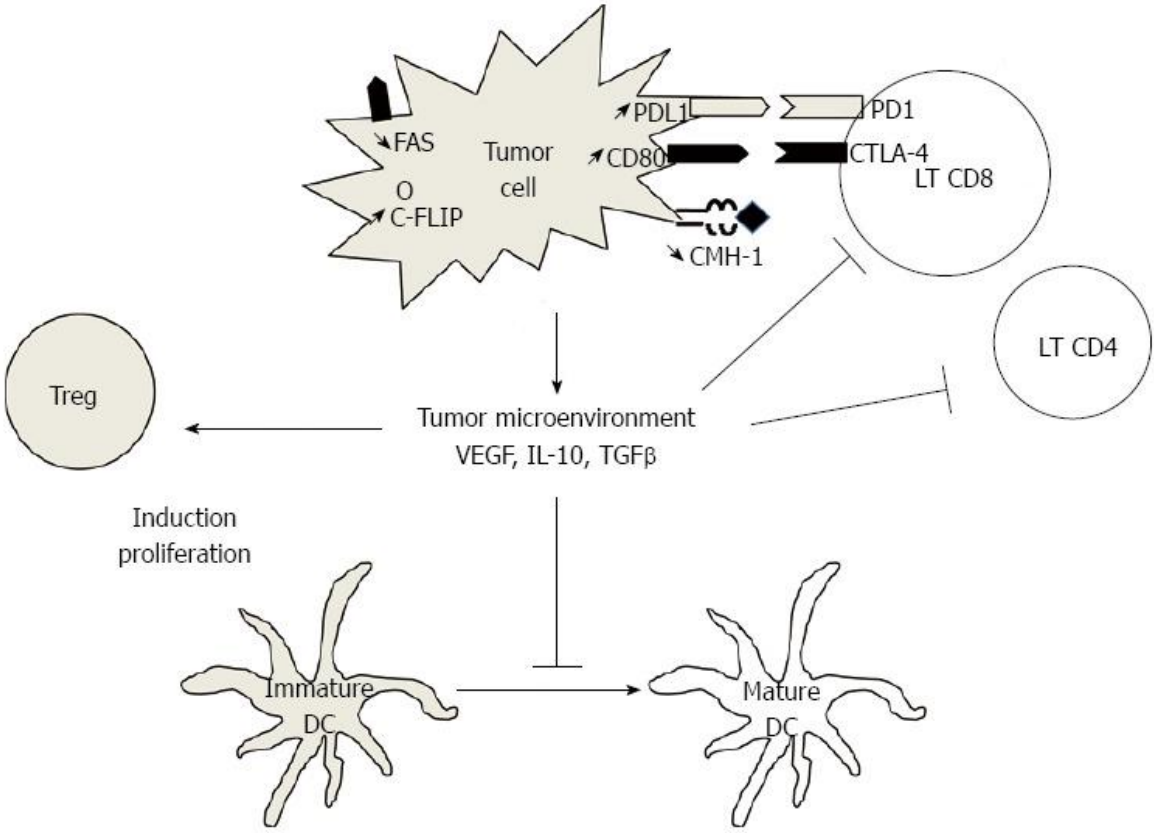
L'épuisement des cellules T

Les cellules T épuisées sont des cellules ayant perdu leur fonction effectrice et ayant une forte expression des récepteurs co-inhibiteurs. Elle est à distinguer de l'anergie des cellules T, qui survient à l'étape d'activation de ces dernières, en cas d'engagement du TCR sans signal de co-

stimulation. Dans le cas de l'épuisement, il s'agit plutôt d'un épuisement orchestré de LT fonctionnels lors d'une stimulation antigénique chronique. PD1 est un régulateur clé de l'épuisement. Les mécanismes impliqués dans l'exhaustion des LTT font intervenir des signaux extrinsèques ou intrinsèques (243):

- les interactions cellules/cellules : l'engagement prolongé du TCR (signal 1) et les récepteurs de co-stimulation et / ou co-inhibition signaux (signal 2) ;
- des facteurs solubles : des cytokines inflammatoires (IFN de type I) et suppressives (IL-10 ; TGFβ) ;
- modification de l'expression des récepteurs des chimiokines, des molécules d'adhésion et des récepteurs des nutriments.

Plusieurs cellules immunitaires peuvent être à l'origine de ces signaux et participent à la régulation de l'exhaustion : les Treg, les MDSC, les CPA, les LB et les NK.



(1)

Figure 8: Principaux mécanismes d'échappement immunitaires

5- Les bases de l'immunothérapie anticancéreuse

Depuis plusieurs années, l'immunothérapie s'est imposée comme un acteur incontournable des stratégies thérapeutiques pour les cancers métastatiques. Le principe de l'immunothérapie antitumorale est de stimuler les cellules effectrices immunitaires innées et adaptatives antitumorales, tout en neutralisant les mécanismes immunosuppresseurs. On distingue l'immunothérapie passive, consistant en l'administration d'effecteurs (anticorps monoclonaux, TIL), et l'immunothérapie active, consistant en une stimulation *in vivo* des réponses immunitaires du patient, soit spécifique de la cellule cancéreuse (vaccination) soit non spécifique.

5.1 -Immunothérapie passive

5.1.1 Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux font partie de l'arsenal thérapeutique de routine dans la majorité des cancers, essentiellement aux stades métastatiques. Ils ont une action directe sur leur cible, généralement un antigène associé à la tumeur exprimé à la surface des cellules tumorales ou parfois une molécule du microenvironnement tumoral. Ils bloquent ainsi un signal d'activation, ou parfois au contraire induisent un signal d'apoptose. Ces anticorps peuvent également avoir une action indirecte. En effet, la majorité des anticorps monoclonaux sont des IgG, et leur fragment constant Fc peut conduire à des mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendante des Anticorps (ADCC : antibody dependent cell mediated cytotoxicity) ou à une cytotoxicité dépendante du complément (CDC : complement-dependent cytotoxicity)

De nombreux anticorps monoclonaux aux cibles variées sont utilisés en cancérologie. Le plus ancien est un anti-CD20 (rituximab), utilisé dans le lymphome non-Hodgkinien et la leucémie lymphoïde chronique (LLC). D'autres anticorps utilisés en hématologie ciblent le CD33, CD52, CD30 ou CD38. Dans les tumeurs solides, les anticorps ciblent en général des TAA exprimés par la tumeur, comme HER2/neu (trastuzumab ou pertuzumab, utilisés dans les cancers du sein et de l'estomac), EGFR (cetuximab, panitumumab, utilisés dans les cancers ORL et les CCR).

Ils peuvent également cibler un composant essentiel du microenvironnement tumoral, comme les anti-VEGF (bevacizumab).

De nouvelles générations d'anticorps monoclonaux sont actuellement développées, en particulier les anticorps monoclonaux bispécifiques (BiTE) qui ciblent deux antigènes. Le premier à avoir été développé cible le CD19 (porté par les Lymphocytes B tumoraux dans la leucémie aigue lymphoblastique) et le CD3, et permet de rapprocher les LT des cellules tumorales, favorisant la destruction de ces dernières. D'autres BiTE sont en cours de développement cliniques, la plupart gardant le CD3 comme l'une des cibles, et avec une deuxième cible variable (244).

Enfin, une nouvelle classe d'anticorps monoclonaux a récemment émergé. Il s'agit des anticorps monoclonaux ciblant des points de rétrocontrôle immunitaire négatifs, les checkpoints immunitaires. Ils ciblent de manière non spécifique les voies d'activation des LT, visant à rétablir une immunité anti-tumorale efficace et font donc partie également des immunothérapies actives non spécifiques, et seront présentés dans le chapitre correspondant.

5.1.2 L'immunothérapie cellulaire

Le transfert adoptif est étudié depuis plusieurs dizaines d'années. Il consiste en l'administration de cellules, généralement autologues, traitées ex vivo. Les premiers résultats concluants datent d'il y a plus de 30 ans, où des LT prélevés et isolés chez des patients atteints de tumeur solide, étaient activés in vitro par de fortes doses d'IL-2 puis réinjectés (245). Les stratégies de transfert adoptif plus récentes utilisent les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL), prélevés et activés de la même façon, et ont montré une certaine efficacité dans le traitement du mélanome (245,246). Ces stratégies de transfert adoptifs ont depuis été optimisées, grâce à des méthodes de modification génétique des LT. Les cellules T à récepteur chimérique, ou CAR-T cells sont des cellules T autologues prélevées au patient, puis modifiées génétiquement pour exprimer un récepteur antigénique chimérique, non restreint par le CMH, cloné à partir du fragment hypervariable d'un anticorps. Actuellement, deux CAR-T cells possèdent une AMM pour les lymphomes, l'Axicabtagene ciloleucel (AxiCell) et Tisagenlecleucel (TisaCell), avec un récepteur ciblant le CD19. De nombreux autres CAR-T cells sont en cours de développement, y compris dans les tumeurs solides (247,248). Cependant ces traitements restent coûteux, complexes et toxiques, et leur large utilisation nécessitera de prendre en compte ces limites.

5.2- Immunothérapie active

5.2.1 L'immunothérapie active spécifique : les vaccins

Les vaccins prophylactiques, en cancérologie, visent à prévenir une infection potentiellement oncogène. Leur efficacité est majeure comme pour le vaccin contre le virus de l'hépatite B qui permet de prévenir le développement de carcinome hépatocellulaire sur hépatite B chronique, ou le vaccin contre le papillomavirus (HPV) qui permet de prévenir les cancers du col de l'utérus, de l'anus ou ORL liés à l'HPV.

Les vaccins thérapeutiques visent à rétablir une réponse immunitaire spécifique anti-tumorale une fois tumeur en place. Ils sont basés sur l'administration d'un peptide antigénique ou de protéines tumorales, ou encore d'ADN tumoral. Le peptide peut éventuellement être vectorisé, ou présenté par des CPA autologues. En effet, le premier vaccin thérapeutique ayant reçu l'AMM en France est un vaccin basé sur le prélèvement de PBMC autologues par leucophérèse, et mises en présence ex vivo d'une protéine de fusion (PA2024) constituée de l'antigène phosphatase de l'acide prostatique (Prostatic acid phosphatase, PAP) et de GM-CSF. Ce vaccin a obtenu l'AMM en 2013 pour le traitement des cancers de la prostate (249).

5.2.2 L'immunothérapie non spécifique

Les immunomodulateurs

Les traitements par cytokines immunomodulatrices ont été utilisés depuis de nombreuses années. L'IL-2 à doses élevées et l'IFN ont montré une certaine efficacité dans le traitement des cancers du rein et des mélanomes (250–254). L'IL-2 stimule les LT et les cellules NK, alors que l'IFN a plutôt un effet inhibiteur direct sur les cellules tumorales. En dehors de ces cytokines, dont l'utilisation est autorisée par la FDA, d'autres molécules ont été étudiées comme l'IL-15 ou l'IL-22. Ces molécules sont désormais peu utilisées car supplantées par de nouvelles stratégies d'immunothérapies comme les inhibiteurs de checkpoint immunitaires. Elles pourraient cependant trouver une place en combinaison de certaines stratégies d'immunothérapies.

Les inhibiteurs de checkpoint immunitaires

Les inhibiteurs de checkpoint immunitaires (ICI) ont connu un développement clinique majeur et rapide depuis quelques années. Il s'agit d'anticorps monoclonaux ciblant les récepteurs co-inhibiteurs de la réponse immunitaire sur les cellules T, dans le but de bloquer ces signaux inhibiteurs afin de restaurer une réponse immunitaire efficace. Le Cytotoxic-T-Lymphocyte-Antigen 4 protein (CTLA-4) (ipilimumab et tremelimumab), le Programmed Cell Death-1 (PD-1) (nivolumab et pembrolizumab), ou son ligand (PD-L1) (atezolizumab, durvalumab, avelumab) sont devenues des cibles privilégiées (255). Ces molécules sont désormais utilisées en routine dans de nombreux types de tumeurs. Leur utilisation dans les cancers digestifs sera détaillée dans les chapitres suivants.

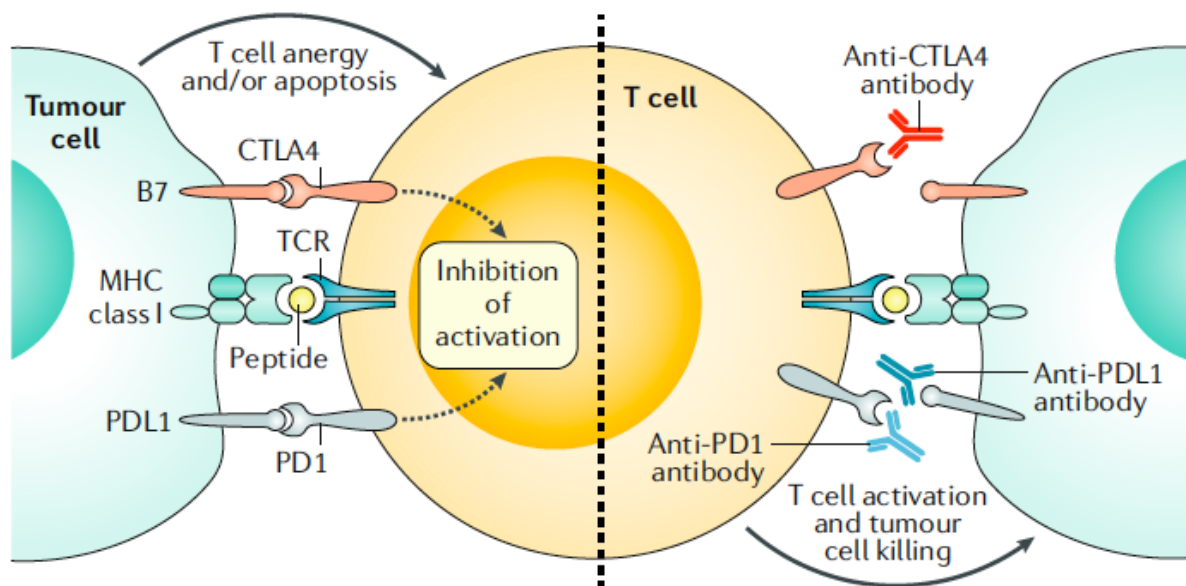


Figure 9 : Mécanismes d'actions des inhibiteurs de checkpoint immunitaires

D'après Ganesh et al Nature review in Gastroenterology and Hepatology 2019 (256)

Chapitre 2 : Immunité et cancers digestifs

1- Spécificité de l'immunité dans le cancer colorectal

1.1- Les TAA dans le cancer colorectal

Plusieurs types de TAA sont exprimés par la tumeur. Dans le cancer colorectal (CCR), les TAA les plus fréquents sont des antigènes du soi normaux, exprimés à de faibles concentrations dans les cellules normales et dans les tissus embryonnaires et à des concentrations élevées dans les cellules tumorales. Le plus célèbre d'entre eux est l'antigène carcino-embryonnaire (ACE), qui est normalement exprimé dans les tissus fœtaux et largement surexprimé dans les CCR (257). S'il a été démontré initialement que l'ACE peut entraîner une réponse cytotoxique spécifique (258), des travaux plus récents ont montré que l'ACE pouvait jouer un rôle immunosuppresseur et que les lymphocytes T des patients atteints de CCR n'étaient pas activés par la présentation de cet antigène in vitro (259). D'autres antigènes du soi sont supposés être immunogènes dans le CCR, tels que Ep-Cam, HER-2 / neu (260), MUC-1 et p56. Les réponses immunitaires contre certains néo-antigènes, générées par des mutations (tp53, Kras) ou contre l'antigène MAGE-3, appartenant à la famille des « antigènes cancer testis » normalement exprimés par les cellules germinales, ont été également identifiées (258).

Les TAA, qui jouent probablement un rôle important dans l'immunosurveillance, sont également des cibles potentielles pour l'immunothérapie dans les stratégies de vaccination.

L'instabilité microsatellite dans le CCR est associée à des TAA immunogéniques

L'instabilité microsatellite (MSI) est retrouvée chez des patients atteints de CCR, dans le cadre d'un syndrome de Lynch dans 1/3 des cas, mais plus fréquemment dans le cadre de cancers sporadiques dans 2/3 des cas, en particulier chez des patients âgés. Elle est observée dans 5 à 25% des CCR, en fonction du stade et de la localisation tumorale. Les tumeurs MSI sont

associées à une densité importante de TIL, et ont un meilleur pronostic que les CCR sans instabilités microsatellites (MSS) (261–263).

Cette instabilité induit des mutations somatiques à l'origine du décalage du cadre de lecture au sein des gènes portant des séquences répétées. Normalement, ces décalages sont corrigés par un système de réparation des mésappariements de l'ADN (proficient mismatch repair (MMR ou pMMR)), spécialisé dans la réparation des mésappariements de l'ADN. Le MMR constitué principalement des protéines MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 s'associent sous forme d'hétérodimères, classiquement MSH2-MSH6 et MLH1-PMS2 afin de reconnaître et réparer les erreurs de l'ADN polymérase (264). C'est dans le cadre d'un défaut du MMR (déficient MMR ou dMMR), lié à une mutation inactivatrice constitutionnelle ou sporadique, que va survenir l'instabilité microsatellite. Cette instabilité, pouvant intervenir dans des séquences non codantes et codantes, vont entraîner des mutations de gènes intervenant dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN. De plus, ces mutations n'induisent pas seulement l'inactivation des gènes concernés mais aussi l'apparition de nombreux néoantigènes potentiellement immunogéniques. Des néoantigènes immunogènes issus de mutations de TGFR β 2, OGT, MSH, caspase 5, AVCR2, PTEN, ASTE1, HNF1A et TCF7L2 ont été rapportés dans différentes études (265–269). En effet, il a été montré que ces différentes mutations du cadre de lecture étaient associées à un infiltrat CD8⁺ plus important, et que les peptides issus de ces gènes mutés étaient capables *in vitro* d'induire une réponse cytotoxique par des CTL issus de patients avec un cancer colorectal (269).

Cependant, certains mécanismes immunosuppresseurs ont également été associés aux tumeurs MSI/dMMR. Par exemple, la perte d'expression du CMH I peut être liée à l'inactivation du gène de la β 2 microglobuline (270). Par ailleurs un grand nombre de Treg est également retrouvé dans l'infiltrat immunitaire de ces tumeurs (271).

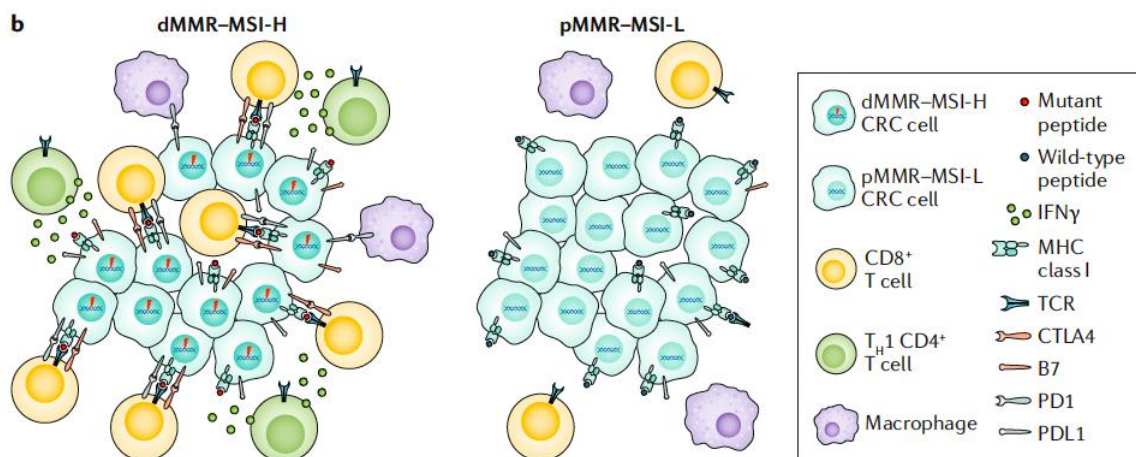


Figure 10 : Microenvironnement tumoral dans les tumeurs MSI/dMMR et MSS/pMMR

D'après Ganesh Nat Rev Gastroenterol hepatol 2019

Les mutations POLE sont associées à des TAA immunogéniques

A l'instar des formes MSI/dMMR, il a plus récemment été mis en évidence que certaines altérations moléculaires parfois retrouvées dans les cancers colorectaux pouvaient entraîner un phénotype hypermuté à l'origine de nombreux TAA (272). C'est le cas des mutations de POLE, qui représentent cependant moins de 2% des CCRm, et généralement chez des sujets jeunes, et ayant des cancers du colon droit MSS/pMMR(273). Il s'agit de mutation de bon pronostic (274). Les tumeurs ayant une mutation POLE présentent des taux extrêmement élevés de substitutions mononucléotidiques, dépassant souvent 100 mutations / Mb (275). Dans la grande majorité des cas il s'agit de formes somatiques, même si quelques formes germinales ont été décrites dans le cadre de polyposes familiales. Comme les tumeurs MSI/dMMR, les mutations de POLE entraînent un infiltrat CD8⁺ important, et pourrait être de bons candidats à l'immunothérapie. Plusieurs études avec des ICI sont actuellement en cours.

1.2- Rôle pronostic des cellules immunitaires dans le CCR

Lymphocytes infiltrant la tumeur CD8⁺ et CD45RO⁺

Le rôle des CTL CD8⁺ a été largement étudié dans le cadre du CCR. Les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) jouent un rôle central dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Le rôle pronostique de la réponse immunitaire a été analysé dans une grande cohorte de patients résectionnés.

Pagès et al. (276) ont montré que l'absence de signes pathologiques d'invasion métastatique précoce (invasion veineuse, lymphatique et péri-neurale) était associée à une augmentation des

cellules immunitaires infiltrant la tumeur, en particulier les LT CD8⁺ et à une augmentation des niveaux d'ARNm des facteurs de la réponse Th1.

La densité de TIL, caractérisée par un immunomarquage CD3⁺, a été rapportée comme étant plus prédictive de la survie globale que tous les facteurs pronostiques histopathologiques habituels (en particulier la classification UICC-TNM) (47). En effet, la survie globale à 5 ans chez les patients présentant une densité de TIL CD3⁺ élevée, moyenne ou faible était de 72,6%, 49,5% et 29,9%, respectivement. En analyse multivariée, la densité de TIL restait un facteur pronostique indépendant, tandis que la classification TNM n'était plus un facteur indépendant après ajustement de la densité de TIL. Plus précisément, les TIL les plus augmentés dans les tumeurs sans signe d'invasion précoce étaient les LT mémoires (CD45RO⁺), qui avaient une très forte valeur pronostique, conservée en analyse multivariée.

Les patients qui avaient une densité élevée ou faible de TIL CD45RO⁺ avaient des médianes de survie sans maladie de 36,5 mois et 11,1 mois respectivement, et des médianes de survie globale de 53.2 mois et 20.6 mois ($p < 0.001$ pour les deux critères).

Considérant ces résultats, un score immunitaire pronostic a été élaboré basé sur 4 types de éléments : la densité de l'infiltrat CD8⁺ au centre de la tumeur (CT), et à la marge d'invasion (IM), et la densité des cellules mémoires CD45RO⁺ dans ces deux zones respectivement (CT et IM). Ce score a d'abord été étudié dans les CCR de stade I et II (277). Les patients avec une densité élevée des deux composants CD8⁺ et CD45RO⁺ à la fois CT et IM, avaient une survie sans maladie de 95.2%, comparé à 25% chez les patients avec une densité faible des deux types cellulaires et dans les deux régions. L'analyse d'une cohorte de près de 600 patients de stade I à IV a confirmé que ce score avait une valeur pronostique supérieure au TNM (278) mais également au statut MSI en analyse multivariée (279). Plus récemment une cohorte internationale de validation externe de plus de 2500 patients opérés de CCR de stade I à III, a confirmé la valeur et la reproductibilité à grande échelle de ce score pronostic (280). Enfin, dans les CCR métastatiques, l'immunoscore réalisé cette fois sur des métastases opérées est également un facteur pronostic important (281).

Cependant, l'intérêt en pratique clinique de ce score est pour l'instant limité par l'absence de preuve de sa valeur prédictive de l'efficacité des traitements.

Autres cellules immunitaires infiltrantes

La valeur pronostique des différentes sous-populations de LT CD4⁺ a également été étudiée dans le cancer colorectal. Les Th17 sont généralement associés à un mauvais pronostic, en accord avec leur valeur immunosuppressive. A l'inverse, l'expression de gènes associés à une réponse Th1, comme Tbet, est associée à un meilleur pronostic. (47,57). Par ailleurs, bien que le nombre de Th1 soit plus important dans les cancers MSI/dMMR, cette valeur pronostique des Th1 dans le CCR est retrouvée quel que soit le statut MMR (282–284).

Dans le CCR, l'infiltrat tumoral en NK est généralement également associé à un meilleur pronostic même si cela n'est pas toujours retrouvé (285,286). En fait, plus que l'infiltrat NK seul, la collaboration entre les CD8⁺ et les NK semble avoir un impact pronostic important, puisque les patients ayant une tumeur montrant une infiltration élevée pour ces deux types (CD8⁺ et CD57⁺) semblent avoir une meilleure survie que les autres (287).

La valeur pronostic des Treg dans le CCR a longtemps été controversé. Les Treg sont généralement associés à un mauvais pronostic dans la grande majorité des cancers. Cependant, dans les cancers colorectaux, un effet favorable des Treg sur le pronostic a été observé dans plusieurs études (198,199,288,289). Plusieurs méta-analyses confirment globalement cette valeur pronostique (Hu Oncotarget 2017 ; Xu Front Physiol 2017). A l'inverse, dans d'autres études, un mauvais pronostic était associé aux Treg/CD8 (271,290). En fait, la majorité des études portant sur les Treg intratumoraux dans le CCR est basé sur l'étude de FOXP3. La discordance des résultats ci-dessus est donc probablement liée à l'existence de plusieurs populations de cellules FOXP3⁺. En effet, dans le cancer colorectal, 2 populations de cellules T CD4⁺FOXP3⁺ coexistent, l'une non suppressive FOXP3^{low}, associée à un bon pronostic, et l'autre suppressive FOXP3^{high} associée à un mauvais pronostic (291).

Enfin, certaines cellules myéloïdes dont les macrophages ont été rapportés comme ayant une valeur pronostic positive dans le CCR (292–294).

Utilisation des cellules circulantes comme marqueur pronostic

Plusieurs études ont également analysé les cellules périphériques dans le sang de patients atteints de cancer colorectal. En effet, les cellules immunitaires du sang périphérique, accessibles par une simple prise de sang peuvent fournir une fenêtre sur l'immunité anti-tumorale de manière simple et dynamique dans le temps. Cependant, l'immunité périphérique a longtemps été considérée comme un élément mineur du système immunitaire, car l'immunité

locale anti-tumorale n'est pas toujours en corrélation avec l'immunité systémique (295–297). Dans le cancer colorectal, l'augmentation ou la diminution de plusieurs populations de cellules immunitaires a largement été décrite et associée au stade, et corrélée à l'infiltrat intratumoral (172,298–300). Plusieurs d'entre elles ont montré une valeur pronostique, cependant peu reproductible selon les études, étant donné les faibles effectifs et les populations hétérogènes, ainsi que les caractérisations phénotypiques variables de certaines populations. En particulier : les NK, CD4⁺, et CD8⁺ circulants ont été rapportés comme de bon pronostic, tandis que les Treg, les MDSC et les NKT ont été décrits comme étant de mauvais pronostic (223,224,301–303).

2- Principaux résultats de l'immunothérapie dans le cancer colorectal

Bien que l'immunothérapie par les anticorps ciblant les corécepteurs inhibiteurs fasse partie désormais des traitements standards dans plusieurs types de cancers, elle peine à montrer une efficacité dans le cancer colorectal. En effet, les premières études n'ont montré aucune réponse tumorale dans le CCR. L'identification systématique des formes MSI/dMMR a permis cependant un regain d'intérêt.

2.1- Inhibiteurs des Checkpoint Immunitaires dans les CCR MSI/dMMR

L'histoire de l'immunothérapie dans les cancers MSI/dMMR a commencé avec la constatation qu'un seul patient présentait une réponse tumorale parmi les patients atteints d'un CCR, dans un essai testant un anti-PD-1, le pembrolizumab, dans plusieurs types de tumeurs (304). Il a été constaté que ce seul patient était porteur d'une tumeur MSI/dMMR. Sur la base de cette observation, combinée aux découvertes récentes sur l'immunogénicité des cancers MSI/dMMR, un essai de phase II a été mené avec le pembrolizumab dans 3 cohortes distinctes : des CCR MSS/pMMR, des CCR MSI/dMMR, et des cancers de toutes localisations MSI/dMMR. Cette étude a montré chez les 28 patients avec un CCR MSI/dMMR un taux de réponse de 50% et un taux de contrôle de la maladie de 89% avec une médiane de survie sans progression non atteinte à 2 ans, tandis qu'aucun des patients MSS/pMMR n'avait répondu

(305). Les résultats du pembrolizumab dans les cancers MSI/dMMR ont également été confirmés dans la cohorte non CCR MSI/dMMR de cette étude, puis dans une cohorte d'expansion de 86 patients dans 12 types de cancers dont 40 ayant un CCR (306). Enfin, il était également observé que l'efficacité était significativement corrélée à la charge mutationnelle. A la suite de cette observation, un autre anti-PD-1, le nivolumab, a également montré des taux de réponses importants chez 74 patients chimio-réfractaires avec un CCR MSI/dMMR, avec 31% de réponse objective (307). Dans cette étude, une combinaison nivolumab + ipilimumab (anti-CTLA-4) a également été testée chez 119 patients et a montré un taux de réponse de plus de 50% et des taux de survie sans progression et globale à 2 ans de 60 et 74% respectivement, au prix cependant d'une certaine toxicité puisqu'une toxicité de grade 3-4 survenait chez 31% des patients et entraînait l'interruption du traitement chez 13% des patients (Overman ASCO GI 2019). Sur la base de ces résultats, la Food and Drug Administration (FDA) a autorisé l'utilisation du pembrolizumab et du nivolumab en 2^{ème} ligne de traitement chez les patients MSI/dMMR aux États-Unis. Cependant, en Europe, les anti-PD1 n'ont pas obtenu d'autorisation de mise sur le marché dans cette indication, l'European Medicament Agency (EMA) considérant l'absence d'études randomisées. Plusieurs études randomisées de première (Keynote-177) et deuxième ligne (Samco) sont en cours.

Cependant, certaines tumeurs MSI/dMMR restent résistantes aux ICI. Différents mécanismes de résistances, primaires ou acquis, ont été décrits comme la perte d'expression du CMH I, fréquemment retrouvée dans ces tumeurs MSI/dMMR (308,309), ou des mutations de JAK1/2 altérant la voie de signalisation de l'IFN γ (310). Des altérations de la voie de la β -caténine ont également été décrites dans des tumeurs non colorectales MSI/dMMR (311).

2.2- Inhibiteurs des Checkpoint immunitaires dans les CCR MSS/pMMR

A l'inverse des résultats très encourageants dans les cancers MSI/dMMR, les études ayant inclus des patients ayant un CCR MSS/pMMR sont très décevantes. En effet, dans les premières études avec le pembrolizumab ou le nivolumab, aucune réponse n'était retrouvée. La combinaison d'un anti-PD1 et d'un anti-CTLA-4 ne semble pas beaucoup plus efficace puisque la combinaison nivolumab + ipilimumab ne permettait qu'une seule réponse tumorale parmi 20 patients MSS/pMMR. Cependant une étude plus récente de combinaison est un peu plus encourageante et ouvre la voie pour la sélection de nouvelles populations potentiellement

sensibles parmi les MSS/pMMR. En effet, au congrès de l'ASCO 2019 étaient présentés les résultats obtenus avec l'association durvalumab (anti-PDL1)+ tremelimumab (anti-CTLA4), comparé aux soins de supports exclusifs chez des patients réfractaires aux traitements standards (Xueyu Chen et al ASCO 2019). De manière encourageante, cette bithérapie chez 166 patients MSS/pMMR randomisés entraînait cette fois un bénéfice significatif en survie globale (HR 0.72 (IC95% 0,54 – 0,97 ; p = 0,07, dans cette étude un p<0,10 était requis par le design statistique). De plus, une charge mutationnelle (tumor mutational burden TMB) élevée (définie ici comme TMB>28 Mutations/megabase), présente chez 21% des patients, était prédictive de l'efficacité du traitement. Ces constatations, qui doivent être confirmées dans des études dédiées, ouvrent la voie à l'identification de populations cibles plus larges que les MSI/dMMR (Xueyu Chen et al ASCO 2019).

Certains essais ont essayé de combiner un ICI avec une autre thérapie ciblée. Cependant, en dépit d'un rationnel biologique certain, là encore les résultats sont pour l'instant décevants, en particulier avec l'association anti-MEK + anti-PDL1 (cometinib + atezolizumab), ou anti-VEGF + antiPDL1 (bevacizumab + atezolizumab) (312,313). Il en est de même pour l'utilisation combinée avec la radiothérapie, théoriquement immunogène, actuellement en cours d'investigation.

De nombreux essais sont encore en cours à la fois dans les CCR MSI/dMMR et les CCR MSS/pMMR (256).

2.3- Autres stratégies d'immunothérapie dans les CCR

D'autres stratégies d'immunothérapies ont été développées dans le CCR, sans toutefois d'utilisation thérapeutique validées pour le moment. Tout d'abord, d'autres checkpoints immunitaires pourraient être ciblés dans le CCR (OX40, Lag3, Tim3, TIGIT...) et de nombreux essais sont en cours dans les cancers solides, en phase clinique précoce. Aucun résultat n'est disponible actuellement dans les CCRm (256).

En dehors des checkpoints immunitaires, l'utilisation de CAR-T cells dirigés contre l'ACE a fait l'objet de quelques données préliminaires, retrouvant quelques réponses chez des patients chimio-réfractaires, mais au prix d'une toxicité majeure (314–316). Le transfert adoptif de TIL autologues sélectionnés ex vivo pour leur spécificité dirigée contre la mutation KRAS^{G12D} a également été rapportée avec succès chez un patient, sans que l'on ait à l'heure actuelle de résultats d'essais cliniques (317).

Les thérapies cytokiniques immunomodulatrices sont explorées depuis de nombreuses années mais n'ont pour le moment pas montré d'efficacité majeure dans le CCR.

Cependant, quelques résultats notables ont été rapportés. D'abord, l'administration GM-CSF, associé à une chimiothérapie par Gemcitabine et Folfox (GOLFIG) a montré une certaine efficacité en phase II (318). Une étude de phase III a comparé GOLFIG à FOLFOX. Une analyse intermédiaire a montré une supériorité significative de l'immuno-chimiothérapie GOLFIG par rapport à la chimiothérapie FOLFOX en termes de taux de réponse (66.1% contre 37%, $p = 0,002$) et de survie sans progression (9.23 mois contre 5.7 mois, HR = 0,52, $p = 0,002$), ainsi qu'une tendance non significative pour la survie globale (289). Cependant l'essai a été arrêté prématurément du fait de difficultés de recrutement, et de plus l'utilisation de schémas de chimiothérapie cytotoxique différents ne permet pas de conclure sur l'intérêt d'ajouter le GM-CSF à la chimiothérapie.

Enfin, des essais de vaccinations antigéniques, ou avec des cellules tumorales autologues, ont été rapportés ou sont en cours, mais à ce jour, aucun résultat probant n'a été observé (256,319,320).

4- Spécificité de l'immunité dans le cancer gastrique

4.1- Classification moléculaire et sous-types immunogènes

Récemment, d'importants progrès ont été réalisés dans la classification moléculaire du cancer gastrique (CG), établissant 4 sous-types génomiques (321). Le sous-groupe de tumeurs le plus fréquent est caractérisé par une instabilité chromosomique (CIN), et représente environ 50% de tous les patients. Ce groupe est caractérisé par une mutation de TP53 et une voie RAS altérée. Histologiquement, ce sous-groupe est principalement caractérisé par une histologie intestinale. Les tumeurs présentant une instabilité des microsatellites (MSI/dMMR) représentent environ 22% des patients. Le troisième sous-groupe de tumeurs représentant environ 20% des cas est appelé tumeur génomiquement stable (GS). Histologiquement, ces tumeurs sont caractérisées par une histologie diffuse et génétiquement par les mutations CDH1 / RHOA ou CLDN18-ARHGAP. Le dernier sous-groupe de tumeurs est constitué de tumeurs liées au virus Epstein-Barr (EBV) et caractérisées par la mutation de PIK3CA, la désactivation de CDKN2A et la surexpression de PD-L1/2. Les cancers gastriques EBV positif et MSI/dMMR sont caractérisés

par une densité élevée de TIL, associée à une meilleure survie, par rapport aux autres sous-types de tumeurs (322–324).

Les cancers gastriques MSI/dMMR

Le phénotype MSI/dMMR dans le cancer gastrique est principalement causé par une hyperméthylation épigénétique de MLH1, plutôt que par des mutations germinales d'un gène du MMR (325–327). Les cancers gastriques MSI/dMMR représentent 8 à 37% selon les études (328). Les CG MSI/dMMR sont généralement plus fréquemment retrouvés chez les femmes et à un âge avancé. Ils sont préférentiellement localisés dans l'antre, et généralement de type histologique intestinal. Les CG MSI/dMMR sont associés à des maladies généralement moins avancées, et de meilleur pronostic (329).

Le rôle prédictif du MSI pour la réponse à une chimiothérapie adjuvante à base de 5-FU est contradictoire. Aucune différence dans la survie globale entre MSI et MSS n'a été observée dans une étude de 240 patients (325) Cependant, une étude plus récente a montré que la survie sans maladie était améliorée dans le groupe MSS/pMMR traité par chimiothérapie à base de 5-FU.

Comme dans les CCR MSI/dMMR, les CG MSI/dMMR présentent des taux de mutation et d'hyperméthylation élevés. L'analyse mutationnelle des cancers gastriques MSI/dMMR a révélé 37 gènes mutés de manière significative, y compris TP53, KRAS, PIK3A et AR1D1A (321). Les cancers gastriques MSI/dMMR sont logiquement caractérisés par une densité élevée de TIL, associée à une meilleure survie, par rapport aux autres sous-types de tumeurs (322,323,330).

Les CG MSI/dMMR peuvent être associés également à une surexpression de PD-L1, plutôt corrélée à un bon pronostic dans ce cas. Le mécanisme de cette surexpression pourrait être lié à une stimulation de l'expression de PD-L1 induite par la sécrétion d'IFN γ par les TIL (331,332).

Les cancers gastriques EBV

Les CG EBV surviennent principalement dans le fundus ou le corps gastrique, et sont plus fréquents chez les hommes. Ils représentent 5 à 10% des CG, et sont associés à un meilleur pronostic (333,334). L'infection par EBV induit une hyperméthylation de l'ADN, une

amplification de JAK2, et de nombreuses mutations à l'origine de la carcinogenèse et d'une charge mutationnelle élevée (335,336).

Les CG EBV sont caractérisés par un infiltrat immunitaire important (322–324,337). En effet, histologiquement, ces CG EBV s'apparentent dans la majorité des cas à un sous-type histologique identifié depuis plus de 40 ans, les carcinomes à stroma lymphoïde (carcinoma with lymphoid stroma, CLS).

Il est également retrouvé dans les CG EBV une expression élevée de PD-L1 et PD-L2. En effet une amplification du locus 9p24.1 est retrouvée dans 15% des CG EBV, ce locus contenant les gènes codant pour PD-L1 et PD-L2 (321,332,338). Cette expression de PD-L1 serait dans le cas des tumeurs EBV associée à un mauvais pronostic (337).

4.2- Classification histologique et immunité

Si la classification moléculaire permet de mieux appréhender les mécanismes oncogènes et pourra permettre à l'avenir d'individualiser les traitements, la classification histologique de Lauren est la plus utilisée en pratique clinique et dans les essais. Elle considère trois types de cancer gastrique en fonction de leurs caractéristiques pathologiques : type intestinal, type diffus et mixte (339). Le cancer gastrique intestinal survient le plus souvent chez des hommes et des patients plus âgés, est plus souvent retrouvé dans l'antrum gastrique et présente une évolution plus longue et un meilleur pronostic. En revanche, le type diffus est associé à un âge de survenue plus jeune, et au sexe féminin, par rapport au type intestinal. Malgré une diminution de l'incidence globale du cancer gastrique au cours des dernières décennies, l'incidence du type diffus / mixte est en augmentation constante, en Asie, aux États-Unis et en Europe, représentant de 35% à 45% des cas d'adénocarcinome gastrique dans des études récentes (340). Son incidence a été multipliée par 10 entre 1970 et 2000. Le GC de type diffus avancé est généralement associé à un plus mauvais pronostic et une chimiosensibilité inférieure comparé au type intestinal. Ils sont apparentés dans des classifications plus récentes aux adénocarcinomes à cellules indépendantes (ADCI). Les CG de type diffus sont caractérisés par la perte d'expression d'E-Cadhérine, qui représente un événement précoce et carcinogène majeur dans ces formes. Une forme familiale, rare, existe, (le cancer gastrique diffus héréditaire), lié à la mutation du gène CDH1, codant pour E-Cadhérine.

Il a été observé que les tumeurs de type diffus présentaient une augmentation de l'expression de PD-L1 par rapport au type intestinal dans de grandes cohortes de patients réévalués de

tumeurs localisés (341,342). Cependant, PD-L1 était au contraire moins exprimé dans les types diffus dans une autre étude chez des patients ayant cette fois-ci un CG avancé (343).

Excepté la description de la différence d'expression de PD-L1 entre différents types de tumeurs, la différence de statut immunitaire entre ces différents sous-types histopathologiques dans le cancer gastrique avancé n'a pas encore été étudiée.

4.3- Infiltrat immunitaire et pronostic dans le CG

De nombreuses études ont évalué la corrélation entre les cellules immunes intra-tumorales et le pronostic du cancer gastrique. Une densité élevée de CD3 +, de CD8 + cytotoxiques et de lymphocytes T mémoire est associée à un bénéfice en termes de survie chez les patients atteints d'un cancer gastrique. Comme vu précédemment, les CG MSI/dMMR et EBV sont associées à une densité de TIL plus élevée. L'infiltrat en cellules B intratumorales et en NK semble également associé à un meilleur pronostic (330,344–347). Il faut noter que ces analyses pronostiques reposent systématiquement sur des analyses de pièces opératoires dans des formes résécables, et qu'il n'existe aucune donnée dans les formes avancées. Il est difficile d'extrapoler ces données immunologiques, comme le souligne les différences d'expression de PD-L1 ou de densité de TIL selon le stade (343). Le pronostic des Treg est plus controversé dans le cancer gastrique, rapporté comme pouvant être de bon ou de mauvais pronostic, probablement lié à la difficulté de les caractériser en immunohistochimie, comme dans le CCR.

Table 2 Lymphocyte subtypes associated with the prognosis of gastric cancer

Ref.	Lymphocyte subtypes	Sample size	Patient group	Criteria (cut-off)	Prognostic role
Lee <i>et al</i> ^[17]	CD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CD45RO ⁺	220	G	High density	Increased OS
Thompson <i>et al</i> ^[18]	CD8 ⁺	43	G/GEJ	High density	Decreased PFS and OS
Kawazoe <i>et al</i> ^[33]	CD8 ⁺	487	G	High density	Increased OS
Wakatsuki <i>et al</i> ^[30]	CD45RO ⁺	101	G	High numbers	Increased PFS and OS
Chiaravalli <i>et al</i> ^[34]	CD3 ⁺ , CD8 ⁺	96	MSI-H G	High numbers	Increased OS
Kim <i>et al</i> ^[22]	CD8 ⁺ , FOXP3 ⁺	99	MSI-H G	High density	Increased OS
Liu <i>et al</i> ^[23]	CD8 ⁺ /FOXP3 ⁺ ratio	166	G	High ratio	Increased OS
Shen <i>et al</i> ^[26]	FOXP3 ⁺ /CD8 ⁺ ratio	133	G	High ratio	Decreased OS
Wang <i>et al</i> ^[5]	FOXP3 ⁺	107	G	High expression	Increased OS
Haas <i>et al</i> ^[23]	FOXP3 ⁺	52	G	High numbers	Increased OS
Mizukami <i>et al</i> ^[24]	FOXP3 ⁺	120	G	Diffuse pattern	Decreased OS
Perrone <i>et al</i> ^[25]	FOXP3 ⁺	110	G	High numbers	Decreased RFS and OS
Zhou <i>et al</i> ^[27]	FOXP3 ⁺	133	G	High numbers	Decreased OS
Choi <i>et al</i> ^[19]	FOXP3 ⁺ /CD4 ⁺ ratio	28	G	High ratio	Increased OS
Kim <i>et al</i> ^[21]	FOXP3 ⁺ /CD4 ⁺ ratio	180	G	High ratio	Decreased OS
Dong <i>et al</i> ^[35]	CD20 ⁺	100	G	High density	Increased OS
Ishigami <i>et al</i> ^[31]	NK cells	146	G	High numbers	Increased OS
Rosso <i>et al</i> ^[36]	NK cells	72	G	High concentration	Increased DFS and OS
Ishigami <i>et al</i> ^[37]	NK cells	169	G	High numbers	Increased OS
Ubukata <i>et al</i> ^[28]	Th1/Th2 ratio	157	G	High ratio ¹	Increased OS
Liu <i>et al</i> ^[29]	Th22, Th17	32	G	High numbers ¹	Decreased OS

¹Peripheral blood. G: Gastric cancer; OS: Overall-survival; G/GEJ: Gastric/gastro-esophageal junction cancer; PFS: Progression-free survival; MSI-H: Microsatellite instability-high; RFS: Relapse-free survival; DFS: Disease-free survival.

Figure 11. Rôle pronostique des lymphocytes dans les cancers gastriques

D'après Kang World Journal of Gastrointestinal Oncology 2017

5- Principaux résultats de l'immunothérapie dans le cancer gastrique

Si l'utilisation d'inhibiteurs de checkpoint immunitaire a rapidement été approuvée dans les cancers gastriques après des premières études encourageantes, d'autres essais plus récents étaient globalement négatifs, et décevants.

Anti-PD1/Anti-PD-L1

Le nivolumab et le pembrolizumab ont, tous deux, été testés dans les cancers gastriques avancés. Un essai randomisé de phase III mené en Asie, l'essai ATTRACTION 02, comparait le nivolumab à un placebo chez des patients atteints d'un cancer gastrique avancé ayant reçu au moins deux lignes de chimiothérapie (348). Cet essai a montré une augmentation de la survie globale avec le nivolumab, avec une médiane de 5,3 comparé à 4,1 mois avec un placebo (HR, 0,60, IC95%: 0,151-0,78; $p < 0,0001$). Sur la base de cet essai, le nivolumab a été approuvé au Japon pour le traitement du cancer gastrique avancé progressant après chimiothérapie standard. Après ce premier succès, une étude de phase II avec le pembrolizumab (Keynote 059) a également suggéré l'intérêt d'un anti-PD1 en 3^{ème} ligne de traitement ou plus (349). Le pembrolizumab permettait dans cette étude un taux de contrôle de la maladie de 27% et une médiane de survie sans progression de 5,6 mois. De plus, cette étude suggérait un meilleur taux de réponse en cas d'expression de PD-L1 sur l'ensemble des cellules (cellules tumorales et cellules du microenvironnement tumoral) représenté par le score $CPS \geq 1$ (combined positive score). Cette étude, bien que non comparative, a permis l'autorisation par la FDA du pembrolizumab pour les tumeurs gastriques $CPS \geq 1$. Dans cette même étude KEYNOTE 059, deux cohortes cette fois-ci en première ligne de traitement (associé à la chimiothérapie par 5FU-Cisplatine ou en monothérapie) ont montré des résultats préliminaires prometteurs avec des taux de réponse de 60% et 25% respectivement (350). Cependant, l'enthousiasme soulevé par ces deux premières études est rapidement retombé avec la communication des résultats de plusieurs études négatives. En effet, le pembrolizumab a de nouveau été testé dans 2 nouvelles études cette fois-ci comparative. La première, KEYNOTE 061, testait le pembrolizumab en

2^{ème} ligne chez des patients avec un CPS \geq 1, comparé à une chimiothérapie par docetaxel, et n'a montré aucun bénéfice en terme de survie globale ni survie sans progression (351). Enfin, l'essai KEYNOTE 062 testait le pembrolizumab en 1^{ère} ligne en monothérapie ou en combinaison avec la chimiothérapie, comparé à la chimiothérapie standard seule. Malgré un design statistique complexe avec plusieurs objectifs dans différentes populations en fonction du CPS, l'étude est globalement négative pour les 2 schémas expérimentaux (pembrolizumab +/- chimiothérapie) qui n'étaient pas supérieurs à la chimiothérapie standard, que ce soit chez les patients avec un CPS \geq 1 ou les patients avec un CPS \geq 10 (Taberero abstract 4007 ASCO 2019)

Un anti-PD-L1, l'avelumab, a également été testé dans le cancer gastrique avancé en 3^{ème} ligne, dans une étude de phase III, Javelin Gastric 300, comparé à une chimiothérapie (352). Cette étude, dans laquelle les patients n'étaient pas sélectionnés sur l'expression du PD-L1, était également négative.

Combinaison anti-PD1/anti-CTLA-4

Une étude de phase II, l'étude Checkmate 032, a testé un anti-PD1 seul (nivolumab) ou une combinaison nivolumab + anti-CTLA-4 (ipilimumab) chez des patients ayant reçu au moins une ligne de traitement. La combinaison nivolumab (1mg/kg) et ipilimumab (3mg/kg) permettait d'obtenir un taux de réponse encourageant, de 24%, mais avec une survie sans progression médiane de 1,4 mois seulement, soulignant encore une fois que seul une petite partie des patients bénéficient de ces traitements (353).

MSI/dMMR et EBV sont prédictifs d'efficacité des ICI

Les résultats discordants des différentes études présentées ci-dessus soulignent la nécessité de mieux sélectionner les patients. L'expression de PD-L1, qui a été étudiée dans la majorité de ces études, ne semble pas être d'un intérêt majeur, puisque malgré certains signaux dans les tumeurs ayant un score CPS \geq 1 puis un CPS \geq 10, les études de phase III utilisant ces critères comme critères d'inclusion n'ont pas retrouvé d'efficacité des ICI avec ce critère de sélection. D'autres marqueurs utiles pour sélectionner les patients. D'abord, comme dans les CCR, les tumeurs MSI/dMMR semblent avoir une réponse majeure aux ICI. En effet, cela avait été suggéré dans la première cohorte de tumeurs MSI/dMMR qui comprenait 5 patients avec un cancer gastrique (305). Cela semble être confirmé dans les analyses de sous-groupe des essais

KEYNOTE 059 et KEYNOTE 061. Dans l'essai KEYNOTE 059, le taux de réponse dans les tumeurs MSI/dMMR et MSS étaient respectivement de 85% et 9% (354). Dans l'essai KEYNOTE 061, le taux de réponse dans les tumeurs MSI/dMMR était de 47% avec le pembrolizumab comparé à 17% avec la chimiothérapie. Cependant il faut noter que le nombre de patients MSI/dMMR est à chaque fois peu élevé, et qu'aucune étude spécifique pour les cancers gastriques MSI/dMMR n'a été réalisée. Comme toutes les tumeurs MSI/dMMR quelle que soit la localisation, le pembrolizumab et le nivolumab sont autorisés par la FDA dans les tumeurs MSI/dMMR, mais n'ont pas d'autorisation en France ou en Europe.

Un deuxième sous-groupe d'intérêt pourrait être les CG EBV. Dans l'étude KEYNOTE 059 tous les patients atteints de CG EBV (n = 6 ; 9,8%) avaient une réponse complète ou partielle (354). Ces résultats sont très encourageants et devront être validés de manière prospective à l'avenir sur une plus grande série de patients atteints d'un cancer gastrique avancé. La justification de cette efficacité potentielle de l'immunothérapie est probablement liée à la forte infiltration de cellules immunitaires tumorales dans un cancer gastrique à EBV comme précédemment décrit (cf chapitre cancers gastriques EBV). A noter, la valeur prédictive d'EBV pour l'efficacité du pembrolizumab était indépendante de la charge mutationnelle de la tumeur, et du niveau d'expression de PD-L1. Par ailleurs, les cancers EBV et MSI sont mutuellement exclusifs. Des essais sont en cours dans cette population spécifique de CG EBV (NCT02488759).

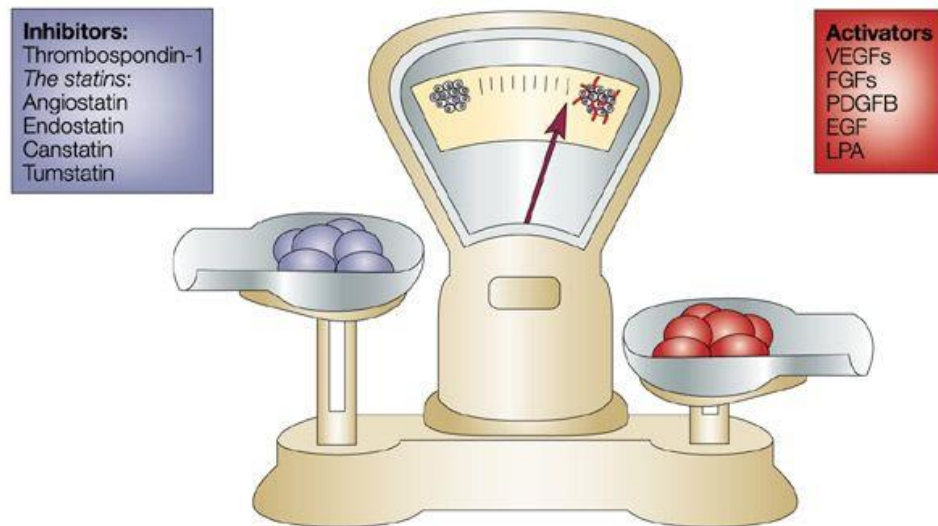
Chapitre 3 : Angiogenèse et immunité

1- L'angiogenèse

1.1-Angiogenèse physiologique et angiogenèse tumorale

L'angiogenèse désigne le processus de formation de nouveaux vaisseaux. L'angiogenèse physiologique est essentiel pendant la période d'embryogénèse et dans les processus de cicatrisation.

Le point sur lequel diffère les processus d'angiogenèse physiologique et pathologique est la régulation de l'équilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques (**Figure 1**). Tandis que les vaisseaux physiologiques acquièrent rapidement un phénotype stable, un excès de facteurs pro-angiogéniques dans le microenvironnement tumoral conduit à des vaisseaux tumoraux qui ne parviennent pas à cet état de quiescence, irréguliers, immatures, désorganisés et perméables.



Nature Reviews | Cancer

Figure 12 : Balance entre facteurs pro- et anti-angiogéniques dans le cancer

Bergers et al. Nature Reviews Cancer volume 3, pages 401–410 (2003)

La formation des vaisseaux tumoraux résulte de l'aboutissement de deux processus : l'angiogenèse, c'est à dire la naissance de néo-vaisseaux à partir de vaisseaux existants, et la vasculogenèse, similaire au processus embryonnaire, qui permet la création de néo-vaisseaux à partir de progéniteurs endothéliaux. Dans ce dernier processus, les cellules précurseurs endothéliales sont mobilisées à partir de la moelle osseuse et transportées dans le sang pour être incorporées aux parois des vaisseaux sanguins en croissance (Rafii Gene Ther 2002). Il est à noter que la vasculogenèse reste très minoritaire dans le processus de néo-vascularisation tumorale comparativement à l'angiogenèse.

1.2 - Axe VEGF-A/ VEGFR

Bien que le Fibroblast Growth Factor (FGF) ait été le premier à être découvert, le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) avec comme chef de file le VEGF-A, s'impose comme le régulateur-clé de l'angiogenèse (355).

La famille du VEGF

Six protéines de la famille VEGF ont été décrites : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, -VEGF-D, VEGF-E et PlGF (facteur de croissance placentaire). Les VEGF sont principalement des polypeptides homodimères antiparallèles, bien que des hétérodimères de VEGF-A et PlGF ont également été décrits (Di Salvo et Thomas, 1995).

Le VEGF est un mitogène puissant et spécifique pour les cellules endothéliales des artères, veines et vaisseaux lymphatiques.

Le VEGF-A

Le VEGF-A est le plus étudié, et le régulateur clé de l'angiogenèse. Il a un poids moléculaire d'environ 45 kDa (356). Le VEGF-A induit l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*. (357,358). VEGF-A induit l'expression de l'activateur du plasminogène (PA) et de son inhibiteur (PAI-1) (359), ainsi que celle de la collagénase interstitielle dans les cellules endothéliales (360).

La production de collagénase et de PA favorisent la création d'un environnement «prodégradatif» qui permet aux cellules endothéliales de migrer et de «germer» dans la matrice extracellulaire (sprouting). À l'inverse, PAI-1 est un régulateur négatif de la protéolyse. La morphogenèse normale des vaisseaux (vasculogenèse), comprenant l'établissement des cellules endothéliales et la formation de la lumière capillaire, nécessite un équilibre strictement contrôlé entre les protéases et les inhibiteurs de protéase (359). VEGF-A est également appelé facteur de perméabilité vasculaire pour sa capacité à augmenter la perméabilité microvasculaire, une étape nécessaire dans le processus angiogénique à la fois dans les tumeurs et dans les processus de cicatrisation des plaies (361). VEGF-A peut également induire la formation de fenestrations dans les cellules endothéliales (362).

Enfin, le VEGF-A peut se lier directement aux cellules tumorales de manière autocrine et favoriser la croissance tumorale et la motilité indépendamment de l'angiogenèse (363–365).

Les taux sériques de VEGF-A sont élevés chez les patients cancéreux (366), et le VEGF-A peuvent être produits par des cellules tumorales de différents types (367).

Les isoformes du VEGF-A et leurs particularités

Le gène du VEGF-A humain est composé de huit exons séparés par sept introns. Neuf isoformes de VEGF-A ont été décrites (VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF162, VEGF165, VEGF165b, VEGF183, VEGF189 et VEGF206), résultant d'un épissage alternatif de l'ARN (368). Le VEGF165 est l'isoforme prédominante chez l'homme et est communément connu comme VEGF-A. Les propriétés angiogéniques des isoformes du VEGF-A sont différentes: par exemple, VEGF165b est une forme inhibitrice endogène de VEGF-A (369). Les isoformes du VEGF-A varient également dans leur capacité de diffusion et leur capacité à lier le sulfate d'héparane dans la matrice extracellulaire et la neuropiline (NRP) à la surface des cellules (370).

Production de VEGF-A

Les VEGF, en particulier le VEGF-A, sont produit par différents types de cellules, dont les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules tumorales et le stroma tumoral (356,371,372). Le VEGF-A reste principalement lié à la surface cellulaire et à la matrice extracellulaire. Il peut être libéré par l'héparine ou l'héparinase, ou par clivage protéolytique des isoformes les plus longues par la plasmine (373) ou l'urokinase (374), générant un fragment soluble actif biologiquement (375). Mais le VEGF-A peut également être sécrété.

La production et la libération de VEGF, notamment de VEGF-A, sont régulés par des facteurs variés tels que l'hypoxie et par des oncoprotéines telles que l'Epidermal Growth Factor (EGF) et K-ras (376,377).

Le facteur de transcription HIF-1 joue un rôle clé dans la signalisation de l'hypoxie. HIF-1-alpha et HIF-1-beta sont tous deux constitutivement produits, mais HIF-1-alpha est dégradé dans un environnement normoxique. Lorsque le volume de la tumeur dépasse le volume critique de plusieurs millimètres cubes, cela entraîne une hypoxie. Dans cet environnement hypoxique HIF-1-alpha n'est pas dégradé mais forme un complexe avec HIF-1-beta. Ce complexe induit ainsi la transcription de plusieurs gènes, dont le VEGF (378).

Le VEGF-A est également régulé au niveau post-transcriptionnel. Levy et al. ont montré un rôle crucial de la protéine HuR liant l'ARN, membre de la famille des protéines apparentées à Elav, pour la stabilisation de l'ARNm du VEGF-A dans des conditions hypoxiques (379). La protéine poly(A)-binding protein-interacting protein 2 (PAIP2) interagit également avec l'ARNm du VEGF-A comme un co-régulateur de sa stabilisation dans des situations hypoxiques (380).

Les récepteurs du VEGF (VEGFR)

Le VEGF peut agir de manière paracrine sur les cellules endothéliales adjacentes, mais également dans un processus autocrine, afin d'assurer l'homéostasie de la cellule endothéliale (381). Les fonctions biologiques du VEGF sont médiées par des récepteurs tyrosine-kinase de haute affinité. Structurellement, les VEGFR ont sept domaines extracellulaires immunoglobuline-like (IgG-like), un unique domaine transmembranaire, et une portion intracellulaire qui contient le domaine tyrosine kinase.

Les VEGF peuvent se lier et activer trois types de récepteurs : VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Flk1/KDR, et VEGFR-3. L'isoforme VEGF₁₆₅ se lie également à la neuropiline (NRP) 1 qui peut agir comme un corécepteur spécifique pour la transduction du signal de VEGFR-1 et 2 (382–384). Les VEGFR sont indispensables pour la vasculogenèse embryonnaire et physiologique, la lymphangiogenèse, ainsi que pour l'angiogenèse pathologique.

VEGFR-1 est un récepteur de VEGF-A, VEGF-B, et PlGF. Il est exprimé par différents types cellulaires incluant les cellules endothéliales, les macrophages, les monocytes (385) et les cellules souches hématopoïétiques (386).

VEGFR-1 semble jouer un double rôle, en contrôlant négativement la formation vasculaire pendant le développement précoce, et en contrôlant positivement l'angiogenèse pathologique chez l'adulte. En effet, il a une plus haute affinité pour le VEGF-A que VEGFR-2 (356) mais une activité kinase plus faible. Cette caractéristique empêche le VEGF-A de se lier massivement au VEGFR2, ce qui régule indirectement l'action de ce dernier, et peut donc aboutir dans certaines conditions à une régulation négative de l'angiogenèse. En effet la délétion homozygote de VEGFR-1 chez la souris entraîne une croissance excessive et désorganisée du réseau vasculaire, létale au stade embryonnaire (387). VEGFR-1 est aussi impliqué dans la migration des cellules endothéliales (388).

VEGFR-2 est un récepteur du VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, et VEGF-E. VEGFR-2 est exprimé par les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques, et par d'autres types cellulaires tels que les mégacaryocytes et les cellules souches hématopoïétiques (389). Il est le principal récepteur responsable de la transduction des effets pro-angiogéniques du VEGF-A. Sa liaison avec le VEGF-A induit une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant notamment à la prolifération, la migration et la survie cellulaire. Il est également impliqué dans

la lymphangiogenèse (390). VEGFR-2 est ainsi le récepteur clé de l'angiogenèse physiologique comme de l'angiogenèse pathologique, en particulier dans les phénomènes de switch angiogénique et de néoangiogenèse tumorale. La signalisation du VEGFR-2 est requise pour la différenciation et la prolifération des précurseurs des cellules endothéliales (391).

VEGFR-3 est le récepteur clé de la lymphangiogenèse (392). Le signal médié par VEGFR-3 semble également jouer un rôle dans l'immunité adaptative, en régulant le recrutement de CPA (393).

Rôles physiologiques du VEGFA

Le rôle de l'axe VEGF-A/VEGFR est bien connu (394). VEGF-A est impliqué dans le développement embryonnaire et post-natal précoce (395,396). Il joue également un rôle important dans la cicatrisation. En effet, après une agression, le VEGF-A est produit par les plaquettes activées, et permet le recrutement des neutrophiles et des monocytes circulants, la perméabilité des cellules endothéliales, et induit la prolifération et la migration des cellules endothéliales (361). Le VEGF-A est aussi impliqué dans la croissance osseuse. En effet, il contrôle la formation des vaisseaux sanguins qui permet de coordonner la résorption du cartilage et la formation de l'os (397). Enfin, en conditions physiologiques, le VEGF-A induit également la formation de nouveaux capillaires requis au niveau du tractus reproductif chez la femme pour la fonction lutéale lors du cycle reproductif (398).

Rôles pathologiques du VEGF-A

Le VEGF-A est impliqué dans plusieurs pathologies non tumorales comme la polyarthrite rhumatoïde, le diabète, les rétinopathies ischémiques et le psoriasis (399). Il est également requis pour la néoangiogenèse tumorale, une étape critique de la croissance et de la survie tumorale. Au-delà d'un volume de 2-3mm³, le manque d'oxygène et de nutriments dans la tumeur induit la production de facteurs pro-angiogéniques, médié par HIF-1 comme vu ci-dessus. Il s'agit du switch angiogénique. Cela résulte en la création de nouveaux vaisseaux tumoraux, qui vont faciliter la croissance tumorale et la dissémination métastatique (400).

De nombreuses études ont montré une corrélation entre la surexpression de VEGF et un plus mauvais pronostic dans des tumeurs solides comme les cancers (401), les cancers pulmonaires non à petites cellules (402), et les hépatocarcinomes avancés (403).

1.3-Les axes alternatifs de l'angiogenèse.

Outre le VEGF-A, d'autres facteurs pro-angiogéniques sont impliqués dans l'angiogenèse tumorale, tels que l'angiopoétine-2 (ANG2) ou le Placental Growth Factor (PlGF). Ils peuvent être à l'origine de signaux de survie et permettre la résistance des vaisseaux sanguins immatures aux anti-VEGF-A.

PlGF/VEGFR-1

Le PlGF, autre membre de la famille VEGF, a été identifié à l'origine dans le placenta ce qui lui a valu son nom (404,405). Il s'agit d'une protéine homodimérique dont il existe 4 isoformes chez l'homme, le PlGF 1 et 2 étant les principaux. Seul le PlGF 2 existe cependant chez la souris. Les complexes homodimères PlGF fixent VEGFR-1, mais pas VEGFR-2, à la différence du VEGF-A (406). De plus, les isoformes PlGF 2 et 4 se fixent également sur les corécepteurs NRP-1 et 2 (407). Le PlGF n'est pas un acteur clé de l'angiogenèse physiologique, et en particulier il n'empêche pas, dans des modèles murins souris Knock-out pour le PlGF, un développement normal (408). Cependant, le PlGF est régulé positivement par l'hypoxie et exerce divers rôles non redondants dans des conditions de stress, telles que la cicatrisation des plaies, et dans des conditions pathologiques telles que l'ischémie tissulaire, les maladies oculaires, les sepsis, les maladies inflammatoires et les cancers (409). Les interactions entre PlGF et VEGF-A en situation tumorale sont complexes. En effet, si l'activation de la voie PlGF/VEGFR-1 a été montré comme une voie ayant une activité pro-angiogénique *in vitro* (408,410) et dans certains processus pathologiques, son activité pro-angiogénique peut aussi être indirectement contrôlée ? par le VEGF-A. En effet, la compétition entre VEGF-A et PlGF pour la fixation au VEGFR-1 permet de libérer le VEGF-A, alors disponible pour activer la voie du VEGFR-2. A l'inverse, le PlGF peut aussi entraîner une régulation négative de l'angiogenèse via un contrôle indirect de l'axe VEGF-A/VEGFR-2. La formation d'hétérodimères VEGF-A/PlGF pourrait être à l'origine d'une consommation du VEGF-A, empêchant alors la formation d'homodimères VEGF-A/VEGF-A biologiquement plus actifs (411-414). Le rôle du PlGF sur l'angiogenèse pourrait dépendre ainsi de la présence en excès de VEGF-A ou non, et de leur coexistence spatiotemporelle (fig 13). : la voie PlGF/VEGFR-1 pourrait être une voie régulatrice négative de l'angiogenèse en présence de VEGF-A, mais

aurait au contraire une activité pro-angiogénique en cas de déficience en VEGF-A, et pourrait être ainsi impliquée dans la résistance aux thérapies ciblant le VEGF-A/VEGFR-2.

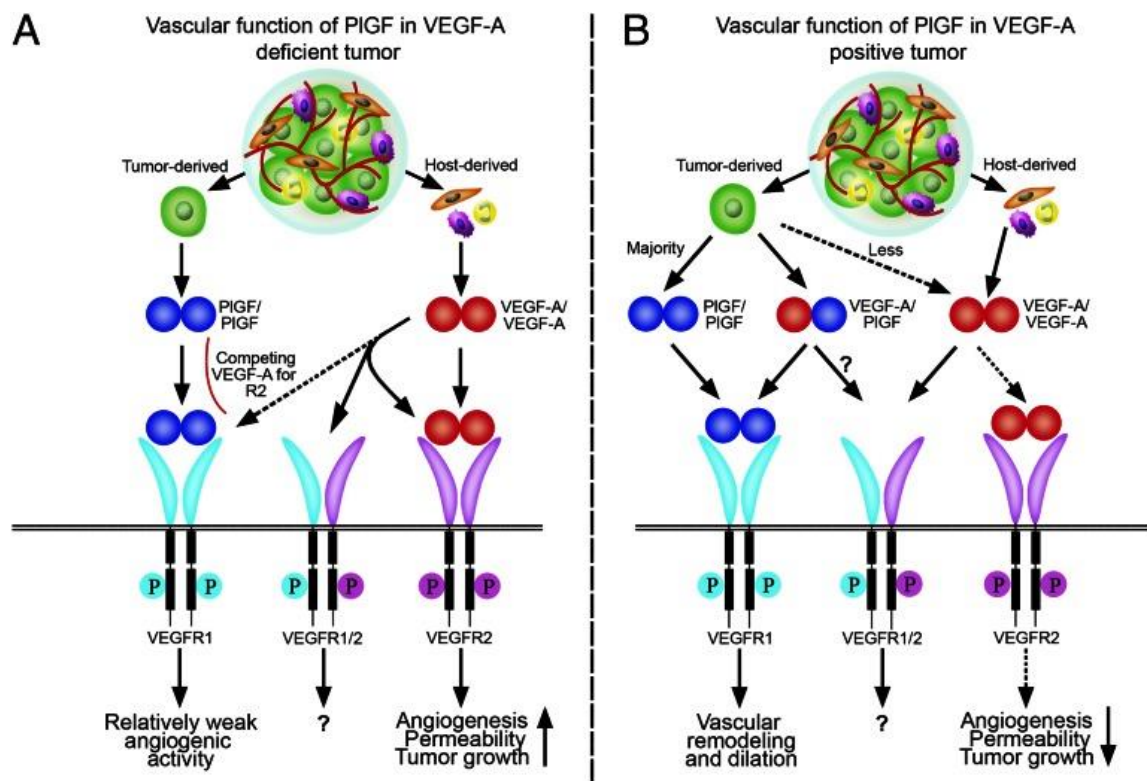


Figure 13 : Interactions entre PlGF/VEGFR-1 et VEGF-A/VEGFR-2

D'après Yang et al Proc Natl Acad Sci U S A 2013

Une interaction entre les récepteurs VEGFR-1/VEGFR-2 a également été suggérée via deux mécanismes. D'une part, la formation d'hétérodimères VEGFR-1/VEGFR-2 a été suggérée, potentiellement récepteur pour les hétérodimères PlGF/VEGF-A, et dont l'activité du signal sur l'angiogenèse est inconnue. D'autre part, le VEGFR-1 activé peut réguler positivement le VEGFR-2 et donc l'angiogenèse par transphosphorylation (415), ce qui pourrait constituer un autre mécanisme d'échappement, cette fois-ci sur le versant intracellulaire, aux traitements ciblant le VEGF-A/VEGFR-2.

Le rôle de PlGF/VEGFR-1 comme voie d'échappement aux traitements anti-VEGF-A/VEGFR-2 dans le cancer est appuyé par plusieurs observations chez l'homme ou dans des modèles murins. Tout d'abord, lors de traitement ciblant cet axe, une augmentation du PlGF a été observée (409). Ensuite, l'efficacité de traitements dirigés contre PlGF a été montrée dans des modèles murins résistants au blocage de VEGFR-2 (416,417).

Angiopoïétine 1 et 2

L'angiogenèse peut aussi être régulée par la voie Angiopoïétine (1 et 2)/Tie-2, indépendante de la voie du VEGF. L'Angiopoïétine 1 est exprimée constitutivement dans de nombreux tissus et est requise pour l'homéostasie de la vascularisation normale, alors que l'Angiopoïétine 2 est principalement exprimée lors de mécanismes de remodelage vasculaire et dans des environnements hypoxiques (418,419). L'Angiopoïétine 2 joue un rôle critique et complémentaire du VEGF dans la maturation des vaisseaux à un stade tardif de leur formation. Un taux sérique élevé d'Angiopoïétine 2 a été associé à un mauvais pronostic dans les cancers du poumon (420).

Le Fibroblast Growth Factor

La FGF constitue en fait une famille d'une vingtaine de molécules. Il existe également 4 récepteurs FGFR. L'axe FGF2-FGFR1 est la principale voie de signalisation impliquée dans l'angiogenèse par plusieurs mécanismes. Il peut induire l'expression du VEGF par les cellules endothéliales et stromales ; il stimule l'expression du PDGFR- β par les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires, les rendant plus sensibles au PDGF-BB et participant à la stabilisation du vaisseau sanguin ; il joue également un rôle dans l'artériogenèse en stimulant l'expression de la chimiokine MCP-1/CCL2 et du VEGF par les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. Le FGF2 favorise la migration des cellules endothéliales in vitro. De plus, il est capable d'induire la synthèse de collagène, de fibronectine et de protéoglycanes par les cellules endothéliales, et est donc central dans le remodelage de la matrice extracellulaire au cours de l'angiogenèse (421).

Platelet Derivative Growth Factor

Le facteur de croissance PDGF est, aussi, impliqué dans la maturation de l'angiogenèse qui a pour but de reconstituer la membrane basale autour des nouveaux capillaires et de leur assurer une enveloppe péricytaire.

La famille du PDGF est composée de 4 membres sécrétés, les PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C et PDGF-D. Ils sont actifs sous formes d'homodimères ou d'hétérodimères (PDGF-AB).

Le PDGF transmet des signaux via deux récepteurs, PDGFR α et PDGFR β , et induit une angiogénèse en régulant positivement la production de VEGF et en modulant la prolifération et le recrutement de cellules périvasculaires (422).

Dans les modèles knock-out, il a été montré le rôle critique de l'axe PDGF-B/PDGFR β dans l'établissement de vaisseaux sanguins fonctionnels pour le recrutement et la stabilisation de cellules périvasculaires (423).

Hepatocyte Growth Factor

L'Hepatocyte Growth Factor (HGF) est également un facteur pro-angiogénique important. L'HGF et son récepteur c-met, sont augmentés dans de nombreux types de tumeur, incluant les cancers du sein, les cancers urothéliaux et les gliomes, et leur expression est corrélée avec la densité de la vascularisation tumorale (424). En effet, la liaison de l'HGF à son récepteur MET participe à l'angiogénèse par plusieurs mécanismes, principalement indirects comme l'induction du VEGF ou d'autres facteurs pro-angiogéniques (425–427), mais également directement en agissant sur les cellules endothéliales (424,428,429).

1.4-Synthèse : Le processus d'angiogénèse tumorale

L'initiation de l'angiogénèse tumorale (**Figure 14**) résulte d'un switch angiogénique secondaire à la sécrétion par les cellules tumorales de facteurs pro-angiogéniques pouvant être induite en réponse à l'hypoxie ou être liée à des modifications génétiques au sein des cellules tumorales (430). Cette « commutation » angiogénique assure le détachement périvasculaire et la dilatation des vaisseaux. La membrane basale vasculaire et la matrice extracellulaire sont dégradées localement pour permettre aux cellules endothéliales sous-jacentes de migrer dans l'espace périvasculaire vers les stimuli angiogéniques chimiotactiques. Puis, la germination des vaisseaux a lieu à partir de cellules endothéliales spécialisées appelées cellules de front ou « tip-cells » qui vont migrer selon le gradient de facteurs pro-angiogéniques afin d'amorcer la formation du tube endothélial.

Au cours de l'angiogenèse physiologique, les colonnes de migration mènent à une zone de différenciation, dans laquelle les cellules endothéliales changent de forme et adhèrent les unes aux autres pour former une lumière : ces colonnes sont alors constituées de cellules endothéliales appelées cellules de soutien ou « stalk-cells ». Des mécanismes permettant la stabilisation des vaisseaux nouvellement formés se mettent en place : sur les « tip-cells », le VEGF stimule la sécrétion de Dll4 (Delta-like 4) qui lie le récepteur NOTCH-1 des « stalk-cells », ce qui régule négativement l'expression du VEGFR2 à leur surface rendant ces dernières moins sensibles au VEGF. De plus, le PDGF β stimule l'attachement de péricytes, réduit la prolifération et également la sensibilité à l'action angiogénique du VEGF-A (431).

Au cours du processus tumoral en revanche, la formation de vaisseaux sanguins se poursuit tant que la tumeur se développe, résultant d'une production continue de facteurs pro-angiogéniques, déséquilibrant la balance entre facteurs pro et anti-angiogéniques. Dans ce contexte, l'association déficiente des péricytes sur les vaisseaux tumoraux peut expliquer en partie le diamètre anormal des néo-vaisseaux.

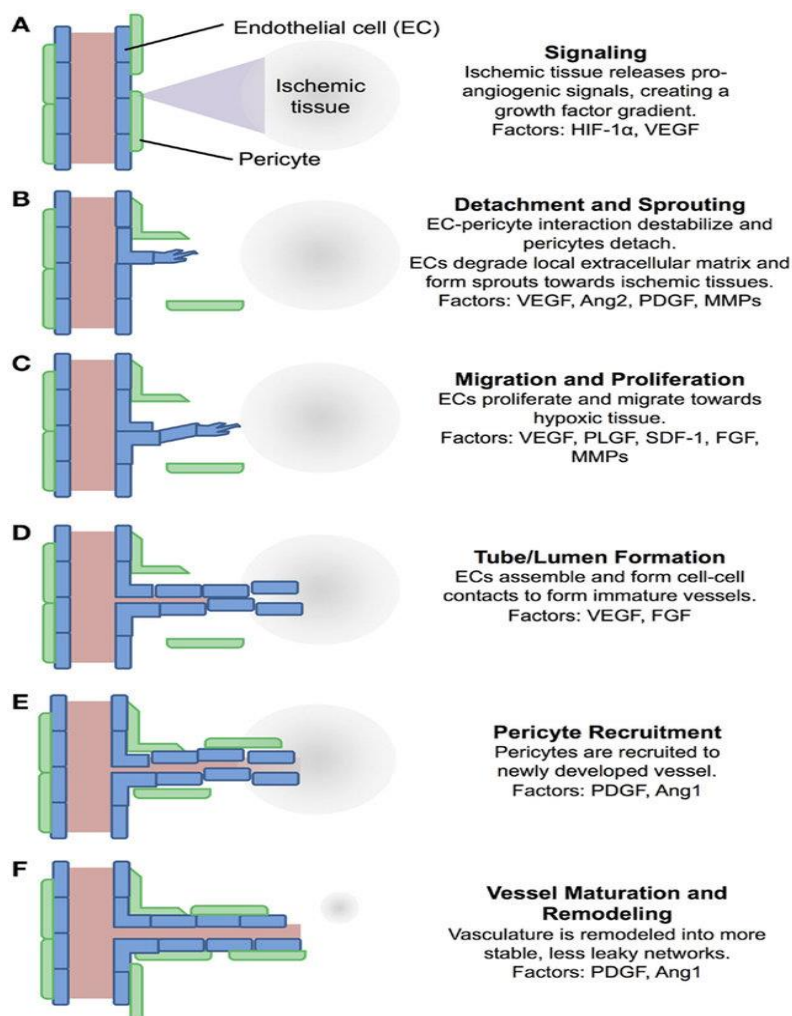


Figure 14: le processus d'angiogenèse

D'après : Van Hove A. et al; Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 3(102)

2-Effets immunitaires des facteurs de l'angiogenèse

L'angiogenèse, principalement contrôlée par le VEGF, et l'immunosuppression anti-tumorale interagissent à plusieurs niveaux. Les facteurs pro-angiogéniques peuvent induire par un effet direct ou indirect plusieurs mécanismes immunosuppresseurs.

2.1-Effet du VEGF sur le microenvironnement tumoral

Inhibition de la maturation des cellules dendritiques

Dans des modèles murins, l'administration continue de VEGF réduit le nombre de DC matures dans la rate, les ganglions, et le sang périphérique (432). De même, chez les patients atteints de cancer, le niveau sérique de VEGF-A est corrélé avec une diminution importante des DC matures et une augmentation de la proportion de DC immatures dans le sang périphérique (433,434). Chez ces patients, l'exérèse de la tumeur est associée à une diminution de ces DC immatures, suggérant que cette inhibition de la maturation est liée à des facteurs tumoraux (433). Il a depuis été montré que le VEGF-A jouait un rôle dans l'inhibition de cette maturation, via ses deux récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Le VEGF-A empêche l'activation du facteur de transcription nucléaire- κ B (NF- κ B) via la voie de signalisation de VEGFR-1, qui altère le processus de différenciation des DC (435–437), (Fig. 15). Dans un modèle *in vitro* de différenciation des DC myéloïdes à partir de cellules souches embryonnaires murines, exposées au VEGF-A, il a été montré que le VEGFR-1 inhibait les étapes tardives de maturation, tandis que la voie du VEGFR-2 altérait la différenciation des DC au stade des progéniteurs hématopoïétiques précoces(435).

L'interaction VEGF-A/VEGFR-2 bloque également les capacités d'allostimulation des DC (438). Enfin, Huang et al. ont observé que le VEGF-A à des taux équivalents à ceux retrouvés chez des patients atteints de cancer altérait les fonctions des DC pour la stimulation de cellules

T allogéniques, avec un mécanisme dépendant de VEGFR-1 et VEGFR-2, mais le blocage isolé de VEGFR-2 permettait de restaurer cette fonction dans ce modèle murin (439).

Accumulation de MDSC

Le VEGF-A induit également l'accumulation de MDSC en périphérie. En effet, dans un modèle murin, l'administration de VEGF-A entraînait l'augmentation des MDSC dans la rate et les ganglions de souris non porteuses de tumeurs (436). Chez l'humain, des taux plasmatiques de VEGF élevés chez des patients atteints de cancer ont été associés significativement au taux de MDSC (433,434,440). Cette accumulation de MDSC est dépendante de l'activation de la voie VEGF-A/VEGFR-2 (439).

Développement de macrophages induits par la tumeur

Le VEGF-A induit le recrutement de monocytes / macrophages dans la tumeur et favorise ainsi le développement de macrophages associés aux tumeurs (TAM) (441). Cependant, le VEGF-A seul n'est pas suffisant pour induire la polarisation M2 des macrophages : d'autres cytokines produites par les cellules tumorales, telles que IL-4 et IL-10, sont également nécessaires. En effet, l'inhibition du récepteur de l'IL-4 bloque *in vivo* la polarisation de M2, entraînant un phénotype tumoral moins agressif (442).

Accumulation de Treg

Une corrélation entre le pourcentage de Treg et la concentration de VEGF a été observé chez des patients atteints d'un cancer colorectal de stade IV et de mélanome, ce qui suggère un rôle du VEGF-A dans l'induction et / ou le maintien des Treg *in vivo* (443). Le VEGF-A peut favoriser indirectement l'accumulation de Treg par l'inhibition de la maturation des DC entraînant l'accumulation de DC immature, ou l'induction des MDSC, toutes deux tolérogènes (183,444). Par ailleurs l'hypoxie à l'origine de la production de VEGF peut entraîner l'expression de CCL28, qui favorise le recrutement de Treg (188,445).

Une population de Treg exprimant le VEGFR-2 a été identifiée chez des patients atteints de cancer (446).

En outre, la population spécifique de cellules FOXP3 + VEGFR2 + dans les tumeurs est un marqueur prédictif indépendant de la récurrence et de la pauvreté globale et survie sans maladie chez les patients atteints de cancer colorectal opéré (Suzuki et Katano, 2013).

Les Treg intratumoraux sont également régulés par l'activation de NRP1, le corécepteur du VEGFR, par le VEGF (447).

Inhibition des Cellules T effectrices

Il a été observé chez la souris que le VEGF-A entraînait une diminution du nombre de cellules T dans la rate de souris non porteuses de tumeurs, et entraînait également une suppression de leurs fonctions (436). L'effet suppressif du VEGF-A sur les cellules T effectrices passe par plusieurs mécanismes, comme l'inhibition de la différenciation thymique des progéniteurs en CD4⁺ et CD8⁺ (448), et la diminution de la prolifération des cellules T effectrices et de leur effet cytotoxique (449).

Plus récemment, nous avons montré que le VEGF-A favorisait l'exhaustion des cellules T CD8⁺ associé à la modulation de leur expression des molécules co-inhibitrices PD-1, Tim-3, CTLA-4 et Lag-3, induite par le VEGF-A, via l'activation de la voie de signalisation VEGFR-2 / NFAT (450).

2.2-Effets immunitaires des autres facteurs pro-angiogéniques

Angiopoietine 2 et immunité

Ang-2 est une cytokine autocrine produite par les cellules endothéliales, qui agit comme antagoniste du signal Ang-1/Tie-2. Tie-2 est également exprimé par une sous population de cellules myéloïdes circulantes et intratumorales appelés les TIE2-expressing monocytes/macrophages (TEMs). Ces TEMs peuvent avoir un effet immunosuppresseur indirect sur les cellules T. Stimulés par l'Ang-2, elles produisent de l'IL-10, et cette production d'IL-10 entraîne une inhibition de l'activation des cellules T effectrices et une induction de Treg (451–453). Ang-2 induit également le recrutement de neutrophiles, et leur conversion en macrophages de type M2-like.

Effet du PlGF sur l'immunité anti-tumorale

S'ils sont moins bien décrits que pour le VEGF-A, le PlGF et la voie PlGF/VEGFR-1 ont également des effets immunomodulateurs.

Le signal PlGF/VEGFR-1 entraîne le recrutement et la polarisation des macrophages associés à la tumeur (TAM), en faveur des TAM de type M2-like, plutôt pro-tumoraux (122,410,454–457). Il a également été montré que le PlGF pouvait inhiber la maturation des DC, via la voie de signalisation NF- κ B, et résultant en une inhibition de la réponse Th1, par un mécanisme indépendant du VEGFR-2 (458). Enfin, une sous-population de cellules T CD4⁺ exprimant fortement le VEGFR-1, et ayant une activité régulatrice aussi efficace que les Treg a été décrite. Cette population CD4⁺VEGFR1^{high} jouerait un rôle dans l'homéostasie digestive et pourrait être impliquée dans la survenue de maladies inflammatoires du tube digestif. Le PlGF pourrait ainsi activer cette population (459). Leur rôle en pathologie tumorale n'est pas décrit. Enfin, le PlGF pourrait aussi promouvoir la prolifération de Breg TGF- β ⁺ favorisant la croissance tumorale, comme cela a été suggéré dans les gliomes (460). Le PlGF peut ainsi avoir plusieurs effets à l'origine d'une régulation de nombreux acteurs immunitaire comme représenté dans la figure ci-dessous.

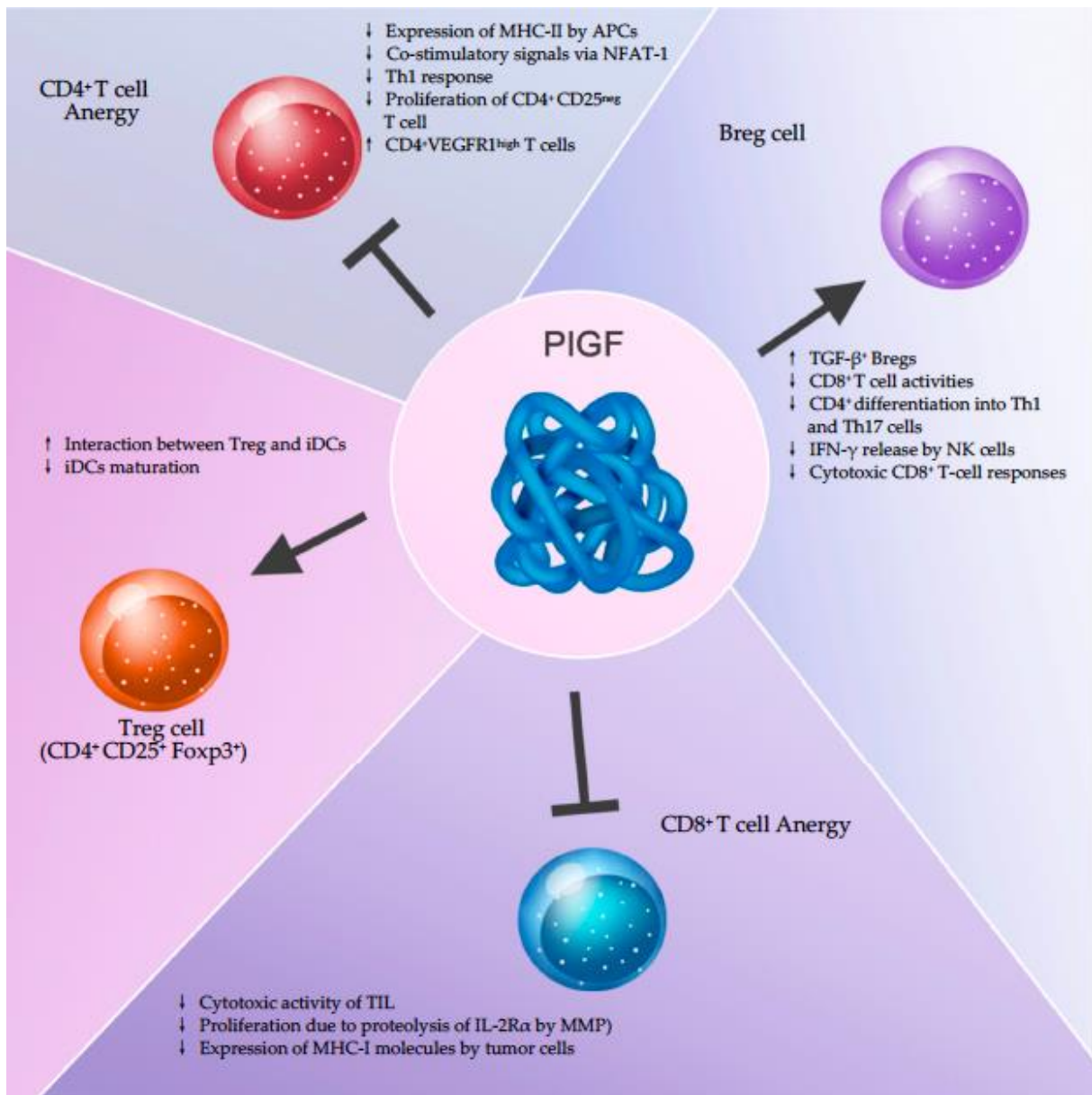


Figure 15 : effets immunologiques du PIGF

D'après Albonici et al *Int J Mol Sci.* 2019 (461)

3 -Les anti-angiogéniques dans les cancers digestifs

3.1- Les traitements anti-angiogéniques : généralités

Considérant les propriétés pro-tumorales de l'angiogenèse, plusieurs molécules anti-angiogéniques, ciblant en particulier le VEGF, ont été développés pour restaurer la balance entre facteurs pro et anti-angiogéniques. L'administration d'inhibiteurs du VEGF-A ou du

VEGFR réduisent en effet la vascularisation et inhibent la croissance tumorale dans des modèles murins (462–464) et chez des patients atteints de cancer (465). Chez l'homme, la preuve de l'effet d'un anti-angiogénique sur la survie des patients a été observée initialement chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique traités par l'addition d'un anticorps monoclonal anti-VEGFA (bevacizumab) à une chimiothérapie cytotoxique standard de 1^{ère} ligne (466).

3 classes de molécules anti-angiogéniques ciblant la voie VEGF-A/VEGFR ont été depuis développées :

1. les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) ciblant le VEGFR et d'autres récepteurs pro-angiogéniques. Parmi ces molécules, on retrouve le sorafenib, le regorafenib, et le sunitinib ; Ils ciblent les récepteurs sur leur versant intracellulaire.
2. Les anticorps monoclonaux ciblant le VEGF-A (bevacizumab) ou le VEGFR-2 (ramucirumab)
3. Le « VEGF-Trap », protéines de fusion chimérique composée des domaines extracellulaires de VEGFR-1 et VEGFR-2, piégeant le VEGF-A mais aussi le VEGF-B et le PlGF (aflibercept)

Les anti-angiogéniques font maintenant partie des traitements de routines qui ont montré une efficacité dans un grand nombre de tumeur.

Le sunitinib qui cible VEGFR1–3, PDGFR, c-kit, and Flt3 (467) a été approuvé dans un grand nombre de tumeurs comme les tumeurs stromales gastro-intestinales (468) et les carcinomes rénaux à cellules claires (469). Le sorafenib cible les VEGFR1, 2 et 3, PDGFR, c-kit, Raf-kinases, et RET (470). Il constitue un traitement standard pour les carcinomes hépatocellulaires avancés (471) et les carcinomes rénaux à cellules claires (472).

Au contraire des TKI, multicibles, le bevacizumab cible lui spécifiquement le VEGF-A. Il a prouvé son efficacité dans un grand nombre de tumeur dont les cancers du sein (473), et du poumon (474,475), combiné avec des chimiothérapies cytotoxiques standards. Mais il a initialement été développé dans le cancer colorectal.

L'aflibercept est une protéine de fusion possédant un spectre large de cibles moléculaires circulantes incluant le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A, le VEGF-B, le Placental Growth Factor (PlGF), contrairement au bevacizumab dont l'action inhibitrice est restreinte au VEGF-A. L'aflibercept est utilisé dans le CRC métastatique et a montré son efficacité en 2^e

ligne de traitement, en association avec une chimiothérapie par folfiri, après échec d'une première ligne par Folfox associé ou non au bevacizumab.

3.2- Anti-angiogéniques et cancer colorectal.

Dans le CCR, il a été démontré qu'une surexpression du VEGF était retrouvée dans 37 à 100% des cas (476) et corrélée à l'invasion cellulaire et à la densité vasculaire d'une part, ainsi qu'au développement des métastases et au pronostic oncologique d'autre part (477–482). Il a ensuite été démontré que l'administration d'anticorps anti-VEGF dans des modèles murins de xénogreffes de tumeurs colorectales humaines inhibait la croissance tumorale (483). Sur la base de ces données, l'utilisation de traitements anti-angiogéniques dans le CCR a été développé.

Les agents anti-angiogéniques sont administrés en routine chez les patients atteints de CCRm en combinaison avec une chimiothérapie et ce depuis que le bevacizumab a montré une augmentation significative des paramètres de survie en première ligne de traitement (466,477,484–486). Dans deux essais principaux, la survie sans progression (SSP) était améliorée de 1,4 à 4,4 mois et la survie globale (SG) était améliorée de 1,4 à 4,7 mois, respectivement avec une polychimiothérapie associant 5-FU et oxaliplatine (FOLFOX) ou 5-FU et irinotécan (FOLFIRI). Le bénéfice du bevacizumab a également été montré en deuxième ligne chez les patients naïfs de traitement anti-angiogénique (487,488) avec un gain de 2,6 mois en SSP et de 2,1 mois en SG dans l'étude ECOG E3200. Plus récemment, l'essai TML a montré que le bevacizumab améliorait de 1,4 mois la SG des patients qui avait déjà reçu en première ligne, faisant émerger l'intérêt de maintenir une thérapie anti-angiogénique au-delà de la progression en ne modifiant que la chimiothérapie cytotoxique associée (489). D'autres molécules anti-angiogéniques ont montré un avantage significatif en seconde ligne. Par exemple, deux essais de phase III testaient pour l'un le ramucirumab, un anticorps monoclonal anti-VEGFR2, et pour l'autre l'aflibercept, tous deux combinés au 5-FlouroUracile (5-FU) et à l'irinotécan (FOLFIRI). Ces deux AA étaient combinés au 5-FlouroUracile (5-FU) et à l'irinotécan (FOLFIRI) et ont tous les deux démontré un avantage en survie (SSP et SG) comparativement au FOLFIRI seul. Ce bénéfice était retrouvé que les patients aient précédemment été traités par bevacizumab ou non (490,491). Ainsi, le maintien de la pression anti-angiogénique exercée par l'inhibition du VEGF, en changeant de chimiothérapie, permet

d'améliorer la survie. Cela a également été observé dans d'autres types de tumeur, comme les cancers du sein métastatiques ou les cancers pulmonaires non à petites cellules. Concernant l'aflibercept en deuxième ligne, une autre hypothèse pour expliquer l'efficacité chez les patients initialement prétraités par bevacizumab. Il a été suggéré que le spectre d'action plus large ciblant également le PlGF pourrait permettre de contourner des mécanismes de résistance secondaire au bevacizumab. En effet la voie PlGF/VEGFR-1 est une potentielle voie de résistance aux anti-VEGF-A/VEGFR-2, comme vu précédemment (492). Cependant aucune donnée clinique ne permet d'étayer cette théorie, ces différentes thérapies n'ayant jamais été comparées dans ce contexte.

Les TKI ont également été développés dans le cancer colorectal. En particulier, le regorafenib a été approuvé il y a quelques années chez les patients chimio-réfractaires. L'essai CORRECT retrouvait un bénéfice du regorafenib chez les patients ayant progressé sous toutes les chimiothérapies standards, incluant des traitements anti-angiogéniques préalables (493).

3.3-Anti-angiogéniques et cancers gastriques

Les anti-angiogéniques ont pendant longtemps été mis en échec dans le cancer gastrique. En effet, le bevacizumab a rapidement été abandonné, devant l'absence de bénéfice en SG de son ajout à la chimiothérapie par 5FU-cisplatine en première ligne métastatique (494), et malgré un bénéfice retrouvé en SSP et taux de réponse.

Plus récemment cependant, un autre anti-angiogénique a réussi à démontrer un intérêt clinique dans le CG avancé. Le ramucirumab en monothérapie a démontré son efficacité sur la survie globale en seconde ligne métastatique, avec une SG médiane de 5,2 mois contre 3,8 mois (HR 0,77 ; IC 95 % 0,603-0,998 ; p = 0,047) (495). Le ramucirumab a également montré son efficacité en seconde ligne en association au paclitaxel dans une étude randomisée de phase III comparé au paclitaxel en monothérapie : survie médiane 9,6 contre 7,4 mois, p = 0,017 (496). Comme vu précédemment, la voie de signalisation c-MET/HGF peut être assimilée à une voie pro-angiogénique, par des effets directs et indirects. Dans le cancer de l'estomac en particulier, l'hyperexpression de c-Met est un facteur de mauvais pronostic. Deux anticorps ont été étudiés, le rilotumumab et l'onartuzumab dans les CG avancés. Malgré des études préliminaires encourageantes, cependant, plusieurs études ont montré l'absence de bénéfice des anticorps anti-c-Met (497–500).

4- Effets immunomodulateurs des anti-angiogéniques dans les modèles précliniques

Étant donné que le VEGF-A module l'immunité anti-tumorale, les effets immunologiques des traitements anti-angiogéniques ont été analysés dans des modèles murins et chez des patients atteints de cancer.

4.1- Maturation des cellules dendritiques.

Gabrilovich et al. ont observés que l'administration d'un anticorps anti-VEGF chez des souris porteuses de tumeur augmentait le nombre et la fonction des cellules dendritiques dans les ganglions et la rate (432). Alfaro et al. ont étudié les effets des anti-VEGF sur la différenciation des précurseurs myéloïdes humains en DC. Le VEGF altérait la différenciation des monocytes en DC. Le surnageant de lignée cellulaire de carcinome rénal cultivées en conditions hypoxique avait le même effet. Dans cette étude, le bevacizumab et le sorafenib, mais pas le sunitinib, permettaient de reverser cet effet et donc re rétablir la maturation des DC (501).

4.2- Diminution des MDSC

Dans un modèle de souris porteuses de tumeur, un traitement par sunitinib diminuait la proportion de MDSC de manière dose-dépendante dans la rate, la moelle osseuse et la tumeur, possiblement médié par l'inhibition de STAT-3 (502). De plus, le sunitinib permettait également de réduire les fonctions immunosuppressives des MDSC chez ces souris porteuses de tumeurs (503,504). Deux mécanismes ont été suggérés : d'une part, le sunitinib pourrait inhiber la prolifération des MDSC monocytiques ($Gr1^{low}$), et d'autre part, il pourrait induire l'apoptose des MDSC granulocytiques ($Gr1^{high}$) (505).

Le Sorafenib réduit également la proportion de MDSC dans des modèles animaux de cancer du foie (506). Enfin, dans un modèle de cancer rénal murin, un anticorps anti-VEGF réduisait le nombre de cellules myéloïdes $CD11b^{+}VEGFR1^{+}$ (507).

4.3- Diminution des Treg

Dans de nombreux modèles murins de tumeurs, il a été observé que le sunitinib et le sorafenib diminuait la proportion de Treg parmi les $LT\ CD4^{+}$, dans le sang, la rate et la tumeur (502,504,506). Plusieurs

mécanismes ont été suggérés pour expliquer cette diminution. L'inhibition de STAT3 par le sunitinib bloque la conversion des LT CD4⁺FOXP3⁻ en CD4⁺FOXP3⁺ (508). De plus la diminution des MDSC capable d'induire des Treg, entraîne indirectement une diminution de ces derniers. Dans un autre modèle, le sorafenib diminue les Treg à la fois en inhibant la prolifération, et en induisant leur apoptose. Le traitement par sorafenib altère également les fonctions suppressives des Treg in vivo (509).

4.4- Cellules T effectrices

L'augmentation de la proportion de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ parmi les TIL a été observée chez des souris traitées par sunitinib (504). Shrimali et al. ont également montré que, lors d'un transfert adoptif de cellules T anti-tumorales, un anti-VEGF/VEGFR-2 augmentait l'activité anti-tumorale des cellule T (510). De plus, dans une autre étude, l'administration d'un anticorps monoclonal anti-VEGFR-2 augmentait les cellules T CD8⁺ anti-tumorales spécifiques (511). L'augmentation de cette infiltration par les CD8 peut être expliquée en partie par la régulation de l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales, qui, dans le cadre d'un traitement anti-angiogénique, peut augmenter les interactions entre les leucocytes et la paroi vasculaire (512).

Le sunitinib prévient également l'anergie des cellules T, en stimulant la production d'IFN γ et l'activité cytolytique anti-tumorale (504).

En revanche, du fait de l'activité multicible de ces molécules, certains mécanismes immunosuppresseurs pourraient contrer ces effets. En particulier, l'inhibition de la voie Raf/MEK/ERK et de la phosphorylation de LCK par le sorafenib peut entraîner une inhibition de la prolifération et de l'activation des cellules T effectrices (513). Au contraire, dans un autre modèle de souris porteuses de tumeurs, un traitement par sorafenib augmentait la production d'IFN γ et l'activation des effecteurs T CD8⁺ (509).

Récemment, dans un modèle de cancer colorectal chez la souris (CT26), nous avons montré que le blocage de l'axe VEGF-A/VEGFR par un anticorps monoclonal ou par le sunitinib entraînait une diminution de l'expression des récepteurs co-inhibiteurs associés à une exhaustion des cellules T (PD-1, Tim-3, CTLA-4, Lag-3), et permettait de restaurer la production d'IFN γ par les TIL CD8⁺ (450).

5- Effets immunomodulateurs des anti-angiogéniques chez l'homme

5.1- Maturation des DC

Plusieurs études ont retrouvé des effets immunomodulateurs des anti-angiogéniques chez des patients atteints de cancers. Chez des patients atteints de cancer du poumon, du sein ou colorectaux, il a été observé que le bevacizumab permettait d'induire une augmentation des DC dans le sang périphérique, de restaurer leur maturation et d'induire la production de cytokines et les capacités d'allostimulation (434).

5.2- Diminution des MDSC

Chez des patients avec un cancer du rein, il a été observé que le sunitinib diminuait significativement le nombre de MDSC circulant (514). L'impact du bevacizumab sur les MDSC, en revanche, est moins clair. En effet, un faible nombre de MDSC ont été observé après traitement par bevacizumab chez des patients atteints de différents types de cancer, (434). Néanmoins, le bevacizumab ne réduisait pas les MDSC circulants chez des patients ayant un cancer du rein métastatique dans une autre étude (515). Ces résultats discordants peuvent être expliqués par la présence de plusieurs populations de MDSC régulées différemment par les anti-angiogéniques. En effet, dans la première étude, les MDSC étaient définis par un phénotype CD45⁺Lin⁻HLA-DR⁻ alors que la deuxième étude analysait les MDSC granulocytiques, caractérisés par l'expression de CD66b. Ces résultats suggèrent que le bevacizumab régule les MDSC ayant un phénotype immature mais pas les granulocytiques.

5.3- Diminution des Treg

Une diminution des taux de Treg circulants a été observé chez des patients avec un cancer colorectal métastatique (443). Cette diminution des Treg a cependant surtout été décrite principalement avec les TKI, comme avec le sorafenib, où une diminution des Treg infiltrant la tumeur et des Treg périphériques a été observé chez les patients traités pour un cancer du rein (516,517) ou un carcinome hépatocellulaire (518). Une étude in vitro de cellules T CD4⁺CD25^{high} humaines a montré que le sorafenib entraînait l'apoptose de ces cellules (519).

Le sunitinib réduit également le nombre de Treg dans le sang périphérique et les tumeurs de patients atteints de cancer du rein (520,521). Des études fonctionnelles suggèrent que l'activité suppressive des Treg est altérée après un traitement par sunitinib (520). Enfin, cette diminution est corrélée à la survie globale des patients (521).

5.4- Cellules T effectrices et réponses effectrices

Dans le cancer colorectal, il a été observé une augmentation des LT CD4⁺, CD8⁺ et CD3 circulants après un traitement par une chimiothérapie associée à du bevacizumab, ainsi qu'une augmentation de la production d'IL-2 et d'IFN γ (522,523).

In vitro, le sunitinib peut induire des réponses cytokiniques de type Th-1 et inhiber des réponses de type Th-2 (514,520), cet effet pouvant être médié en partie par les modulations des Treg et des MDSC précédemment décrites. En revanche, dans deux études chez des patients atteints de cancer du rein ou de carcinome hépatocellulaire, le sorafenib n'avait pas d'impact significatif sur la réponse Th-1.

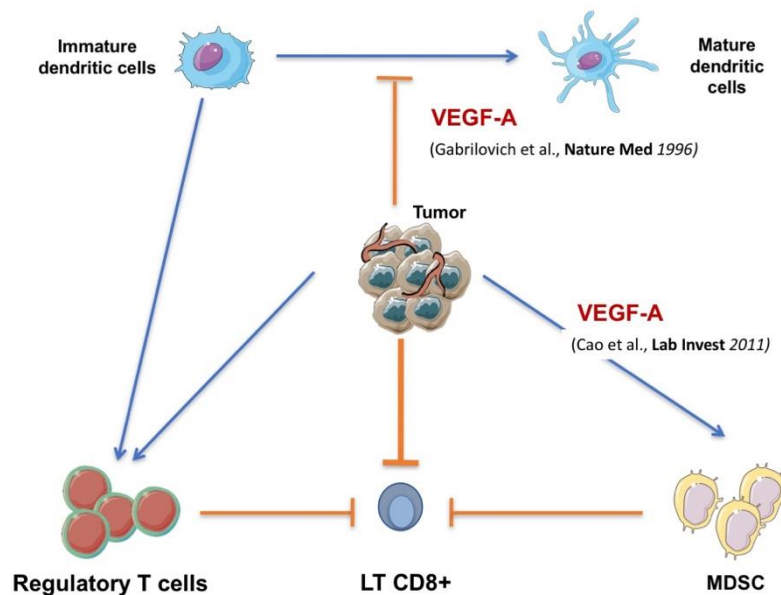


Figure 16 : Effets immunomodulateurs du VEGF-A

D'après Terme et al, oncoimmunology 2013

6-Combinaison angiogéniques

Immunothérapies/Anti-

Etant donné les effets immunomodulateurs observés avec les anti-angiogéniques, il a été supposé que les anti-angiogéniques pourraient optimiser l'efficacité des immunothérapies.

6.1- Données précliniques

Anti-angiogéniques et vaccins

Des anti-angiogéniques ont été combinées avec des stratégies de vaccination dans des modèles précliniques. Différentes stratégies anti-angiogéniques (Aflibercept, TKI ou anticorps monoclonaux) ont été associées à des vaccins antigéniques ou utilisant la cellule tumorale entière. Globalement, ces combinaisons permettaient une augmentation des TIL CD8⁺ et CD4⁺, une diminution des MDSC et des Treg, et améliorait l'effet anti-tumoral et la survie, comparé à l'utilisation seule de la vaccination ou de l'anti-angiogénique (504,524–530). Il faut noter dans certaines de ces études, en particulier pour la combinaison sunitinib et vaccination, que la séquence d'administration pouvait être importante. En effet, il semble que les effets immunomodulateurs du sunitinib soient constatés après 5 à 7 jours de traitements, et que l'immunothérapie doit idéalement être administrée à ce moment. Lorsqu'une vaccination était réalisée avant ou dès le début du sunitinib, il était observé dans ces études au contraire une diminution de l'activation des cellules T (527,531).

Anti-angiogéniques et thérapie cellulaire

Dans des modèles murins, un traitement par sunitinib ou par anti-VEGF permettait d'augmenter l'efficacité de DC pulsées, associé à un meilleur effet anti-tumoral (432,529,532). Un anti-VEGFR2 combiné à un transfert adoptif de LT anti-PMEL permettait dans un autre modèle d'augmenter les TIL et de ralentir la croissance tumorale (510). Enfin, le développement des CAR T cells a permis d'élaborer des LT porteurs d'un CAR ciblant VEGF, combinant ainsi le transfert adoptif de LT et le blocage du VEGF. In vitro, cela permettait de diminuer l'angiogenèse, et in vivo, un ralentissement de la croissance tumorale (533).

Anti-angiogéniques et inhibiteur des checkpoint immunitaires

Plusieurs groupes, dont le nôtre, ont combiné des anticorps monoclonaux anti-angiogéniques et des anticorps monoclonaux anti-checkpoint inhibiteur. Il était observé avec ces stratégies un ralentissement de la croissance tumorale, une augmentation des TIL, et une augmentation de la sécrétion de cytokines comme IFN γ (450,529,534–537).

Etudes précliniques de combinaison anti-angiogénique/immunothérapie

Immunotherapy	Antiangiogenic therapy	Tumour model	Key results	Ref
<i>Vaccination studies</i>				
Tumour-antigen-specific picornaviral vaccination	Aflibercept (VEGF trap)	Glioblastoma _{b,c}	Aflibercept normalizes tumour vasculature (reduces vessel permeability and diameter) Trend towards \uparrow CD8 ⁺ T cells Tumour progression \downarrow and animal survival \uparrow	renner neurotherapeutics 2016
Whole tumour cell vaccine (mitomycin treated and GM-CSF secreting)	DC101 (anti-mouse VEGFR2 mAb)	Breast cancer _{b,c,d}	CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells \uparrow MDSCs and T _{reg} cells \downarrow Tumour regression and animal survival \uparrow	Huang et Poznansky, 2012
Whole tumour cell vaccine (GM-CSF secreting)	Adenoviral-based expression of sVEGFR1 and sVEGFR2	Colon cancer _{c,d} Melanoma _{b,c}	CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells \uparrow MDSCs and T _{reg} cells \downarrow Animal survival \uparrow	Li Clin Cancer Res 2006
Pox virus vaccine expressing CEA and three co-stimulatory molecules	Sorafenib (VEGFR TKI)	Colon cancer _{c,d}	Intratumoural CD8 ⁺ T cells \uparrow and T _{reg} cells \downarrow MDSCs _f and T _{reg} cells _f \downarrow Tumour volume \downarrow Animal survival \uparrow	Farsaci Int J Cancer 2012
HER2-derived B cell epitope vaccine	VEGF peptide mimic (associated with antagonistic effects)	Breast cancer _c	Anticancer and antiangiogenic effects \uparrow Tumour growth \downarrow by combined	Foy Oncoimmunology 2012

			immunization with HER2 and VEGF peptides	
Whole tumour cell vaccine (irradiated) and CD86-IgG fusion protein	SU 6668 (VEGFR TKI)	Breast cancer _{c,d}	CD8+ T cells ↑ _(by immunohistochemistry only) Tumour growth ↓ _	Huang Cancer Res 2002
<i>Cell therapy studies</i>				
Anti-PMEL T cells, PMEL vaccine, and IL-2	DC101 (anti-VEGFR2 mAb) and B20 (anti-VEGF mAb)	Melanoma _{b,c}	Immune cell infiltration ↑ _ Tumour growth ↓ _ Animal survival ↑ _	Shrimali Cancer Res 2010
Anti-VEGFR1 chimeric antigen receptor T cells	NA	Lung cancer _{d,e}	Endothelial tube formation in vitro ↓ _ Tumour growth and metastasis ↓ _	Wang Gene Ther 2013
Tumour-associated peptide-pulsed DCs	Anti-VEGF mAb	Sarcoma _{c,d}	DC numbers and function ↑ _ Tumour growth ↓ _	Gabrilovich Clin Cancer Res 1999
<i>Immune checkpoint blockade studies</i>				
Anti-PD-1 mAb (clone RMP1-14; 10 mg/kg three times per week)	Vanucizumab	Breast cancer _{b,c} Melanoma _{b,c} Pancreatic cancer _{b,c} Neuroendocrine cancer _{b,c}	Tumour growth ↓ _ Animal survival ↑ _	schmittnaegel sci transl med 2017
Anti-PD-1 mAb (clone RMP1-14; 0.25 mg every other day)	DC101	Colon cancer _{c,d}	Angiogenesis ↓ T cell infiltration ↑ _ Cytokine expression ↑ _	Yasuda Clin Exp Immunol 2013
Anti-PD-1 mAb (clone RMP1-14; 0.25 mg twice per week)	DC101	Colon cancer _{c,d}	PD-1 ⁺ CD8 ⁺ T cells ↓ _ Anticancer activity ↑ _	Voron J Exp Med 2015
Anti-PD-L1 mAb (clone 10F.9G2; 10 mg/kg twice per week)	DC101	Pancreatic cancer _{b,c} Breast cancer _{b,c} Glioblastoma _{b,c}	IFN γ -expressing CD8 ⁺ and IFN γ -expressing CD4 ⁺ T cells ↑ _ PD-L1 expression on relapsing tumour cells ↑ _ Vessel normalization ↑ _by PD-L1	Allen Sci Transl Med 2017

			blockade and formation of HEVs ↑_via LTβR	
Anti-PD-L1 antibody (10F.9G2; 5 mg/kg twice per week)	CVX-060 (ANG2-specific peptide-antibody fusion protein) ± sunitinib or regorafenib (both VEGFR TKIs) or CVX-241 (bi-specific ANG2-VEGF-binding peptide-antibody fusion protein)	Multiple orthotopic human tumour xenografts _{b,e} and syngeneic mouse tumour models _{b,c}	Tumour growth and metastatic progression ↓_with combined inhibition of ANG2 and VEGF signalling (with or without immune-checkpoint blockade)	Wu Cancer Res 2016

Tableau 1 : combinaisons anti-angiogéniques/immunothérapies en préclinique

D'après Fukumura Nat Rev clin oncol 2018

6.2- Données cliniques

Combinaison anti-CTLA-4 et anti-angiogéniques

Une première étude de phase I a été menée dans les mélanomes avancés, combinant ipilimumab et bevacizumab, montrant une activité encourageante, avec un taux de réponse de 19.6%, un taux de contrôle de la maladie de 67.4% et une survie globale médiane de 25 mois. Il était observé dans cette étude, sur l'analyse de biopsies faites après traitement, une infiltration plus marquée en LT et en cellules CD163⁺ (monocytes/macrophages) que chez les patients traités par ipilimumab seul (538), mais également dans le sang périphérique, où le taux de CD4⁺ et CD8⁺CD45RO⁺ était significativement plus élevé. Une étude randomisée de phase II est en cours (NCT01950390).

Combinaison PD-1/PD-L1 et anti-angiogénique

Cancers non colorectaux

Plusieurs études ont analysé la combinaison d'un anti-PD-1 ou un anti-PD-L1 avec un anti-angiogénique. La combinaison la plus étudiée est celle associant le bevacizumab à l'atezolizumab (anti-PD-L1). Cette combinaison a été testée dans le cancer du rein (539). Elle permettait un taux de réponse de 32% et une survie sans progression médiane de 11,7, plus élevé qu'avec l'atezolizumab seul (25% et 6,1 mois) ou au sunitinib, anti-angiogénique standard dans le cancer du rein (29% 8,4 mois). Chez les patients ayant une tumeur avec surexpression de PD-L1, la SSP médiane atteignait 14,7 mois avec l'association. De plus, grâce à une analyse des profils d'expression de ces tumeurs, 3 signatures géniques étaient identifiées : la signature « angiogenèse », la signature « effecteurs immunitaires préexistants » et la signature

« inflammation myéloïde immunosuppressive ». Les auteurs montraient que si l'atezolizumab permettait une meilleure efficacité dans les tumeurs avec « immunité préexistante », la combinaison bevacizumab et atezolizumab montrait une meilleure efficacité dans les tumeurs « immunosuppressive », soulignant le rôle de l'anti-VEGF pour moduler diminuer l'immunosuppression, susceptibles de transformer des tumeurs « froides » en tumeurs « chaudes ».

La même combinaison a été testée dans le cancer du poumon non à petites cellules, associée à la chimiothérapie et comparée au bevacizumab + chimiothérapie ou atezolizumab + chimiothérapie (540). La combinaison bevacizumab + atezolizumab augmentait significativement la SG et la SSP. Encore un fois, les sous-groupes habituellement moins sensibles à l'immunothérapie, (PD-L1 faible à négatif, ou d'expression immunosuppressive) avaient également un bénéfice de la combinaison.

Chez des patients ayant un carcinome hépatocellulaire, la combinaison atezolizumab + bevacizumab est également prometteuse, avec un taux de réponse de 36% et une SSP améliorée par rapport à l'atezolizumab seul (5.6 vs 3.4 mo, HR 0.55, 80% CI, 0.40 – 0.74, P = 0.0108) (Lee M. ESMO 2019), lui permettant d'obtenir un statut de « breakthrough therapy » par la FDA, afin d'accélérer le développement dans cette indication. Une étude de phase III est donc en cours, comparé au standard le sorafenib (NCT03434379).

Cette combinaison est actuellement en cours d'étude dans d'autres localisations, comme les cancers du col de l'utérus, de l'endomètre, les glioblastomes et les cancers du pancréas.

Depuis cette première combinaison, d'autres combinaison ont été également rapportées. Dans le cancer du rein, les combinaison axitinib + pembrolizumab et axitinib + avelumab, chacune comparées au standard en vigueur à ce moment, le sunitinib, permettaient une amélioration de la SSP, de la SG et un doublement du taux de réponse, quelle que soit l'expression de PD-L1 (541,542). Les combinaisons nivolumab + sunitinib ou pazopanib montraient des résultats similaires aux précédents en terme de taux de réponse, mais leur développement n'est pas poursuivi, en raison d'une toxicité trop importante (543).

Dans le carcinome hépatocellulaire, d'autres combinaisons ont également été testées avec des taux de réponse encourageant, comme l'association pembrolizumab + lenvatinib, ou encore SHR1210 (anti-PD-1) et apatinib (544,545), et plusieurs études de phases III sont en cours dans cette indication NCT03713593 ; NCT03439891).

Cancers colorectaux MSS/pMMR

A la suite de ces observations, il a donc été suggéré que les anti-angiogéniques pouvaient améliorer l'immunogénicité des tumeurs « froides » pour induire un microenvironnement tumoral favorable à l'efficacité de l'immunothérapie. Comme vu précédemment, les cancers colorectaux MSS/pMMR sont globalement des cancers non répondeurs à l'immunothérapie. Des études de combinaison anti-angiogéniques + immunothérapies ont donc été réalisées dans cette indication. L'association bevacizumab + atezolizumab a récemment été rapportée au congrès de l'ESMO 2018. (313,546). Dans cette étude, la combinaison atezolizumab + bevacizumab + chimiothérapie par 5FU, était comparée au 5FU + bevacizumab, en traitement d'entretien après une chimiothérapie d'induction standard pour u CCRm. Dans cette étude ayant inclus près de 450 patients, l'ajout de l'atezolizumab n'avait cependant strictement aucun effet sur la SSP ou la SG (HR = 0,92, p = 0,48), dans cette étude ou la grande majorité des patients avaient une tumeur MSS/pMMR. Il était noté qu'une seule réponse complète était observée, chez un patient MSI/dMMR. Cette étude montre que malgré u rationnel biologique fort et les résultats encourageants des association anti-PD-L1 et anti-angiogéniques dans d'autres localisations, le traitement par immunothérapie dans les cancers colorectaux non MSH-H/dMMR reste un challenge non résolu.

Objectifs de la thèse

Les anti-angiogéniques et les ICI ont permis d'améliorer notablement la survie des patients atteints de nombreux types de cancers. Cependant, dans les cancers de l'épithélium glandulaire digestif comme le cancer colorectal et le cancer gastrique, ces deux classes thérapeutiques se heurtent à certaines limites d'efficacité.

Dans les CCRm, bien que le bevacizumab fasse partie des traitements standards de première ligne, son efficacité est cependant à relativiser. En effet, si un gain en survie globale a été observé dans l'étude pivot concernant l'ajout du bevacizumab à la chimiothérapie comparée à la chimiothérapie seule, aucune des études comparatives ultérieures (NO16966, ITACA, AVEX n'a confirmé ce gain. En parallèle, dans le cancer gastrique avancé, le bevacizumab n'est jamais parvenu à démontrer un intérêt dans la prise en charge, mais récemment le ramucirumab a démontré une efficacité en deuxième ligne, suggérant que les anti-angiogéniques pourraient tout de même avoir une place dans ces tumeurs.

Plus récemment, en dépit de l'engouement médiatique pour cette nouvelle classe thérapeutique, les ICI n'ont jamais montré d'efficacité dans le cancer colorectal, en dehors des formes MSI/dMMR, tandis que les données d'efficacité dans le cancer gastrique sont discordantes et, au mieux, ne montrent une efficacité que dans une faible proportion des patients, qu'on ne sait pour le moment pas bien sélectionner.

En sus, ces traitements ne sont pas dénués d'effets secondaires et représentent un coût important en termes de santé publique.

Considérant cette efficacité limitée, deux stratégies pourraient permettre d'améliorer l'index thérapeutique de ces molécules : i) l'identification de facteurs prédictifs d'efficacité ou de formes anatomo-cliniques plus sensibles, ii) la combinaison de stratégies potentiellement synergiques.

Mon travail de thèse s'inscrit donc dans ce contexte, visant à améliorer la stratégie thérapeutique globale des patients atteints de CCRm ou de CG avancé, en considérant les effets immunomodulateurs liés aux anti-angiogéniques précédemment décrits.

Mon travail est divisé en 2 parties : la première analyse la modulation des Treg par les anti-angiogéniques, et les mécanismes de cette modulation, dans le cancer colorectal métastatique.

La deuxième étudie différents paramètres de l'immunité locale et systémique dans le cancer gastrique métastatique.

Les objectifs de ce travail étaient :

- pour la première partie :

- d'étudier la modulation des Treg et les mécanismes impliqués lors d'un blocage de la voie VEGF-A/VEGFR-2

- d'analyser la modulation des Treg par des anti-angiogéniques ayant une action sur d'autres voies que le VEGF-A, en particulier l'aflibercept impliquant le PlGF/VEGFR-1

- d'étudier spécifiquement la régulation des Treg Th1-like par l'aflibercept

- pour la seconde partie :

- d'analyser le microenvironnement immunitaire et les cellules immunitaires circulantes comme facteur pronostique dans les cancers gastriques métastatiques

-d'associer les paramètres immunologiques (infiltration des tumeurs et cellules circulantes dont les Treg) aux différents types anatomopathologiques d'adénocarcinome gastrique, afin d'identifier des formes plus immunogènes.

Résultats

Partie I : Mécanismes régulateurs induits par le VEGF et les anti-VEGF dans le cancer colorectal

I.1 Mécanisme de régulation directe des Treg par la voie VEGF-A/VEGFR-2 et les anti-VEGF-A

Article 1

VEGFA-VEGFR Pathway Blockade Inhibits Tumor-Induced Regulatory T-cell Proliferation in Colorectal Cancer

Magali Terme, Simon Pernet, Elie Marcheteau, Federico Sandoval, Nadine Benhamouda, Oriane Colussi, Olivier Dubreuil, Antoine F. Carpentier, Eric Tartour, and Julien Taieb

Contexte

L'échappement au système immunitaire joue un rôle dans la survenue et la progression du cancer colorectal. Parmi les mécanismes impliqués, l'accumulation de Treg a été observée dans le sang périphérique et l'infiltrat tumoral de patients atteints de cancers, est corrélé avec un stade plus avancé, et est généralement associé à un plus mauvais pronostic. Les Treg inhibent la réponse immunitaire anti-tumorale naturelle mais peuvent également inhiber la réponse immunitaire induite par les ICI. A l'inverse, dans des modèles murins, la déplétion en Treg permet un rejet anti-tumoral, une activation des cellules T CD4⁺ et CD8⁺, et une amélioration de la réponse immunitaire induite par la vaccination.

Les molécules anti-angiogéniques sont habituellement utilisées en première ou seconde ligne de traitement chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique. Ces molécules ont un impact sur les mécanismes immunosuppresseurs induits par la tumeur.

Des travaux menés dans notre équipe, ainsi que ceux d'autres équipes, ont récemment montré que la proportion de lymphocytes T régulateurs était diminuée après traitement par sunitinib chez la souris et les patients atteints de cancer du rein métastatique. Cependant, le Sunitinib est

un inhibiteur de tyrosine kinase (TKI) multi-cible spécifique des récepteurs de VEGF, PDGF, SCF, Flt3-L, et les voies de signalisation impliquées dans l'immunomodulation induite par les molécules anti-angiogéniques ne sont pas identifiées.

L'objectif de ce travail a été d'étudier spécifiquement le rôle du blocage de la voie VEGF-VEGFR dans ces phénomènes immunitaires dans un modèle murin et chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique.

Patients et méthodes

Modèle murin : Nous avons administré soit du Sunitinib soit un anticorps monoclonal spécifique anti-VEGFA (orthologue murin du bevacizumab) à des souris porteuses d'une tumeur colorectale (modèle CT26). La lignée a été sélectionnée pour deux raisons : l'efficacité du traitement par ces molécules dans ce modèle, ainsi que l'utilisation du bevacizumab chez les patients atteints de cancers colorectaux. Les Treg ont été analysés après traitement par cytométrie de flux. Leur fonction et leur prolifération ont également été analysées.

Patients : Les Treg ont également été analysés dans le sang périphérique de patients atteints de cancer colorectal métastatique, avant et après traitement par chimiothérapie + bevacizumab ou par chimiothérapie seule (contrôle) en 1ère ligne. Les patients inclus dans cette étude étaient traités selon le choix de l'investigateur.

Principaux résultats

- Le blocage de la voie VEGF-A/VEGFR inhibe l'accumulation des Treg

Dans le modèle tumoral CT26, le pourcentage de Treg (CD25⁺FOXP3⁺) parmi les LT CD4⁺ est significativement augmenté dans la rate des souris porteuses de tumeurs. Le pourcentage et le nombre absolu de Treg sont significativement diminué dans les rates et les tumeurs après traitement par sunitinib, mais également après administration d'anti-VEGF-A, comparés à leur contrôle respectif (souris traitées par DMSO ou sérum de souris respectivement). En revanche, un traitement par masitinib, un TKI proche du sunitinib inhibant c-kit, PDGFR, Fak-kinases mais pas VEGFR, n'entraîne pas de diminution des Treg. Ainsi, l'inhibition de la voie VEGF-A/VEGFR est suffisante pour permettre la diminution des Treg.

- L'administration de bevacizumab diminue le taux de Treg dans le sang périphérique de patients atteints de cancer colorectal métastatique

Chez les patients atteints de CCRm avant traitement, le pourcentage de Treg parmi les LT CD4⁺ est augmenté comparé à des volontaires sains. Après traitement par 2 cycles de bevacizumab

associé à la chimiothérapie, ce pourcentage diminue significativement, alors que cette diminution n'est pas observée chez les patients traités par chimiothérapie seule.

- Le blocage de la voie VEGF-A/VEGFR n'impacte pas la fonction des Treg

Des Treg purifiés issus de la rate de souris porteuses de tumeurs ont été mis en coculture avec des LT CD4⁺ conventionnels (CD25⁻) activés. Les Treg de souris traitées par sunitinib ou anti-VEGF-A conservent leur capacité d'inhiber la prolifération des cellules T conventionnelles et la sécrétion d'IFN γ comparé aux Treg de souris non traitées.

- Le VEGF-A induit la prolifération des Treg, et le blocage de VEGF-A/VEGFR inhibe cette prolifération

La prolifération des Treg, mesuré par le Ki67 ou par l'injection de BrdUrd, est augmenté chez les souris porteuses de tumeurs, en particulier les Treg CD44^{high}. Après traitement par anti-VEGF-A ou sunitinib, cette prolifération est diminuée. Parallèlement, la prolifération des CD4⁺ conventionnels n'est pas diminuée. In vitro, le VEGF-A augmente la prolifération de Treg stimulés par anti-CD3/IL2.

Chez les patients atteints de CCRm, la prolifération des Treg est diminué après 2 cycles de bevacizumab + chimiothérapie, mais pas par la chimiothérapie seule.

- L'inhibition de la prolifération des Treg implique le VEGFR-2 exprimé par les Treg

L'expression de VEGFR-1 et VEGFR-2 sur les Treg est significativement augmenté dans les rates de souris porteuses de tumeurs, comparé à des souris naïves. Le traitement par anti-VEGFR-2, mais pas par anti-VEGFR-1, diminue la proportion des Treg et leur prolifération.

Conclusion

La plupart des tumeurs secrètent du VEGF-A. Ce travail montre que l'axe VEGF-A/VEGFR-2 induit de façon directe la prolifération des Treg, et participe donc à l'accumulation des Treg dans les tumeurs et en périphérie, favorisant l'immunosuppression. Les anticorps anti-VEGF-A permettent de diminuer cette prolifération.

En parallèle, des travaux réalisés dans notre groupe ont également mis en évidence que l'axe VEGF-A/VEGFR-2 participait à l'épuisement des cellules T CD8⁺ (Voron et al, annexe 1).

La compréhension de ces mécanismes permet de suggérer l'intérêt de combinaisons thérapeutiques associant inhibition de VEGF-A/VEGFR2 et stratégies d'immunothérapie. Enfin, dans ce travail, nous n'avons pas pu corréliser cet effet immunomodulateur sur les Treg à la survie des patients traités par bevacizumab, car peu de patients étaient inclus. On peut penser que le taux initial de Treg et/ou la modulation à J28 de ce taux pourrait être un marqueur précoce

de l'efficacité du bevacizumab et pourrait servir de biomarqueur prédictif d'efficacité des anti-angiogéniques.

VEGFA-VEGFR Pathway Blockade Inhibits Tumor-Induced Regulatory T-cell Proliferation in Colorectal Cancer

Magali Terme¹, Simon Pernot¹, Elie Marcheteau¹, Federico Sandoval¹, Nadine Benhamouda^{1,2}, Orianne Colussi¹, Olivier Dubreuil³, Antoine F. Carpentier⁴, Eric Tartour^{1,2}, and Julien Taieb^{1,3}

Abstract

Multitarget antiangiogenic tyrosine kinase inhibitors (TKI) have been shown to reduce regulatory T cells (Treg) in tumor-bearing animals and patients with metastatic renal carcinomas. However, a direct role of the VEGF-A/VEGFR pathway inhibition in this phenomenon is a matter of debate and molecular mechanisms leading to Treg modulation in this setting have not been explored to date. Treg proportion, number, and proliferation were analyzed by flow cytometry in peripheral blood of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with bevacizumab, a monoclonal antibody targeting specifically VEGF-A, and in colon cancer-bearing mice (CT26) treated with drugs targeting the VEGF/VEGFR axis. The direct impact of VEGF-A on Treg induction was assessed together with specific blockade of different isoforms of VEGFRs that may be involved. In CT26-bearing mice, anti-VEGF antibody and sunitinib treatments reduced Treg but masitinib, a TKI not targeting VEGFR, did not. Targeting VEGF-A/VEGFR axis seems sufficient to affect Treg percentages, without any changes in their function. Similarly, bevacizumab inhibited Treg accumulation in peripheral blood of patients with mCRCs. *In vitro*, Treg expressing VEGFR from tumor-bearing mice directly proliferated in response to VEGF-A. Anti-VEGF-A treatment decreased Treg proliferation in mice as well as in patients with mCRCs. VEGFR-2- but not VEGFR-1-specific blockade led to the same results. We identified a novel mechanism of tumor escape by which VEGF-A directly triggers Treg proliferation. This proliferation is inhibited by VEGF-A/VEGFR-2 blockade. Anti-VEGF-A therapies also have immunologic effects that may be used with a therapeutic goal in the future. *Cancer Res*; 73(2); 539–49. ©2012 AACR.

Introduction

More than 1 million new cases of colorectal cancer (CRC) are diagnosed each year worldwide. Disease-specific mortality has decreased significantly in the past 2 decades with the introduction of new chemotherapeutic agents such as oxaliplatin and irinotecan, and, more recently, targeted therapies such as bevacizumab, an anti-VEGF-A monoclonal antibody (1).

The immune system seems to play a role in both the occurrence and the progression of CRCs. Elevated numbers of intratumoral cytotoxic and memory T cells (CD8⁺ and CD45RO⁺, respectively) have been shown to correlate with

an aggressive phenotype reflected by tumor microinvasive status (2). This infiltration may also be a major predictor of tumor recurrence and patient survival (3). The association between CD45RO⁺ cell infiltration and overall survival has been confirmed in stage I to IV CRCs (4). Tumors can subvert the immune system, however, notably by inducing immunoregulatory cells such as regulatory T cells (Treg).

Tregs, characterized by CD4, CD25, and Foxp3 expression, inhibit the development of an effective immune response especially against cancer or infectious agents (5). In healthy individuals, they are able to prevent autoimmune disease. In patients with cancer, Tregs expand in peripheral blood and tumor tissue. Strong Treg infiltration of tumors is generally associated with poor clinical outcome (5). Elevated blood and tumor Treg numbers have also been described in CRCs. Although the prognostic impact of Treg in CRCs is still a matter of debate, elevated peritumoral numbers of Foxp3⁺ Treg cells are associated with advanced-stage tumors and poorer overall survival (6). In murine models of CRCs, systemic removal of Tregs using anti-CD25 antibody results in tumor rejection and in improved vaccine-induced anti-tumor T-cell responses (7). In addition, Treg depletion from peripheral blood of patients with CRCs unmasks CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses against tumor-associated antigens *in vitro* (8, 9). These observations suggest that Tregs could hamper the development of an effective antitumor immune response and that Treg modulation in patients with CRCs

Authors' Affiliations: ¹INSERM U970, PARCC (Paris Cardiovascular Research Center), Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité; ²Service d'immunologie biologique, Hôpital Européen Georges Pompidou; ³Service d'hépatogastroentérologie et d'oncologie digestive, Hôpital Européen Georges Pompidou, and ⁴Université Paris Descartes, Laboratoire de Recherches Biochirurgicales, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

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

M. Terme and S. Pernot contributed equally to this work.

Corresponding Author: Julien Taieb, Service d'Hépatogastro-entérologie et d'oncologie digestive, Hôpital Européen Georges Pompidou, 20 rue Leblanc, Paris 75015, France. Phone: 331-56-095042; Fax: 331-53-987952; E-mail: julien.taieb@egp.aphp.fr or jtaieb@club-internet.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2325

©2012 American Association for Cancer Research.

might boost antitumor immunity or the response to immunotherapy.

Recently, sunitinib, a multitarget tyrosine kinase inhibitor (TKI) that selectively blocks VEGF receptors 1, 2, and 3 (VEGFR-1, -2, -3), platelet-derived growth factor receptors α and β (PDGFR α and β), stem cell factor receptor (c-kit), and Flt3, has been shown to reduce Treg numbers in tumor-bearing mice and in patients with metastatic renal carcinoma (10–13). However, it is unclear whether (i) these observations are limited to patients with renal cancer and (ii) the effects of this multitarget molecule on Tregs result directly from VEGF-A/VEGFR axis inhibition or through another signaling mechanism. If an indirect action through VEGF-induced immature dendritic cells (DC) has been suggested (14, 15), the direct effect of VEGF-A on Treg has never been studied. Moreover, data on anti-VEGF-A therapy and Treg in patients with cancer are scarce and discordant (16, 17). Because bevacizumab has been approved for first- and second-line treatment of metastatic CRCs (mCRC; ref. 18), we analyzed the impact of specific VEGF-A/VEGFR blockade on Treg in a mouse model of CRCs and in patients with mCRCs and the potential direct effect of VEGF-A on tumor-induced Tregs.

Materials and Methods

Mice, tumors, and treatment

Six- to 8-week-old female Balb/c mice were purchased from Charles River Laboratories and kept in specific-pathogen-free conditions at the INSERM U970 animal facility. Experiments respected institutional guidelines and were approved by the Maisons-Alfort Veterinary School ethics committee. CT26, an *N*-nitroso-*N*-methylurethane-induced undifferentiated colon carcinoma cell line, was obtained from American Type Culture Collection. CT26 cells (2×10^5) were injected subcutaneously at day 0 in the right flank of Balb/c mice. Absence of mycoplasma was checked every 2 months, and cells were authenticated by their ability to grow in immunocompetent mice as described in the literature. Tumor growth was monitored twice a week using a caliper. Treatments were started when the tumors reached 9 to 10 mm². Sunitinib (SU11248, Sutent) and masitinib (4-(4-methylpiperazin-1-ylmethyl)-*N*-[4-methyl-3-(4-pyridin-3ylthiazol-2-ylamino) phenyl]benzamide-mesylate methanesulfonic acid salt) were given by oral gavage at 40 mg/kg daily and 30 mg/kg twice a day, respectively. Sunitinib and masitinib were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in PBS before administration. Control mice received DMSO diluted in PBS. In this study, masitinib was used as a negative control to probe the VEGFR inhibition of sunitinib. Masitinib is a highly selective TKI that targets a limited number of key kinases involved in various cancers and inflammatory diseases, including c-kit, PDGFR, and Lyn but not VEGFR (19). Masitinib is currently the most selective TKI in clinical development or already approved to date (20, 21). An anti-mouse VEGF-A antibody (B20-4.1.1) was administered intraperitoneally (i.p.) at 5 mg/kg twice a week. Anti-mouse VEGFR-1 (MF1) or anti-mouse VEGFR-2 (DC101) antibodies (800 μ g per mouse) were injected i.p. 3 times a week. Control mice received mouse serum. Sunitinib was kindly provided by Pfizer and anti-mouse VEGF antibody by Genentech (22), Masitinib by AB Science SA and anti-VEGFR-1 and anti-VEGFR-2 antibodies by ImClone.

Peripheral blood was obtained from patients with mCRCs receiving first-line bevacizumab plus chemotherapy or chemotherapy alone according to the referent physician's choice in the Gastroenterology Division of Georges Pompidou European Hospital (Paris, France) between March 2011 and March 2012. Blood was collected before the first treatment cycle (D0) and after the second cycle of treatment (D28). The study was approved by the local ethics committee, and all the patients gave their written informed consent before blood sampling. Patients exhibiting lymphopenia before the first cycle of treatment has been excluded. Clinical response has been evaluated according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST v1.1).

Patients

Peripheral blood was obtained from patients with mCRCs receiving first-line bevacizumab plus chemotherapy or chemotherapy alone according to the referent physician's choice in the Gastroenterology Division of Georges Pompidou European Hospital (Paris, France) between March 2011 and March 2012. Blood was collected before the first treatment cycle (D0) and after the second cycle of treatment (D28). The study was approved by the local ethics committee, and all the patients gave their written informed consent before blood sampling. Patients exhibiting lymphopenia before the first cycle of treatment has been excluded. Clinical response has been evaluated according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST v1.1).

Flow cytometry

Cell surface staining of murine splenocytes and tumor-infiltrating cells used anti-mouse CD4 (RM4-5; Biolegend), anti-mouse CD25 (PC61; eBioscience), anti-mouse VEGFR-2 (89B3A5; Biolegend), and anti-mouse VEGFR-1 (141522; R&D Systems). For human studies, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinized peripheral blood on Ficoll-Hypaque gradients, as previously described (12). PBMCs from patients with mCRCs were stained with anti-human CD4 (OKT4; Biolegend), anti-human CD25 (BC96; eBioscience), and anti-human CD127 (eBioRDR5; eBioscience). Intracellular stainings for Foxp3 (using anti-mouse and anti-human Foxp3; FJK-16 and PHC101, respectively; eBioscience) or Ki67 (B56; BD Biosciences) were conducted after fixation and permeabilization with the reagents of the Foxp3 staining set (eBioscience). Isotype controls were run in parallel. Dead cells were excluded by using the Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Kit (Invitrogen). Treg proportion was assessed for all patients, but Ki67 staining was conducted only on patients included after October 2011. Stained cells were analyzed with a LSRII cytofluorometer and FACS Diva (Becton Dickinson) and Flow-Jo Software (TreeStar).

Bromodeoxyuridine labeling

After the first anti-VEGF injection, mice received 1 mg of bromodeoxyuridine (BrdUrd) solution twice a day for 2 days. Two hours after the last BrdUrd injection, the mice were killed and the spleens removed. BrdUrd was detected by flow cytometry as previously described (23).

Analysis of Treg function

After 2 weeks of treatment with sunitinib or anti-VEGF, mice were killed and their spleens removed. Tregs were purified with the Regulatory T cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec). Purity of CD4⁺/CD25⁺ (Treg) and CD4⁺/CD25⁻ (Tconv) cells was typically above 95%. CD4⁺CD25⁺ T-cell suppressive function was studied as previously described (24). Briefly, 5×10^4 Tconvs were cultured with 1×10^5

irradiated CD4⁺-depleted splenocytes in the presence of anti-CD3 (145-2C11, 1 µg/mL). Tregs were added at different Treg/Tconv ratios (1:1, 1:5, 1:25). One µCi of ³H-thymidine was added for the last 18 hours. ³H-thymidine incorporation was analyzed using a β-scintillation counter (Perkin-Elmer).

VEGF-induced proliferation

Splenocytes from CT26 tumor-bearing mice were used. Tregs were isolated by using the Regulatory T cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) or cell sorting of CD4⁺CD25⁺ cells after CD4 enrichment (CD4⁺ T cell isolation kit II, Miltenyi Biotec). Purity after cell sorting was around 99%. Purified Tregs (5×10^4) were cultured in the presence of plate-bound anti-CD3 (10 µg/mL) and interleukin (IL)-2 (100 U/mL) for 4 days. Murine VEGF (Miltenyi Biotec) was added at 50 ng/mL. Treg proliferation was assessed by measuring ³H-thymidine incorporation during the last 18 hours of culture.

VEGF assay

VEGF serum concentrations in CT26 tumor-bearing mice and tumor-free mice were evaluated with an ELISA method (mouse VEGF DuoSet, R&D Systems). In humans, VEGF levels have been determined in plasma using an ELISA method (Human VEGF Quantikine Elisa kit, R&D systems).

Statistical analyses

Results are expressed as means ± SEM or ranges, as appropriate. The Mann-Whitney test was used to compare 2 groups. The Kruskal-Wallis test was used to compare 3 or more groups. The Wilcoxon-matched pairs test was used to analyze the effects of treatment between D0 and D28 in patients with mCRCs. Statistical significance was determined with Prism software (GraphPad Software, Inc). Significance was assumed at $P < 0.05$.

Results

VEGF-A/VEGFR pathway blockade is sufficient to inhibit Treg accumulation

We took advantage of a murine model of colorectal carcinoma to analyze the impact of specific VEGF-A/VEGFR blockade on modulation of Treg accumulation. CT26 tumor-bearing mice were treated with anti-VEGF-A antibody or different TKIs targeting or not VEGFR. In CT26 tumor-bearing mice, the percentage of Treg (CD25⁺/Foxp3⁺) among CD4⁺ T cells was significantly enhanced in the spleen (Fig. 1A and C) and tumor-draining lymph nodes (not shown). Treatment of CT26 tumor-bearing mice with DMSO or mouse serum did not modulate Treg percentages and numbers as compared with nontreated CT26 tumor-bearing mice (not shown). After 2 weeks of treatment, anti-VEGF-A treatment reduced the percentage and absolute number of Tregs in the spleen to physiologic levels (Fig. 1A and Supplementary Fig. S3A) and in tumor-draining lymph nodes (not shown). Anti-VEGF-A also decreased Treg percentage (not shown) and number in the tumor ($2,267 \pm 614$ Treg/mm² with mouse serum; 463 ± 88 Treg/mm² with anti-VEGF; Fig. 1B). This decrease was observed as early as 1

week after the beginning of the treatment but reached the statistical significance after 2 weeks and was maintained after 3 weeks (Supplementary Fig. S1). Sunitinib, a TKI targeting VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-kit, and Flt3, resulted in a similar decrease in Treg proportion and numbers in the spleen (Fig. 1C and not shown) and tumor ($2,262 \pm 462$ Treg/mm² with DMSO, 857 ± 173 Treg/mm² with sunitinib; Fig. 1D and not shown). Sunitinib and anti-VEGF induced strong antitumor effects in CT26 model (Supplementary Fig. S2A and S2B), but Treg modulation is not caused by the reduction of tumor size as no or only weak correlation between Treg percentage in spleens (Supplementary Fig. S2C and S2D) or tumors (Supplementary Fig. S2E and S2F) and tumor size has been observed. Interestingly, sunitinib or anti-VEGF did not decrease the absolute number of other cell populations including CD4⁺ T cells, CD4⁺ Foxp3⁻ T cells, or CD8⁺ T cells in spleens (Supplementary Fig. S3A-S3E) or tumors (Supplementary Fig. S4A-S4D). Thus, both anti-VEGF-A and sunitinib inhibited Treg accumulation in tumor-bearing mice without depleting other T-cell subsets.

To confirm that VEGF-A/VEGFR pathway inhibition impeded Treg accumulation in tumor-bearing mice, we used masitinib as a negative control, as it is a TKI close to sunitinib that targets c-kit, PDGFR, Fak-kinases but not VEGFR (19). Contrary to sunitinib and anti-VEGF-A, masitinib did not reduce Treg proportion or numbers in the spleen (Fig. 1E) or tumor (Fig. 1F).

Thus, specific VEGF-A/VEGFR(-1,-2) inhibition was sufficient to prevent tumor-induced Treg accumulation in animals spleens and tumors.

Bevacizumab reduces Treg proportion in peripheral blood of mCRC patients

To confirm that these observations were also relevant in human, we first quantified Tregs in peripheral blood of patients with mCRCs. As previously described (6), Treg percentages were higher in patients with mCRCs than in healthy volunteers (HV; Fig. 2A). This difference could not be related to age difference between healthy volunteers and patients with mCRCs (51.05 ± 13 and 66.7 ± 11.5 years old, respectively) as we and others have not observed an age-related effect on Treg proportion (ref. 6 and not shown). After 2 cycles of bevacizumab plus chemotherapy, blood Treg percentage was significantly reduced (day 0: 5.94 ± 0.5 vs. day 28: 4.14 ± 0.41 , $P = 0.0039$). As the standard first-line treatment for mCRC is chemotherapy, with or without bevacizumab, we were unable to study patients treated with bevacizumab alone. We thus studied patients treated with chemotherapy alone as controls. It is of note that no major differences between patients treated with chemotherapy associated with bevacizumab or chemotherapy alone have been observed (Supplementary Table S1). Interestingly, patients treated with 2 cycles of chemotherapy alone showed no significant decrease in their peripheral blood Treg percentages (day 0: 6.4 ± 1.09 vs. day 28: 5.85 ± 0.97 , $P = 0.19$), suggesting that the decrease observed in patients treated with chemotherapy plus bevacizumab was due to bevacizumab (Fig. 2B and C). Chemotherapy alone or associated with

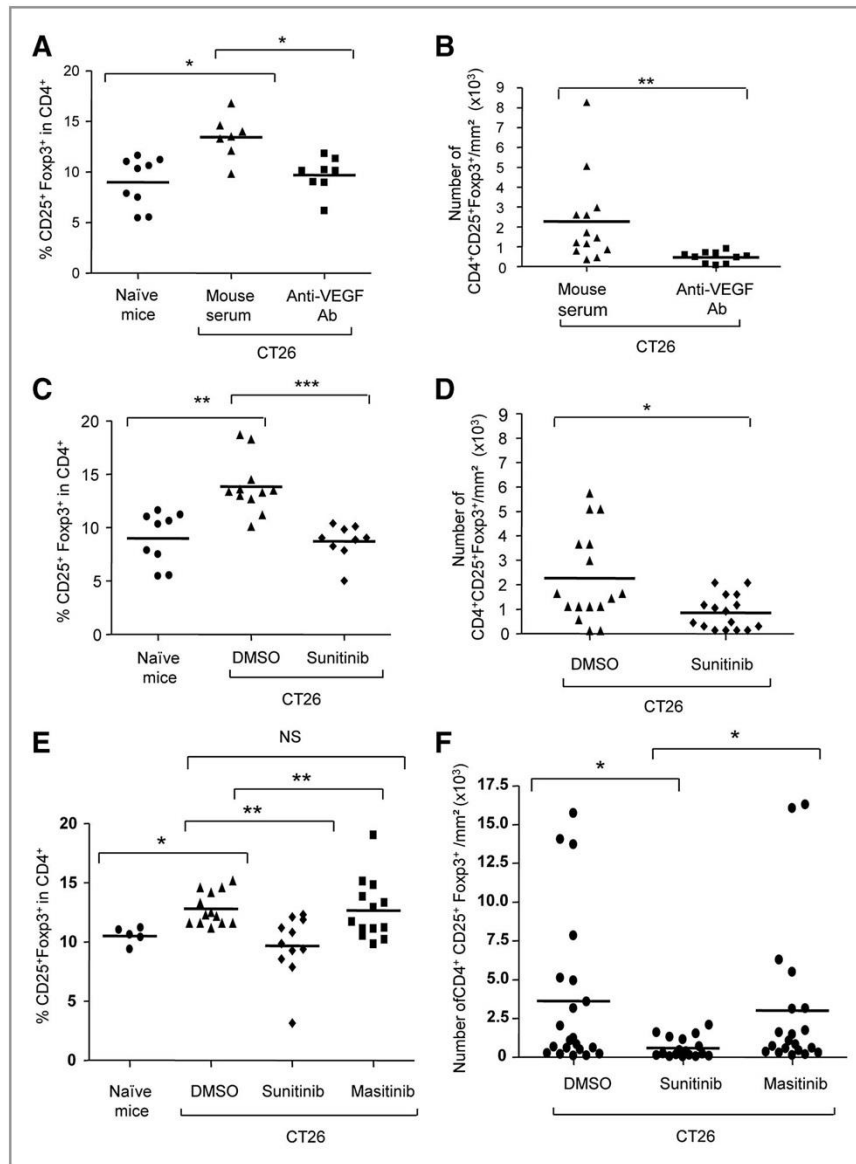


Figure 1. Anti-VEGF-A and sunitinib treatments significantly reduce spleen and tumor Treg proportions and numbers in a mouse model of CRCs. A and B, Tregs are significantly reduced in the spleen and tumors after anti-VEGF-A treatment. Balb/c mice were injected subcutaneously with 2×10^5 CT26 tumor cells. Treatment was started when the tumors reached 9 to 10 mm². Anti-VEGF-A (100 μ g/mouse twice a week) or mouse serum were administered i.p. After 2 weeks of treatment, mice were sacrificed. Splenocytes and tumor-infiltrating lymphocytes were stained for CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs. A, the graphs depict the percentage of CD25⁺/Foxp3⁺ cells among total CD4⁺ T cells in spleens in 2 independent experiments with 3 to 5 mice per group. B, in tumors, Treg numbers per mm² are shown from pooled results of 2 experiments with 5 to 7 mice per group. This experiment was carried out at least 4 times with similar results. C and D, Treg proportions and numbers are significantly reduced in spleens and tumors after sunitinib treatment. Same experimental setting as in A and B, but Treg staining was conducted after 2 weeks of sunitinib or DMSO treatment. C, the graphs depict the percentage of CD25⁺/Foxp3⁺ cells among total CD4⁺ T cells in spleens in 2 independent experiments with 4 to 6 mice per group. D, in tumors, Treg numbers per mm² are shown from pooled results of 2 experiments with 8 mice per group. These experiments were carried out at least 4 times with similar results. E and F, same experimental setting as in A and B, but mice received sunitinib (40 mg/kg), masitinib (30 mg/kg twice daily), or DMSO (as a control). Mice were studied after 2 weeks of treatment. Treg staining was conducted on splenocytes (E) or tumor-infiltrating cells (F). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

bevacizumab did not result in lymphopenia (Supplementary Fig. S5A) and did not affect the percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets (Supplementary Fig. S5B and S5C).

Thus, these data suggest that in patients with mCRCs, neutralization of VEGF-A could also induce a decrease in Treg proportion.

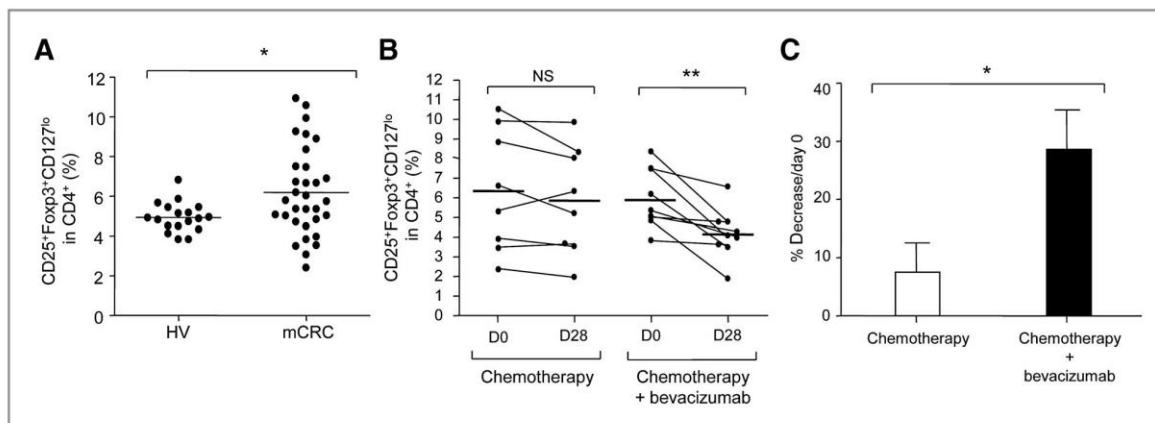


Figure 2. Chemotherapy combined with bevacizumab but not chemotherapy alone reduces Treg proportion in peripheral blood of patients with mCRCs. A, Treg proportion is enhanced in peripheral blood of patients with mCRCs compared with healthy volunteers. The Treg proportion (CD25⁺Foxp3⁺CD127^{lo} cells among CD4⁺ cells) was analyzed in the peripheral blood of healthy volunteers (HV) and patients with mCRCs at diagnosis. B and C, Treg proportion was monitored in peripheral blood of patients with mCRCs before (day 0) and after 2 cycles of treatment (day 28) with bevacizumab plus chemotherapy ($n = 9$) or chemotherapy alone ($n = 8$). The proportion of CD25⁺Foxp3⁺CD127^{lo} among CD4⁺ cells was shown for each patient before (D0) and after 2 cycles of treatment (D28; B). **, $P < 0.01$. The percentage decrease in Treg was calculated as (% Treg at day 0 – % Treg at day 28)/% Treg at day 0 (C). *, $P < 0.05$.

VEGF-A/VEGFR blockade does not affect suppressive function of Treg

We next determined whether blocking VEGF-A/VEGFR pathway using anti-VEGF-A or a TKI targeting VEGFR such as sunitinib modulated Treg function. Purified Tregs from the spleens of CT26 tumor-bearing mice treated with sunitinib, anti-VEGF-A mAb, or vehicle were cocultured at different ratios with conventional CD4⁺ CD25⁻ T cells stimulated by irradiated CD4⁺-depleted splenocytes and anti-CD3 as previously described (24). Proliferation was assessed in terms of ³H-thymidine incorporation. Tregs from both sunitinib- and anti-VEGF-A-treated mice maintained their capacity to inhibit conventional T-cell proliferation (Fig. 3A) and IFN- γ secretion (stimulated Tconv: 1,744 \pm 30 pg/mL; stimulated Tconv + Treg: 425 \pm 99 pg/mL; stimulated Tconv + Treg sunitinib: 357 \pm 89 pg/mL; stimulated Tconv + Treg anti-VEGF-A Ab: 121 \pm 100 pg/mL; Fig. 3B). Likewise, conventional CD4⁺ Foxp3⁻ T cells are not decreased by sunitinib or anti-VEGF treatments (Supplementary Figs. S3D and S4C). Susceptibility of conventional T cells to Treg suppression was unaffected by these treatments (data not shown). Thus, VEGF-A/VEGFR(-1,-2) pathway blockade by anti-VEGF-A or sunitinib depleted Tregs in the spleen and tumor but did not modulate their function.

VEGF-A directly induces Treg proliferation in tumor-bearing mice

Treg accumulation in tumor-bearing mice could occur through different mechanisms, such as expansion of preexisting Tregs, conversion of conventional naive or memory CD4⁺ T cells into Tregs, and migration or preferential survival of Tregs (25). Although VEGF-A can induce Treg differentiation by generating immature DCs (14, 15, 26), it is also an anti-apoptotic and a proliferation factor for several cell subtypes, including endothelial cells and tumor cells (27). Whether

VEGF-A secreted by tumor cells can directly act on Treg is unclear. *In vitro*, CT26 cells were able to secrete high levels of VEGF-A (332.5 pg/mL \pm 10.4 per 2.10⁴ cells after 72 hours). To examine the effect of VEGF-A on Treg in tumor-bearing mice, we first measured blood VEGF-A levels in tumor-bearing mice and healthy controls. Serum VEGF-A levels were indeed enhanced in CT26 tumor-bearing mice (Fig. 4A). Proliferation of splenic Treg (measured using the cell-cycle marker Ki67) but not conventional T cells was enhanced in CT26-bearing mice as compared with healthy controls (Fig. 4B and Supplementary Fig. S6A). Anti-VEGF-A treatment of tumor-bearing animals reduced the percentage of Ki67⁺ (proliferating) Tregs as compared with animals receiving mouse serum (Fig. 4C). This was confirmed by the injection of BrdUrd, a nucleoside analogue that is selectively incorporated by dividing cells. This decrease is observed as early as day 7 after the beginning of the treatment but reached significance after 2 weeks (not shown). After only one injection of anti-VEGF-A, the proportion of BrdUrd⁺ Tregs was significantly reduced (Fig. 4D). Similar results were observed with sunitinib (data not shown). Interestingly, anti-VEGF-A has no effect on proliferation of conventional T cells (Supplementary Fig. S6A). As previously described (28), only CD44^{hi} memory Treg proliferated in tumor-bearing animals. Proliferation of this Treg subset is decreased after anti-VEGF-A treatment (Fig. 4E). Thus, VEGF-A appeared to induce Treg proliferation in tumor-bearing mice.

We then tested the capacity of VEGF-A to directly induce Treg proliferation. Treg proliferation, assessed by measuring ³H-thymidine incorporation, was induced when anti-CD3 was combined with IL-2, but not with anti-CD3 alone, as previously reported (29). Interestingly, Treg proliferation was further enhanced when VEGF-A was added (Fig. 4F), suggesting that VEGF-A can directly enhance mitogenic-induced Treg proliferation. *In vitro* studies showed that VEGF-A did not improve Treg survival (data not shown).

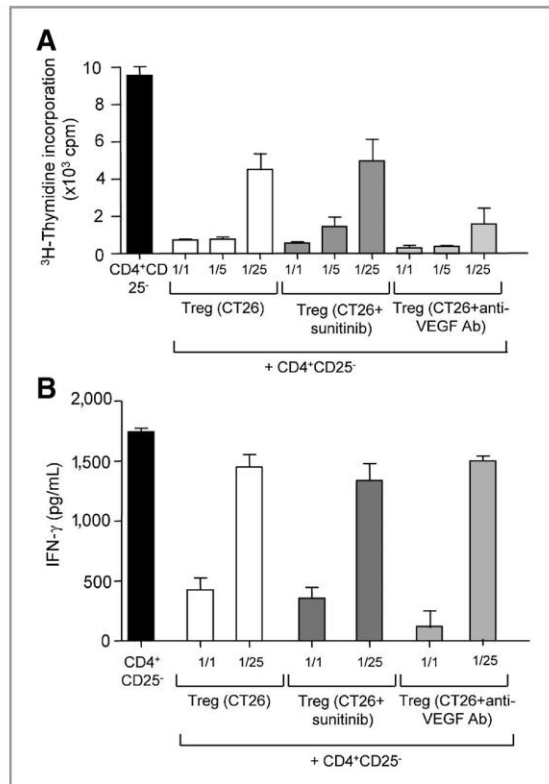


Figure 3. Treg function is not modulated by anti-VEGF-A or sunitinib treatment. A and B, same experimental setting as in Fig. 1. Tregs purified from splenocytes were cultured with conventional CD4⁺CD25⁻ T cells as described in Materials and Methods. A, proliferation was assessed by measuring ³H-thymidine incorporation. In controls, Tregs from tumor-bearing mice = 93 cpm, Tregs from tumor-bearing mice treated with sunitinib = 112 cpm, Tregs from tumor-bearing mice treated with anti-VEGF = 65 cpm. B, IFN- γ production was analyzed in the culture supernatant.

Altogether, these results suggest that Treg proliferation observed in tumor-bearing mice may be induced, at least in part, by a direct action of VEGF-A, whereas VEGF-A inhibition blocks this Treg proliferation.

Treg proliferation is dependent on VEGFR-2 expression by Treg

In healthy mice, only a small proportion of Tregs expressed VEGFR-1 or -2, whereas expression of both VEGFR-1 and -2 was enhanced in tumor-bearing mice (Fig. 5A). To determine whether tumor-induced Treg proliferation was dependent on VEGFR-1 and/or -2, we administered anti-VEGFR-1 or -2 antibodies for 2 weeks to mice with tumors. Anti-VEGFR-2 but not anti-VEGFR-1 treatment decreased Treg proportion in spleen (Fig. 5B). Furthermore, anti-VEGFR-1 treatment had no effect on Treg proliferation assessed by Ki67 expression (Fig. 5C, left), whereas anti-VEGFR-2 treatment inhibited it (Fig. 5C, right).

Thus, VEGFR-2, but not VEGFR-1, appears to be involved in VEGF-A-induced Treg expansion in this mouse model of CRCs.

Bevacizumab reduces Treg proliferative status in peripheral blood of mCRC patients

Then, we tried to confirm results observed in the CT26 mouse model in patients with mCRCs. We first showed that plasma VEGF level in patients with mCRCs was enhanced compared with healthy volunteers (Fig. 6A). Then, we found that in patients with mCRC, the proportion of cycling Tregs but not conventional T cells was significantly enhanced as compared with healthy volunteers (Fig. 6B and Supplementary Fig. S6B). After 2 cycles of treatment, the percentage of Ki67⁺ Treg in peripheral blood seems to be reduced in patients treated with chemotherapy plus bevacizumab (Fig. 6C) but not in patients treated with chemotherapy alone (Fig. 6D). Interestingly, bevacizumab associated with chemotherapy has no impact on proliferation of conventional T cells (Supplementary Fig. S6C).

Thus, these results suggest that in patients with mCRCs, neutralization of VEGF-A might decrease Treg proliferation in peripheral blood.

Altogether, these results suggest that specific VEGF-A/VEGFR-2 inhibition could prevent VEGF-A-induced Treg proliferation resulting in a Treg decrease in a mouse model of CRCs and in patients with mCRCs.

Discussion

Antiangiogenic molecules, especially those targeting VEGF-A signaling, have recently been shown to modulate Tregs. In physiologic conditions in naïve mice, sunitinib has been reported to decrease Treg percentages (30) but this was not confirmed by other groups (10). We found that sunitinib and anti-VEGF-A treatment did not reduce Treg percentages in naïve mice (data not shown). In contrast, sunitinib and sorafenib, another TKI targeting the VEGFR family, have been shown to reduce Treg frequency in tumor-bearing animals and patients with metastatic renal cancer (10–13, 31–34). However, these TKIs have multiple targets such as c-Kit and PDGFR that can have a direct impact on immune cells such as DC, natural killer (NK), and others (35, 36). The specific role of targeting the VEGF/VEGFR pathway has thus not been clearly shown with these works. More recently, 2 studies suggested an impact of a specific VEGF/VEGFR blockade on Tregs. First, anti-VEGF-A treatment has been suggested in a single immunofluorescence study of a mouse model of breast cancer to decrease tumor infiltrating Tregs (37). Second, administration of an adenoviral vector expressing soluble VEGFR-1/-2 has also been described to reduce tumor Treg proportion in a mouse model of CRCs (38). However, these data are both preliminary and scarce and as soluble VEGFR-1/-2 could also block VEGF-B and placenta growth factor (PlGF), it is difficult to conclude about the specific role of VEGF-A blockade on Treg. Here, in a mouse model of CRC, we show that sunitinib and anti-VEGF-A reduce the proportion and number of Tregs in tumor and spleen without reducing other T-cell subset numbers. However, masitinib, a TKI that does not target the VEGF-A/VEGFR axis, but targets c-Kit and PDGFR did not deplete Treg in our model.

Similar results to those obtained in our mouse colorectal tumor model were obtained in patients with mCRCs. Indeed, high circulating levels of VEGF-A were observed, the Treg proportion was enhanced in the peripheral blood of patients

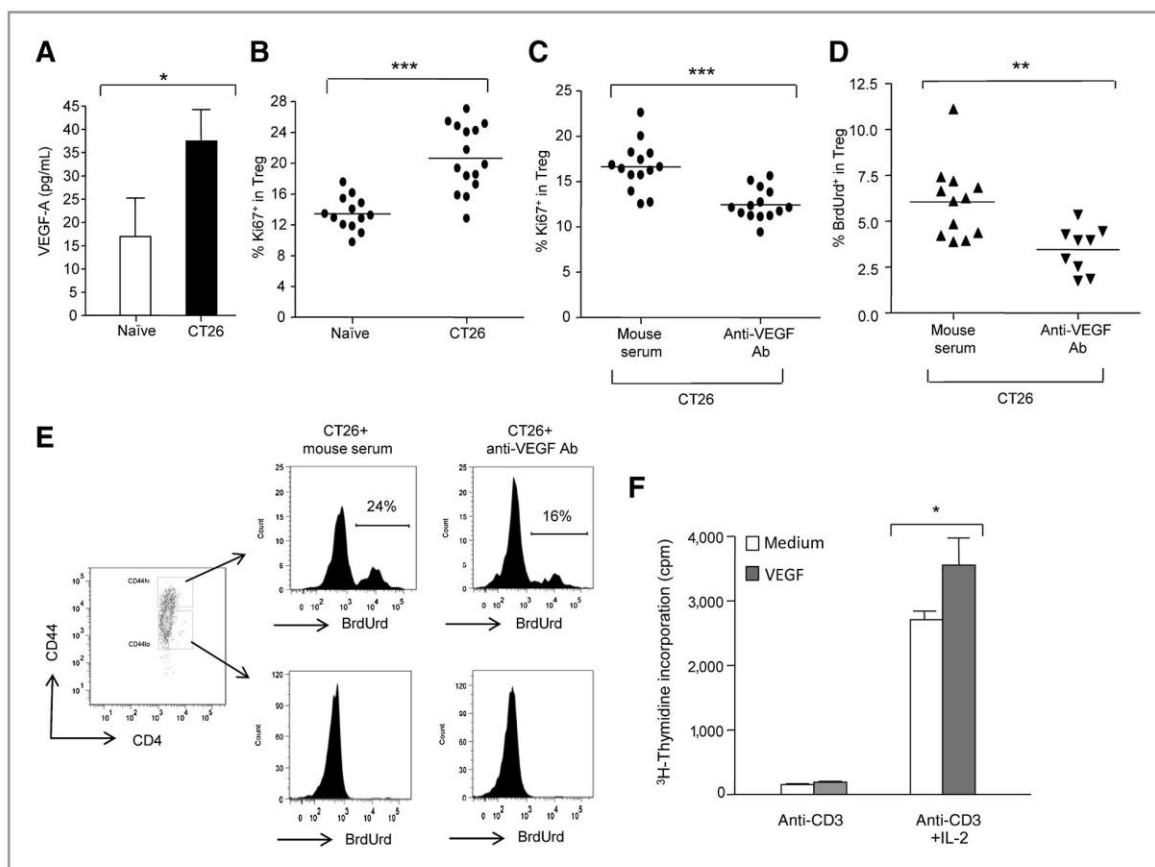


Figure 4. Tregs proliferate in CT26 tumor-bearing mice in response to VEGF-A stimulation. **A**, elevated serum VEGF-A levels in CT26 tumor-bearing mice. VEGF-A levels were measured by ELISA in serum of naive and CT26 tumor-bearing mice. **B**, Treg proliferation is enhanced in CT26 tumor-bearing mice compared with healthy mice. Tregs from splenocytes of naive and tumor-bearing mice were identified by $CD4^+/CD25^+/Foxp3^+$ staining and analyzed for Ki67 expression. Data pooled from 3 independent experiments with 4 to 5 mice per group are shown. **C** and **D**, anti-VEGF-A treatment downregulates Treg proliferation in CT26 tumor-bearing mice. Anti-VEGF-A was administered to CT26 tumor-bearing mice, and Ki67 (**C**) and BrdUrd incorporation (**D**) by Treg in spleens was studied. Data pooled from 3 independent experiments with 3 to 5 mice per group are shown. **E**, anti-VEGF-A Ab decreases $CD44^{hi}$ Treg proliferation. Same experimental setting as in **D** but showing flow cytometric analysis of BrdUrd incorporation in $CD44^{hi}$ and $CD44^{lo}$ Treg after anti-VEGF-A or mouse serum treatment. **F**, recombinant mouse VEGF-A directly increases Treg proliferation *in vitro*. Purified Tregs were cultured in the presence of plate-bound anti-CD3 and IL-2, with or without VEGF-A. Proliferation was assessed by measuring 3H -thymidine incorporation. This graph depicts one representative experiment of 3. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

with CRCs, and treatment with bevacizumab reduced it. In a preliminary study, Treg decrease seems to correlate with tumor response to chemotherapy associated with bevacizumab according to RECIST. Tregs might be a useful predictive tool on the efficacy of chemotherapy associated with bevacizumab. However, these results should be confirmed in a larger series of patients.

Altogether, these observations suggest that AA molecules modulate a tumor-related phenomenon and that specific blockade of the VEGF-A/VEGFR axis by an anti-VEGF mAb is sufficient to inhibit Treg accumulation in mouse spleen and tumor in our CRC model and in peripheral blood of patients with mCRCs.

Tumor-induced Treg expansion is classically explained by 4 possible mechanisms. The first is a preferential Treg recruitment to the tumor: Tregs express receptors for chemokine such as

CCR4, CCR5, CXCR4, and CCR10 that could induce their migration toward the tumor (25, 39, 40). Second, naive and memory conventional T cells can convert into Tregs with the help of immature antigen-presenting cells or myeloid-derived suppressor cells (MDSC; refs. 25, 26, 41). Third, naturally occurring Tregs are more resistant to oxidative stress than conventional T cells, possibly contributing to their survival in stressful tumor environments (42). Finally, Tregs themselves can proliferate. In physiologic settings, Tregs proliferate more strongly than naive $CD4^+$ T cells (43). We found that $9.7\% \pm 0.7\%$ of Tregs in spleens of tumor-free mice (Fig. 4B) and $13.59\% \pm 1.5\%$ of Tregs from peripheral blood of healthy volunteers (Fig. 6B) expressed the cycling marker Ki67. This physiologic proliferation can be enhanced in various circumstances, including cancer (28). In mouse models of mammary tumors and melanoma, Treg proliferation is higher in draining lymph nodes at the time of tumor

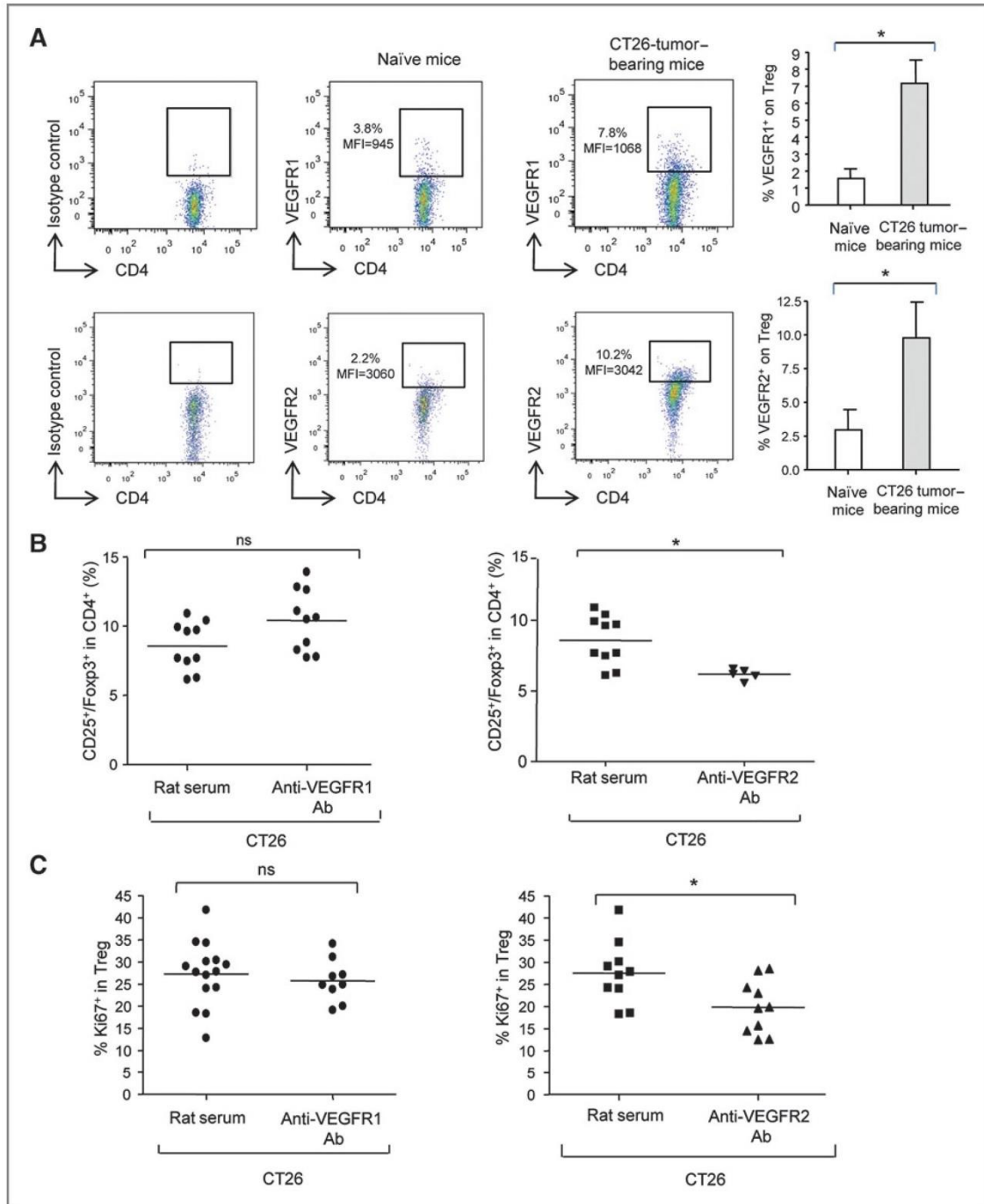
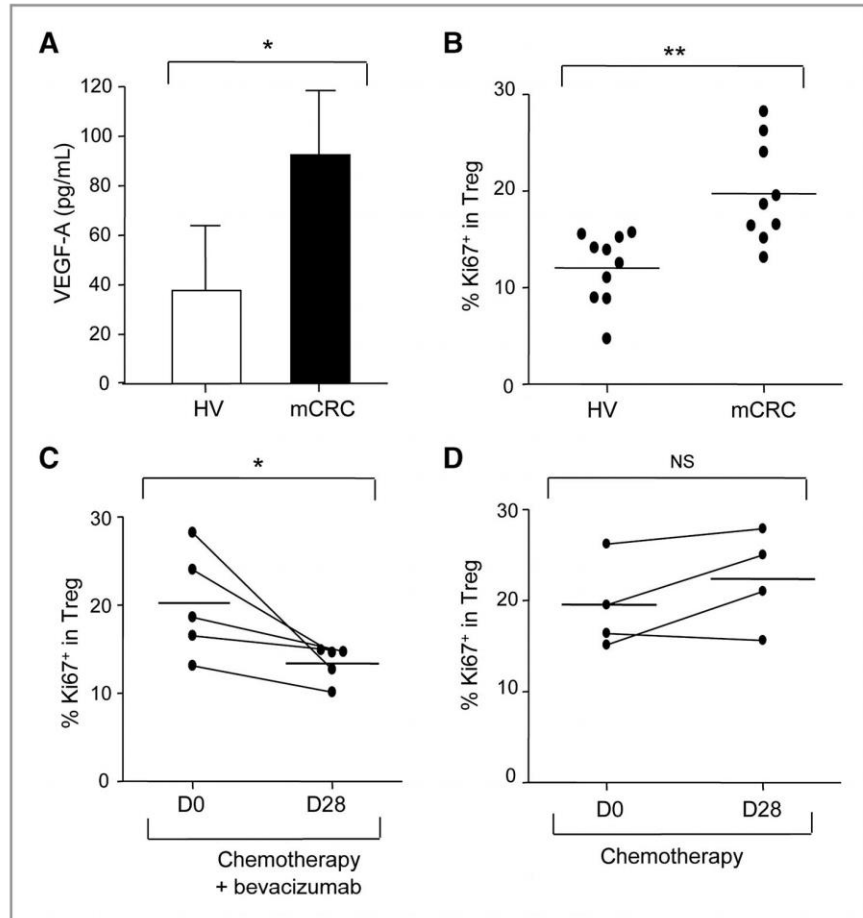


Figure 5. Tregs in tumor-bearing mice express VEGF receptors and their proliferation is VEGFR-2-dependent. A, expression of VEGFR-1 and -2 was analyzed in Tregs obtained from splenocytes of tumor-bearing and tumor-free mice (naïve mice). Dead cells were removed using Live/Dead staining. A representative staining on Treg is shown (left) and pooled results from at least 3 experiments are shown (right). *, $P < 0.05$ in the Mann-Whitney test. B, anti-VEGFR-2 treatment decreases Treg proportion in spleens of CT26 tumor-bearing mice. Balb/c mice were injected subcutaneously with 2×10^5 CT26 tumor cells. Treatment was started when the tumors reached 9 to 10 mm². Anti-VEGFR-1, -2 (800 µg/mouse 3 times a week) or rat serum (as control) was administered i.p. Treg proportion in spleens is shown. C, Treg proliferation in tumor-bearing mice depends on VEGFR-2 signaling. Same experimental setting as in B, but Ki67 expression by Treg was analyzed after 2 weeks of treatment. NS, not significant. *, $P < 0.05$.

Figure 6. Bevacizumab reduces Treg proliferation in patients with mCRCs. A, elevated plasmatic VEGF-A levels in patients with mCRCs. VEGF-A levels were measured by ELISA in plasma of patients with mCRCs or healthy volunteer (HV). B, Treg proliferation is enhanced in the peripheral blood of patients with mCRCs compared with healthy volunteers. Tregs from peripheral blood of healthy volunteers and patients with CRCs were analyzed for Ki67 expression. *, $P < 0.05$. C and D, bevacizumab reduces Treg proliferation in patients with mCRCs. Ki67 expression was assessed in Tregs from patients with mCRCs treated with chemotherapy + bevacizumab (C) or chemotherapy alone (D) before (D0) and after 2 cycles of treatment (D28). NS, not significant. *, $P < 0.05$.



emergence than in healthy controls (28). We confirm these data in our colorectal tumor model. Treg proliferation was enhanced in the spleen, both at the time of tumor emergence and also when the tumors were established ($>100 \text{ mm}^2$; Fig. 3B). In human, 2 studies have shown an increased proportion of dividing Tregs in tumors or peripheral blood in patients with breast cancer and acute myeloid leukemia (44, 45). We found here that the proportion of Ki67-expressing Tregs was enhanced in peripheral blood of metastatic patients with CRCs as compared with healthy volunteers (Fig. 6B).

As CT26 tumor cells produce VEGF-A (Fig. 3A) and AA molecules targeting VEGF-A inhibit tumor-induced Treg accumulation, we postulated that VEGF-A could be partly responsible for tumor-induced Treg accumulation. VEGF-A acts as a proliferative factor for endothelial and some cancer cells (27). We found that anti-VEGF-A treatment reduced Treg cycling, as assessed by Ki67 expression and BrdUrd incorporation, and that VEGF-A directly enhanced the proliferation of Tregs derived from tumor-bearing mice. To our knowledge, VEGF-A has not previously been described as a proliferative factor for Tregs.

Immature myeloid cells that expand during tumor progression, such as TGF β -expressing DCs and MDSCs, are generally

thought to be responsible for tumor-induced Treg proliferation (26, 41). Here, we describe a novel mechanism whereby VEGF-A, which is probably produced by colorectal tumor cells, directly promotes Treg proliferation. In patients with CRCs, Foxp3 expression in CD4 $^+$ T cells decreased after surgery (46). VEGF-A produced by the tumor cells could, at least in part, explain this phenomenon. Antiangiogenic (AA) molecules targeting the VEGFR pathway inhibited tumor-induced Treg accumulation, at least partly, by inhibiting VEGF-induced Treg proliferation.

Little is known on Treg VEGFR-1 and -2 expression. In mice, CD4 $^+$ T cells express very low levels of VEGFR unless they are activated with anti-CD3/CD28 (47), and to our knowledge, no specific data on CD4 $^+$ Foxp3 $^+$ Tregs have been published. Suzuki and colleagues have suggested that human Tregs expressed VEGFR-2 in a TGF β -dependent manner (48). We show here that Tregs express both VEGFR-1 and -2 in tumor-bearing but not in healthy mice. VEGFR-2 is the main mediator of endothelial cell proliferation, whereas VEGFR-1 seems more involved in their migration (49). We extend these observations by showing that VEGF-A-induced Treg proliferation is dependent on Treg VEGFR-2 signaling and not on VEGFR-1 signaling.

Although AA molecules such as sunitinib and anti-VEGF modulate immunosuppressive cells, it could be interesting to determine whether these treatments could restore a specific antitumor immune response. Suppression of tolerogenic pathways induced by the tumor seems to be a key to successful cancer immunotherapy. Several approaches have been developed to modulate Tregs in cancer. Low-dose cyclophosphamide inhibits or depletes Tregs in the context of a tumor and enhances antitumor responses (50). Other strategies using anti-CD25 or anti-GITR antibodies could modulate Treg numbers or function but would also affect activated effector T cells (25). Interestingly, we found that VEGF-A/VEGFR-2 pathway blockade did not deplete all Tregs but simply restored their proportion to physiologic levels. Thus, to combine antiangiogenic molecules targeting VEGF-A/VEGFR with immunotherapeutic approaches might be interesting to target selectively Tregs avoiding the depletion of effector T cells and to minimize the occurrence of autoimmune mediated side effects often associated with a total Treg depletion.

In conclusion, we show that specific inhibition of the VEGF-A/VEGFR axis is sufficient to prevent Treg accumulation in a CRC mouse model and in patients with mCRCs. Treg proliferation was enhanced in tumor-bearing animals and this was, at least in part, due to a direct action of VEGF-A on Tregs via VEGFR-2. VEGF-A/VEGFR-2 blockade by AA molecules inhibited this proliferation. Combining VEGF-A/VEGFR-2-targeting AA molecules with immunotherapeutic approaches in the future might thus be relevant in patients with CRCs.

References

1. Galfrascoli E, Piva S, Cinquini M, Rossi A, La Verde N, Bramati A, et al. Risk/benefit profile of bevacizumab in metastatic colon cancer: a systematic review and meta-analysis. *Dig Liver Dis* 2011;43:286–94.
2. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005;353:2654–66.
3. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960–4.
4. Noshok K, Baba Y, Tanaka N, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol* 2010;222:350–66.
5. Pere H, Tanchot C, Bayry J, Terme M, Taieb J, Badoual C, et al. Comprehensive analysis of current approaches to inhibit regulatory T cells in cancer. *Oncoimmunology* 2012;1:326–33.
6. Chaput N, Louafi S, Bardier A, Charlotte F, Vaillant JC, Menegaux F, et al. Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut* 2009;58:520–9.
7. Casares N, Arribillaga L, Sarobe P, Dotor J, Lopez-Diaz de Cerio A, Melero I, et al. CD4+/CD25+ regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4+ T cells with IFN-gamma-dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination. *J Immunol* 2003;171:5931–9.
8. Bonertz A, Weitz J, Pietsch DH, Rahbari NN, Schlude C, Ge Y, et al. Antigen-specific Tregs control T cell responses against a limited repertoire of tumor antigens in patients with colorectal carcinoma. *J Clin Invest* 2009;119:3311–21.
9. Yaqub S, Henjum K, Mahic M, Jahnsen FL, Aandahl EM, Bjornbeth BA, et al. Regulatory T cells in colorectal cancer patients suppress anti-

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

A.F. Carpentier is a consultant/advisory board member of Roche. J. Taieb has advisory role in Roche and research grant from Roche. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: M. Terme, S. Pernot, E. Tartour, J. Taieb
Development of methodology: M. Terme, S. Pernot, J. Taieb
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): M. Terme, S. Pernot, E. Marcheteau, F. Sandoval, N. Benhamouda, O. Colussi, O. Dubreuil, A.F. Carpentier, J. Taieb
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): M. Terme, S. Pernot, E. Marcheteau, F. Sandoval, N. Benhamouda, O. Colussi, A.F. Carpentier, E. Tartour, J. Taieb
Writing, review, and/or revision of the manuscript: M. Terme, S. Pernot, A. F. Carpentier, J. Taieb
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): M. Terme
Study supervision: J. Taieb
Inclusion of patients: O. Dubreuil

Acknowledgments

The authors thank Coralie Guérin for her help with cell sorting and patients for their participation in this study.

Grant Support

This work was supported by Roche, Association pour la Recherche contre le Cancer, Ligue contre le Cancer, and Association des Gastroentérologues Oncologues. M. Terme was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer and Association des Gastroentérologues Oncologues and Labex Immunooncology.

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

Received June 13, 2012; revised October 4, 2012; accepted October 19, 2012; published OnlineFirst October 29, 2012.

- tumor immune activity in a COX-2 dependent manner. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:813–21.
10. Ozao-Choy J, Ma G, Kao J, Wang GX, Meseck M, Sung M, et al. The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res* 2009;69:2514–22.
11. Xin H, Zhang C, Herrmann A, Du Y, Figlin R, Yu H. Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res* 2009;69:2506–13.
12. Adotevi O, Pere H, Ravel P, Haicheur N, Badoual C, Merillon N, et al. A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. *J Immunother* 2010;33:991–8.
13. Finke JH, Rini B, Ireland J, Rayman P, Richmond A, Golshayan A, et al. Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2008;14:6674–82.
14. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:1096–103.
15. Belkaid Y, Oldenhove G. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity* 2008;29:362–71.
16. Wada J, Suzuki H, Fuchino R, Yamasaki A, Nagai S, Yanai K, et al. The contribution of vascular endothelial growth factor to the induction of regulatory T-cells in malignant effusions. *Anticancer Res* 2009;29:881–8.
17. Garcia JA, Mekhail T, Elson P, Triozzi P, Nemecek C, Dreicer R, et al. Clinical and immunomodulatory effects of bevacizumab and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma: results from a phase II trial. *BJU Int* 2011;107:562–70.
18. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin,

- fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 2007;25:1539–44.
19. Dubreuil P, Letard S, Ciufolini M, Gros L, Humbert M, Casteran N, et al. Masitinib (AB1010), a potent and selective tyrosine kinase inhibitor targeting KIT. *PLoS One* 2009;4:e7258.
 20. Anastassiadis T, Deacon SW, Devarajan K, Ma H, Peterson JR. Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* 2011;29:1039–45.
 21. Davis MI, Hunt JP, Herrgard S, Ciceri P, Wodicka LM, Pallares G, et al. Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* 2011;29:1046–51.
 22. Fuh G, Wu P, Liang WC, Ultsch M, Lee CV, Moffat B, et al. Structure-function studies of two synthetic anti-vascular endothelial growth factor Fabs and comparison with the Avastin Fab. *J Biol Chem* 2006;281:6625–31.
 23. Terme M, Chaput N, Combadiere B, Ma A, Ohteki T, Zitvogel L. Regulatory T cells control dendritic cell/NK cell cross-talk in lymph nodes at the steady state by inhibiting CD4+ self-reactive T cells. *J Immunol* 2008;180:4679–86.
 24. Mitsui J, Nishikawa H, Muraoka D, Wang L, Noguchi T, Sato E, et al. Two distinct mechanisms of augmented antitumor activity by modulation of immunostimulatory/inhibitory signals. *Clin Cancer Res* 2010;16:2781–91.
 25. Mouggiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC. Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res* 2010;107:57–117.
 26. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 2005;202:919–29.
 27. Liang Y, Hyder SM. Proliferation of endothelial and tumor epithelial cells by progesterin-induced vascular endothelial growth factor from human breast cancer cells: paracrine and autocrine effects. *Endocrinology* 2005;146:3632–41.
 28. Darrasse-Jeze G, Bergot AS, Durgeau A, Billiard F, Salomon BL, Cohen JL, et al. Tumor emergence is sensed by self-specific CD44hi memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *J Clin Invest* 2009;119:2648–62.
 29. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188:287–96.
 30. Hipp MM, Hilf N, Walter S, Werth D, Brauer KM, Radsak MP, et al. Sorafenib, but not sunitinib, affects function of dendritic cells and induction of primary immune responses. *Blood* 2008;111:5610–20.
 31. Cao M, Xu Y, Youn JI, Cabrera R, Zhang X, Gabrilovich D, et al. Kinase inhibitor Sorafenib modulates immunosuppressive cell populations in a murine liver cancer model. *Lab Invest* 2011;91:598–608.
 32. Busse A, Asemissen AM, Nonnenmacher A, Braun F, Ochsenreither S, Stather D, et al. Immunomodulatory effects of sorafenib on peripheral immune effector cells in metastatic renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2011;47:690–6.
 33. Desar IM, Jacobs JFM, Hulsbergen-vandeKaa CA, Oyen WJ, Mulders PF, van der Graaf WT, et al. Sorafenib reduces the percentage of tumour infiltrating regulatory T cells in renal cell carcinoma patients. *Int J Cancer* 2011;129:507–12.
 34. Tartour E, Pere H, Maillere B, Terme M, Merillon N, Taieb J, et al. Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 2011;30:83–95.
 35. Borg C, Terme M, Taieb J, Menard C, Flament C, Robert C, et al. Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. *J Clin Invest* 2004;114:379–88.
 36. Terme M, Ullrich E, Aymeric L, Meinhardt K, Coudert J, Desbois M, et al. Cancer-induced immunosuppression: IL-18-elicited immunoblastic NK cells. *Cancer Res* 2012;72:2757–62.
 37. Roland CL, Lynn KD, Toombs JE, Dineen SP, Udugamasooriya DG, Brekken RA. Cytokine levels correlate with immune cell infiltration after anti-VEGF therapy in preclinical mouse models of breast cancer. *PLoS One* 2009;4:e7669.
 38. Li B, Lalani AS, Harding TC, Luan B, Koprivnikar K, Huan Tu G, et al. Vascular endothelial growth factor blockade reduces intratumoral regulatory T cells and enhances the efficacy of a GM-CSF-secreting cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:6808–16.
 39. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang LP, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* 2011;475:226–30.
 40. Pere H, Montier Y, Bayry J, Quintin-Colonna F, Merillon N, Dransart E, et al. A CCR4 antagonist combined with vaccines induces antigen-specific CD8+ T cells and tumor immunity against self antigens. *Blood* 2011;118:4853–62.
 41. Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, Borrello I. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res* 2008;68:5439–49.
 42. Mehrotra S, Mouggiakakos D, Johansson CC, Voelkel-Johnson C, Kiessling R. Oxidative stress and lymphocyte persistence: implications in immunotherapy. *Adv Cancer Res* 2009;102:197–227.
 43. Vukmanovic-Stejić M, Zhang Y, Cook JE, Fletcher JM, McQuaid A, Masters JE, et al. Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest* 2006;116:2423–33.
 44. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 2009;69:2000–9.
 45. Wang X, Zheng J, Liu J, Yao J, He Y, Li X, et al. Increased population of CD4(+)CD25(high), regulatory T cells with their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients. *Eur J Haematol* 2005;75:468–76.
 46. Betts G, Jones E, Junaid S, El-Shanawany T, Scurr M, Mizen P, et al. Suppression of tumour-specific CD4(+) T cells by regulatory T cells is associated with progression of human colorectal cancer. *Gut* 2012;61:1163–71.
 47. Shin JY, Yoon IH, Kim JS, Kim B, Park CG. Vascular endothelial growth factor-induced chemotaxis and IL-10 from T cells. *Cell Immunol* 2009;256:72–8.
 48. Suzuki H, Onishi H, Wada J, Yamasaki A, Tanaka H, Nakano K, et al. VEGFR2 is selectively expressed by FOXP3high CD4+ Treg. *Eur J Immunol* 2010;40:197–203.
 49. Li ZD, Bork JP, Krueger B, Patsenker E, Schulze-Krebs A, Hahn EG, et al. VEGF induces proliferation, migration, and TGF-beta1 expression in mouse glomerular endothelial cells via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;334:1049–60.
 50. Taieb J, Chaput N, Scharz N, Roux S, Novault S, Menard C, et al. Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines. *J Immunol* 2006;176:2722–9.

I.2 Étude de la modulation des Treg et en particulier des Treg Th1-like par l'aflibercept ciblant le VEGF-A mais aussi le PlGF.

Contexte : Dans le cancer colorectal, comme dans la grande majorité des cancers chez l'homme, ainsi que dans les modèles murins de tumeurs, la fréquence des Treg dans le sang périphérique est augmentée, ainsi que leurs fonctions immunosuppressives, comparé aux individus sains (172,173). On retrouve également une forte infiltration en Treg en intratumoral dans une grande majorité de cancers (174–180). Plusieurs mécanismes interviennent dans la régulation de cette accumulation de Treg dans les cancers. En particulier, plusieurs cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral favorisent l'expansion de ces Treg. Comme vu précédemment, le VEGF-A peut favoriser indirectement l'accumulation de Treg par l'inhibition de la maturation des DC entraînant l'accumulation de DC immature, ou l'induction des MDSC, toutes deux pouvant favoriser la conversion de T conventionnels en T régulateurs (183,444). Nous avons montré précédemment que l'activation de la voie VEGFA/VEGFR2 pouvait entraîner la prolifération et l'augmentation des Treg. Nous avons ainsi pu montrer que les LTreg murins exprimaient les récepteurs 1 et 2 au VEGF en situation tumorale et que le VEGF-A pouvait induire de manière directe leur prolifération, de même que l'inhibition de l'axe VEGFA-VEGFR2 était suffisante pour stopper cette prolifération. Enfin, ces phénomènes étaient retrouvés chez l'homme en situation thérapeutique. En effet, les Treg étaient significativement diminués chez les patients ayant reçu du bevacizumab en combinaison avec de la chimiothérapie en 1^{ère} ligne, mais pas chez les patients ayant reçu de la chimiothérapie seule.

Cependant, des mécanismes de résistance secondaire aux anti-angiogéniques ciblant la voie VEGF-A/VEGFR2 ont été décrits et peuvent contribuer à l'échappement tumoral, en particulier via la régulation positive de facteurs pro-angiogéniques alternes. Si les interactions entre la voie VEGF-A/VEGFR2 et PlGF/VEGFR-1 sont complexes et parfois ambivalentes, il semble que lorsque la voie VEGF-A/VEGFR2 est bloquée, la voie PlGF/VEGFR-1 peut alors être une voie alterne de l'angiogenèse, directement par son activité kinase propre entraînant une voie de signalisation pro-angiogénique, et potentiellement par des phénomènes de transphosphorylation ou d'hétérodimérisation susceptible d'activer indirectement le VEGFR-2.

Il a été observé dans plusieurs types de tumeur dont le cancer colorectal, une augmentation du PlGF lors d'un traitement par anti-VEGF-A (409,491,547) et en particulier on observe une augmentation du PlGF plasmatique au moment de la progression.

Le PlGF peut avoir des effets immunomodulateurs propres. En effet, il a été montré que le PlGF pouvait inhiber la maturation des DC. Il pourrait avoir un rôle via ce mécanisme dans le développement des Treg en situation tumorale. Il a également été montré que le PlGF pouvait inhiber la réponse Th1. On peut émettre l'hypothèse que le PlGF peut moduler particulièrement des populations de Treg Th1-like, capables de réguler spécifiquement la réponse immunitaire de type Th1. L'expression identique des récepteurs de chimiokines entre les Treg et les T effecteurs correspondant, permettant une colocalisation, et leur induction par les mêmes signaux environnementaux, confère aux Th1-like un rôle important dans le contrôle de la réponse Th1. La réponse Th1 est particulièrement importante dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Les Treg TH1-like, caractérisés par l'expression de CXCR3, peuvent être augmentés en situation tumorale comme cela a été observé dans les cancers de l'ovaire. Le rôle des Treg Th1-like dans les autres cancers est mal connu.

L'aflibercept est une protéine de fusion possédant un spectre large de cibles moléculaires circulantes incluant le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A, le VEGF-B, le Placental Growth Factor (PlGF), contrairement au bevacizumab dont l'action inhibitrice est restreinte au VEGF-A. L'aflibercept est utilisé dans le CRC métastatique et a montré son efficacité en 2^e ligne de traitement, en association avec une chimiothérapie par folfiri, après échec d'une première ligne par Folfox associé ou non au bevacizumab.

De par son spectre d'action plus large que le bevacizumab, l'aflibercept pourrait théoriquement permettre de rétablir un effet anti-angiogénique dans des tumeurs ayant une résistance primaire ou secondaire au bevacizumab. L'efficacité de traitements dirigés contre PlGF dans des tumeurs résistantes aux anti-VEGF-A a été montré dans des modèles murins résistants au blocage de VEGFR-2 (416,417).

Compte tenu de l'effet potentiel de la voie PlGF/VEGFR-1 sur les paramètres immunitaires, et son implication dans les mécanismes d'échappement à l'inhibition de la voie VEGF-A/VEGFR, notre objectif était d'évaluer l'impact de l'aflibercept sur les Treg dans un modèle murin de cancer colorectal et chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique n'ayant pas reçu de traitement préalable.

Matériel et Méthodes.

Modèle tumoral CT26 in vivo.

Les cellules CT26 sont d'abord décollées par 5ml de trypsine (0,05% Trypsin-EDTA, Gibco) préparées, puis lavées en PBS, centrifugée à 1200RPM pendant 6 minutes à 4°C deux fois, et suspendues en PBS ($5 \cdot 10^6$ cellules/ml). 500 000 cellules sont injectées par souris dans un volume de 100µl en sous-cutané au niveau du flanc droit de la souris BALB/c (Charles River), âgées de 6 à 8 semaine Le suivi de la croissance tumorale est réalisé par mesure des tumeurs en deux diamètres perpendiculaires, 2 à 3 fois par semaine. Les résultats sont exprimés en surface tumorale +/- écart type. Les souris sont sacrifiées lorsque la tumeur dépasse 300mm² selon les protocoles du comité d'éthique.

Traitements

L'aflibercept est administré par voie sous-cutanée, dans l'abdomen du côté opposé à la tumeur. à des doses allant de 0.1 à 25mg/kg, tous les 3 jours. Le traitement était commencé lorsque les tumeurs mesuraient environ 10 mm² soit environ à J7 de la croissance tumorale.

Les souris contrôles recevaient une injection sous-cutanée de PBS.

Cytométrie en flux

Les prélèvements étaient déposés en plaque 96 puits pour le marquage, et suspendus dans 100µl de PBS-BSA 0,1%. Des rates et les tumeurs ont été prélevées de souris porteuses de tumeur ou non, broyées manuellement, traitées par ACK (NH₄Cl 8,3g/l d'H₂O ; KHCO₃ 1g/l ; EDTA 200mMol/l) pendant 5 minutes. Puis les cellules ont été comptées et déposées en plaque 96 puits à 2 Millions de cellules par puits, suspendus dans 100µl de PBS. Les expériences de marquage membranaires sont réalisées avec les anticorps suivants : Anti mouse-CD4-Pacific Blue; Anti mouse-CD25-PercpCy5.5 ; anti mouse-CD127-APC ; Anti-mouse CD45R0-Alexa Fluor 700, Anti mouse-CXCR3-FITC. Tous les anticorps étaient obtenus auprès de Ebioscience. Après 1H d'incubation, les échantillons sont lavés dans du PBS et fixé dans 100µl de paraformaldehyde 1%, puis conservés à 4°C dans le noir jusqu'à l'acquisition. Les expériences de marquage intracellulaires sont réalisées, après un marquage membranaire, par perméabilisation : Anti-mouse FoxP3-PE, Anti-Ki67-PE ou Anti-Ki67-FITC. Les acquisitions sont réalisées au moyen d'un FACS LSR II (Becton Dickinson), et les analyses sont réalisées à l'aide du logiciel FlowJo (Tree Star, Inc, Oregon Corporation).

Patients

Des PBMC ont été obtenus de volontaires sains, ou de patients ayant un cancer colorectal métastatique, appartenant à une cohorte (cohorte 1) suivis à l'Hôpital Européen Georges Pompidou dans le service d'oncologie digestive, avant tout traitement.

Des PBMC ont également été obtenus chez des patients atteints de CCRm traités par FOLFIRI + aflibercept en 1^{ère} ligne de traitement dans le cadre d'un essai clinique monobras de phase II, l'essai FFCD 1302 (NCT02181556). Les prélèvements sanguins étaient réalisés avant tout traitement puis à J28 (après deux cycles) du traitement. Les patients étaient traités. Les principaux critères d'inclusions étaient les suivants :

- Age \geq 18 ans
- État général OMS \leq 2
- Adénocarcinome du rectum ou du côlon métastatique prouvé histologiquement sur la tumeur primitive ou une métastase
- Métastase(s) non résecable(s) et/ou patient non opérable

Le traitement était administré tous les 14 jours jusqu'à progression, décès ou toxicité inacceptable, et était constitué de :

- aflibercept 4 mg/kg en perfusion IV d'1 heure
- FOLFIRI 1 heure après la fin de la perfusion d'aflibercept :
 - o Irinotécan 180 mg/m² en perfusion de 90 min en Y de l'acide folinique dans 250 mL de G5% (H+0)
 - o Acide folinique 400 mg/m² IV en 2 heures dans 250 mL de G5% (H+0), puis
 - o 5FU bolus 400 mg/m² IV = 10 min dans 100 mL de G5% (H+2h)
 - o 5FU continu 2400 mg/m² en perfusion sur 46h dans G5% [infuseur portable (qsp 230 mL, 5 mL/h), pompe ou pousse seringue portable]

Résultats

Effet de l'aflibercept sur la croissance tumorale et les Treg

Après 2 semaines de traitement par aflibercept, la croissance tumorale était significativement diminuée, comparée aux souris traitées par PBS (Figure 1.A). Comme précédemment décrit, le pourcentage de Treg (CD25⁺FOXP3⁺) parmi les LT CD4⁺ était significativement augmenté dans la rate et les ganglions des souris porteuses de tumeur CT26, comparé à des souris naïves

(548). L'aflibercept induisait une diminution du pourcentage de Treg dans les rates 8.3% +/- 1.9 vs 10.8% +/- 2.2 ; p=0.0009) et les tumeurs (12.3% +/- 5.9 vs 26.9% +/- 9.3 ; p=0.0052) par rapport aux souris contrôles(Figures 1.B, 1.C).

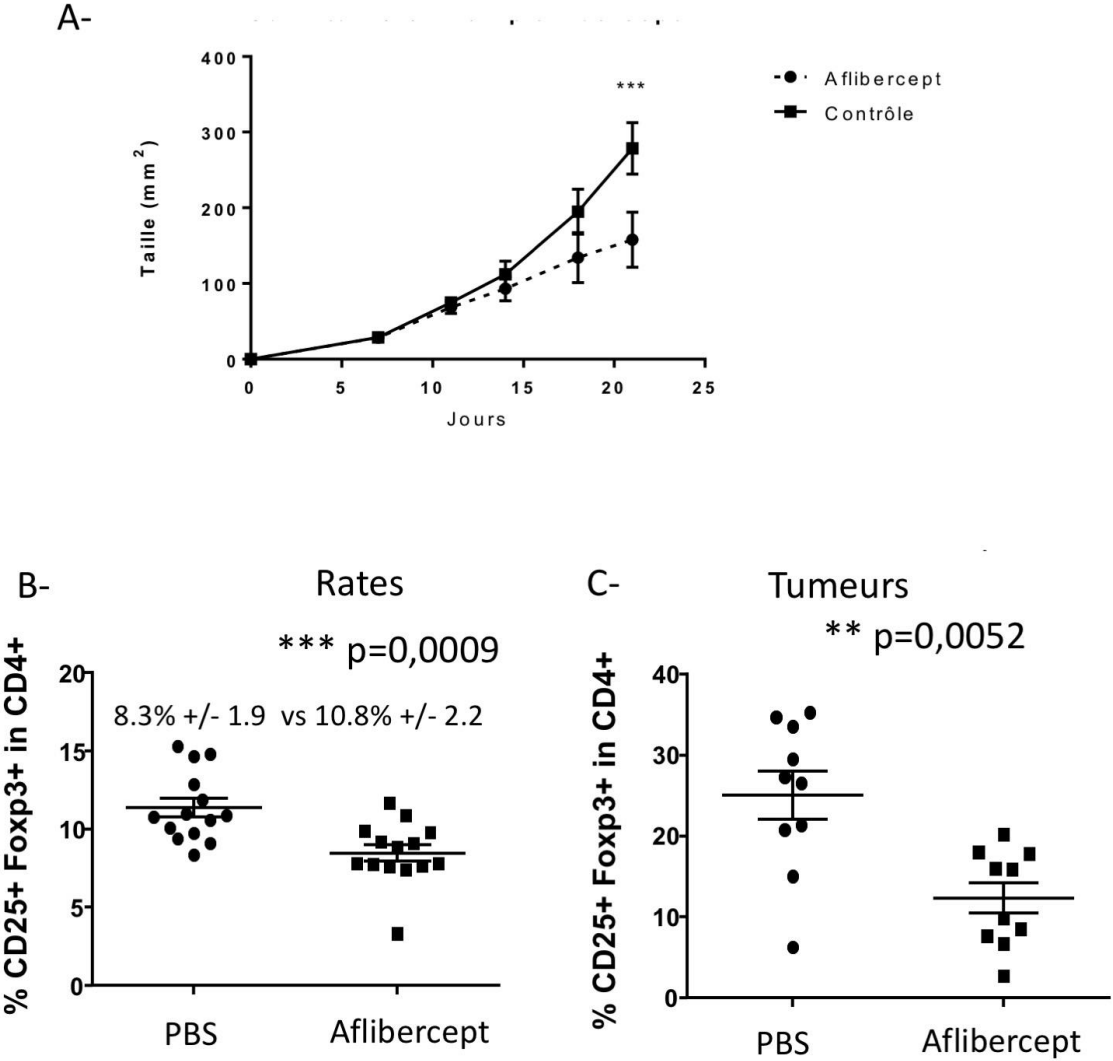


Figure 1

Figure 17 : L'aflibercept diminue les Treg

Des souris ont été injectées avec des cellules CT26 par voie sous-cutanée. Lorsque les tumeurs ont atteint environ 10mm², le traitement par aflibercept a été débuté. Les souris ont reçu de l'aflibercept par voie ip tous les 3 jours à la dose de 25mg/kg. En contrôle des souris ont reçu du PBS. La croissance tumorale d'une expérience représentative de 3 comprenant 5 souris par bras est rapportée en figure A. Après 2 semaines de traitement, les souris ont été sacrifiées, les rates et les tumeurs prélevées. Des marquages des Treg ont été réalisés par cytométrie en flux. Le pourcentage de Treg (CD25+Foxp3+) parmi les CD4 dans les rates et les tumeurs sont rapportés respectivement en panel B et C. Les résultats correspondent à 2 ou 3 expériences poolées comprenant chacune 4-5 souris par groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées selon le test de Mann-Whitney.

Caractérisation des Treg des souris porteuses de tumeurs

le phénotype des Treg en situation tumorale chez des souris porteuses de tumeurs CT26 a ensuite été analysé. Une augmentation de la proportion des Treg CD44^{high} représentant les Treg effecteurs/mémoires, était observée chez les souris porteuses de tumeur CT26, comparés aux souris non porteuses de tumeurs (34.7% +/- 2.4 vs 25.7% +/- 4.6 ; p=0.0079) (Figure 2.A.). Il était également observé une augmentation de la prolifération des Treg, caractérisée par le Ki67 (20.8% +/- 5.9 vs 14.4% +/- 1.3 ; p=0.0317) (Figure 2B), qui n'était retrouvé que dans la population des Treg effecteurs comme précédemment montré (Figure 2.E). Ainsi, la prolifération des Treg effecteurs est augmentée en situation tumorale, participant à leur accumulation dans la rate des souris.

Nous avons caractérisé les Treg Th1-like chez des souris porteuses de tumeurs CT26. La proportion de ces Treg Th1-like CXCR3⁺ dans les rates de souris porteuses de tumeurs CT26 était augmentée par rapport aux souris contrôles (Figure 2.C). De plus, chez les souris porteuses de tumeurs, la prolifération était plus importante dans les Treg Th1-like que dans les Treg CXCR3⁻, avec une expression plus forte du Ki67 (66,14 +/- 5.07% contre 17.1 +/- 7.26 % dans les CXCR3⁻) (Figure 2.E). Étant donné les liens entre les Treg Th1-like et les LT CD4⁺ Th1, nous avons analysé le ratio Th1-like/LT Th1. Le ratio Th1-like/LT Th1 était significativement augmenté dans les rates des souris porteuses de tumeurs comparées aux souris naïves (0.42 +/- 0.08 vs 0.13 +/- 0.03 ; p=0.0079) (Figure 2.D).

Ainsi, ces résultats suggèrent que la présence d'une tumeur CT26 chez la souris favorise l'accumulation de Treg Th1-like, et une modulation de l'équilibre Th1-like/Th1 en faveur des Treg. Ces phénomènes pourraient ainsi favoriser l'inhibition d'une réponse de type Th1, primordiale dans la réponse anti-tumorale.

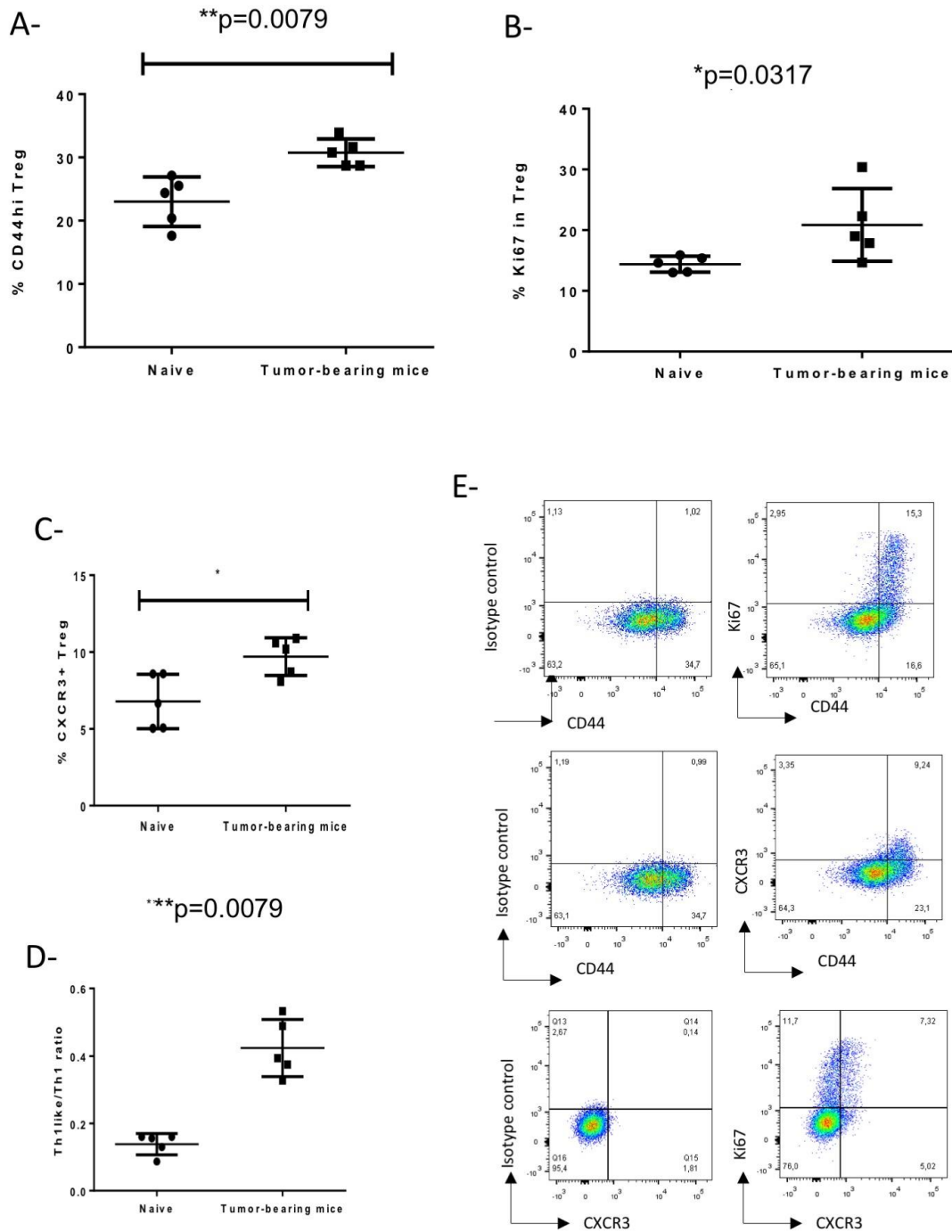


Figure 2

Figure 18 : Les Treg effecteurs et Th1-like sont augmentés dans le CCR chez la souris

Des souris ont été injectées avec des cellules CT26 par voie sous-cutanée. Après 3 semaines de croissance tumorale, les souris ont été sacrifiées, et les rates prélevées. En parallèle des rates ont été prélevées chez des souris naïves, non porteuses de tumeur. Des marquages des Treg et des sous-populations ont été réalisés par cytométrie en flux. Le pourcentage de Treg effecteurs (CD25+Foxp3+CD44^{high}) parmi les Treg dans les rates sont rapportés en panel A. La prolifération a été mesurée par le pourcentage des Ki67, rapportés en panel B. Le pourcentage de Treg Th1-like parmi les CD4, caractérisés par l'expression de CXCR3, et le ratio Treg Th1-like/Tconv Th1, sont présentés en panel C et D respectivement. Un exemple d'analyse en cytométrie de flux est présenté en E. Les résultats présentés en A, B, C, D sont les résultats d'une expérience représentative qui a été reproduite 3 fois. Les analyses statistiques ont été réalisées selon le test de Mann-Whitney.

Nous avons ensuite voulu évaluer l'impact de l'aflibercept sur la population de Treg effecteurs, et plus particulièrement sur la sous-population Treg TH1-like, dans le modèle murin CT26. Le phénotype des Treg dans les rates et les tumeurs de souris porteuses de tumeur CT26, traités par aflibercept ou par PBS (contrôle), a donc été analysé. Nous avons d'abord analysé la proportion de Treg CD44^{high} parmi les Treg, chez des souris traitées par aflibercept à la dose de 25mg/kg, comparé à des souris traitées par PBS (contrôle). La proportion de Treg CD44^{high} était significativement diminuée chez les souris traitées par aflibercept (21.1% +/- 2.6 vs 30.2 +/- 3.2 ; p=0.0079). L'impact de la dose d'aflibercept sur cette population de Treg a ensuite été évalué. Une précédente étude avait évalué dans plusieurs modèles murins, après traitement avec aflibercept à différentes doses, le niveau circulant de complexes aflibercept/ligand et en parallèle le niveau circulant d'aflibercept libre (Rudge PNAS 2007). Il a été montré dans cette étude qu'un niveau plateau de complexe aflibercept/ligand était obtenu à partir d'une dose de 2,5mg/kg, et qu'au-delà, seul le niveau d'aflibercept libre, donc biologiquement inactif, était augmenté. L'effet anti-tumoral était également lié au taux de complexes aflibercept/ligands, suggérant qu'un effet plateau était obtenu à 2,5mg/kg.

Dans notre modèle CT26, la diminution des Treg CD44^{high} était également dose dépendante pour des doses entre 0,1mg/kg et 2,5mg/kg, et une diminution significative était observée à partir de 2,5mg/kg. Au-delà de cette dose, un effet plateau était observé et les Treg CD44^{high} ne baissaient pas plus (figure 3.B). En parallèle, l'analyse de la croissance tumorale montrait également un ralentissement significatif de la croissance tumorale à partir de 2,5mg/kg, et qui n'augmentait pas aux doses supérieures. Ces résultats suggèrent que la baisse des CD44^{high} est liée directement au piégeage de ses ligands par l'aflibercept, représentée par le taux de complexes aflibercept/ligands.

D'autre part, l'aflibercept diminuait la prolifération des Treg (Fig. 3.C) principalement dû à une réduction de la prolifération des Treg effecteurs CD44^{high} dans les rates des souris porteuses de tumeur.

Enfin, nous avons analysé l'impact d'un traitement par aflibercept sur les LTreg Th1-like et le ratio Th1-like/Th1. Nous avons retrouvé chez les souris traitées par aflibercept une diminution significative du pourcentage des Treg Th1-like (10.3% +/- 1.5 vs 15.9% +/- 2.5 ; p=0.0079), et du ratio Th1-like/Th1.

Ainsi, l'aflibercept dans le modèle CT26 permet de diminuer la prolifération des Treg effecteurs, et de diminuer l'accumulation des Treg Th1-like, permettant une modulation de la balance Th1-like/Th1 en faveur d'une réponse Th1.

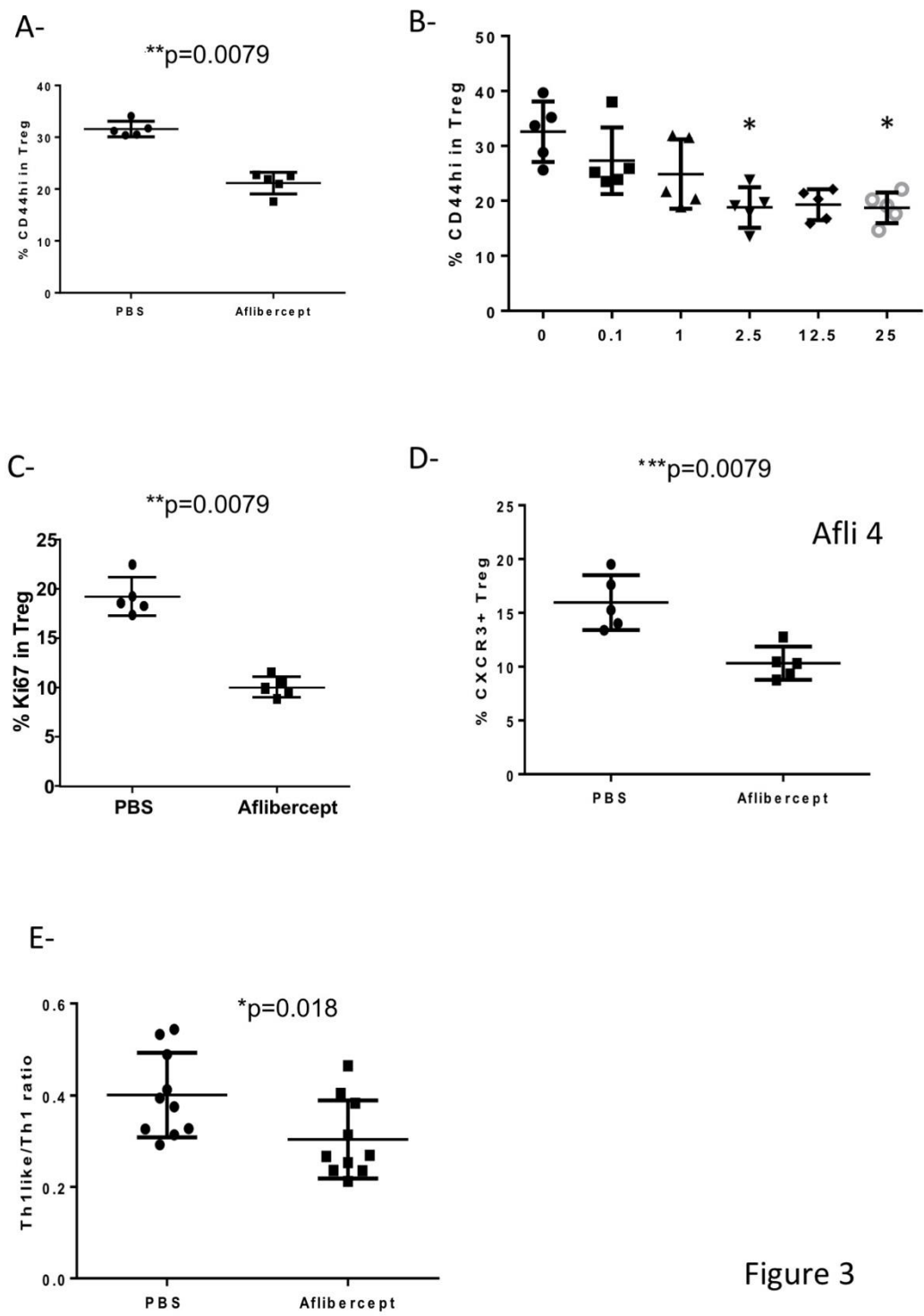


Figure 3

Figure 19 : Les Treg effecteurs et le Th1-like sont diminués par l’aflibercept chez la souris

Des souris ont été injectées avec des cellules CT26 par voie sous-cutanée. Lorsque les tumeurs ont atteint environ 10mm², le traitement par aflibercept a été débuté. Les souris ont reçu de l’aflibercept par voie ip tous les 3 jours à la dose de 25mg/kg pour les expériences représentées

dans les panels A, C, D, et E, tandis que des doses variables allant de 0,1mg/kg à 25mg/kg étaient administré dans le panel B. En contrôle des souris ont reçu du PBS. Après 2 semaines de traitement, les souris ont été sacrifiées, les rates ont été prélevées. Des marquages des Treg et de leurs sous-populations ont été réalisés par cytométrie en flux. Les pourcentages de Treg effecteurs (CD25⁺Foxp3⁺CD44^{high}) parmi les Treg dans les rates sont rapportés en panel A (aflibercept à 25mg/kg) et B (aflibercept à doses croissantes). Les pourcentages de Ki67 dans les Treg est représenté en panel C. Le pourcentage de Treg Th1-like dans les CD4, caractérisés par l'expression de CXCR3, et le ratio Treg Th1-like/Tconv Th-1 sont représentés en panel D et E. Les résultats correspondent à 1 expérience représentative de 2, comprenant chacune 5 souris par groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées selon le test de Mann-Whitney.

Enfin, nous avons voulu analyser les effets d'un traitement par aflibercept sur les Treg, et plus particulièrement sur les Treg effecteurs et Th1-like, chez des patients atteints de cancer colorectal métastatiques.

Nous avons tout d'abord analysé le phénotype des Treg dans une cohorte de patients ayant un CCRm avant la mise en route de tout traitement, comparé à des volontaires sains. Comme chez la souris, une population de Treg effecteurs/mémoires a été caractérisée grâce à l'expression du CD45RO et l'absence de CD45RA. Cette population semble être plus suppressive que la population exprimant CD45RA et n'exprimant pas le CD45RO (Miyara M Immunity 2009). Le pourcentage de Treg CD45RO⁺ était augmenté chez les patients atteints de CCRm avant tout traitement (64.2% +/- 12.3 vs 41.6% +/- 22.5 ; p= 0.0034) (Figure 4.A). De même, des populations de Treg Th-like ont été décrites chez l'homme. Les Treg Th1-like expriment comme leur homologues murins le facteur de transcription T-bet et le récepteur de chimiokines CXCR3. Le pourcentage de Treg Th1-like était également augmenté chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique par rapport aux volontaires sains (2.8% +/- 2 vs 1.3% +/- 0.9 ; p=0.0161) (Figure 4.B).

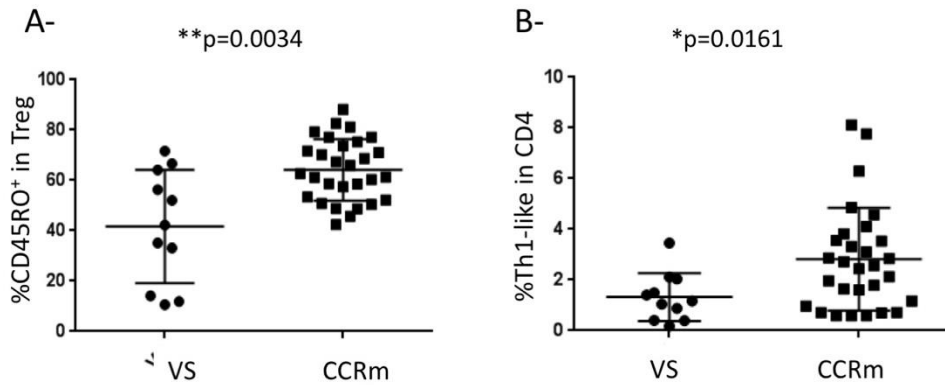


Figure 4

Figure 20 : Les Treg effecteurs et Th1-like sont augmentés dans les PBMC de patients atteints de CCRm

Des volontaires sains, ou des patients atteints de CCRm ont été prélevés avant tout traitement anti-tumoral. Après séparation des PBMC, les Treg (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}) et les sous-populations de Treg étaient analysées. Le pourcentage de Treg effecteurs CD45RO⁺ parmi les Treg est représenté en panel A. Le pourcentage de Treg Th1-like (CD45RO⁺CXCR3⁺) est représenté en panel B. Les analyses statistiques ont été réalisées selon le test de Mann-Whitney.

La proportion de Treg parmi les LT CD4⁺ a été par la suite évaluée chez des patients traités en première ligne par folfiri + aflibercept dans le cadre de l'essai FFCD 1302. Pour cela des prélèvements de sang avant la première cure, et après la 2^e cure (à J28) ont été obtenus de 23 patients inclus dans cette étude. Avant traitement, les patients, présentaient une proportion de Treg et de Treg effecteurs similaires à la population de la cohorte de patients atteints de CCRm présentée précédemment. Une analyse des Treg Th1-like a pu être réalisée chez 13 patients. Ces patients présentaient également une proportion de Treg Th1-like comparable à la 1^{ère} cohorte de patients CCRm.

Nous avons observé qu'après traitement par aflibercept, les patients avaient une baisse significative des Treg (3.2 +/- 1.2 vs 4.6% +/- 1.5 ; p<0.0001) (Figure 5.A), et que cette baisse était retrouvée chez tous les patients. Nous retrouvons également une diminution significative des Treg effecteurs dans le sang périphérique de ces patients (60.9% +/- 12.2 vs 69.8 +/- 9.6 ; p=0.0024) (Figure 5.B). Cependant, chez ces patients, le pourcentage de Ki67 dans les Treg n'était pas significativement diminué après traitement par aflibercept. Enfin, chez les 13 patients chez qui a pu être fait le phénotypage CXCR3, il n'y avait pas de baisse significative

des Treg Th1-like (2.1% +/- 2.1 vs 2.4% +/- 2.1, ns) (Figure 5.C). En revanche, le ratio Th1-like/Th1 était significativement diminué après traitement par l'aflibercept (0.043 +/- 0.02 vs 0.058 +/- 0.02 ; p= 0.0034) (Figure 5.D).

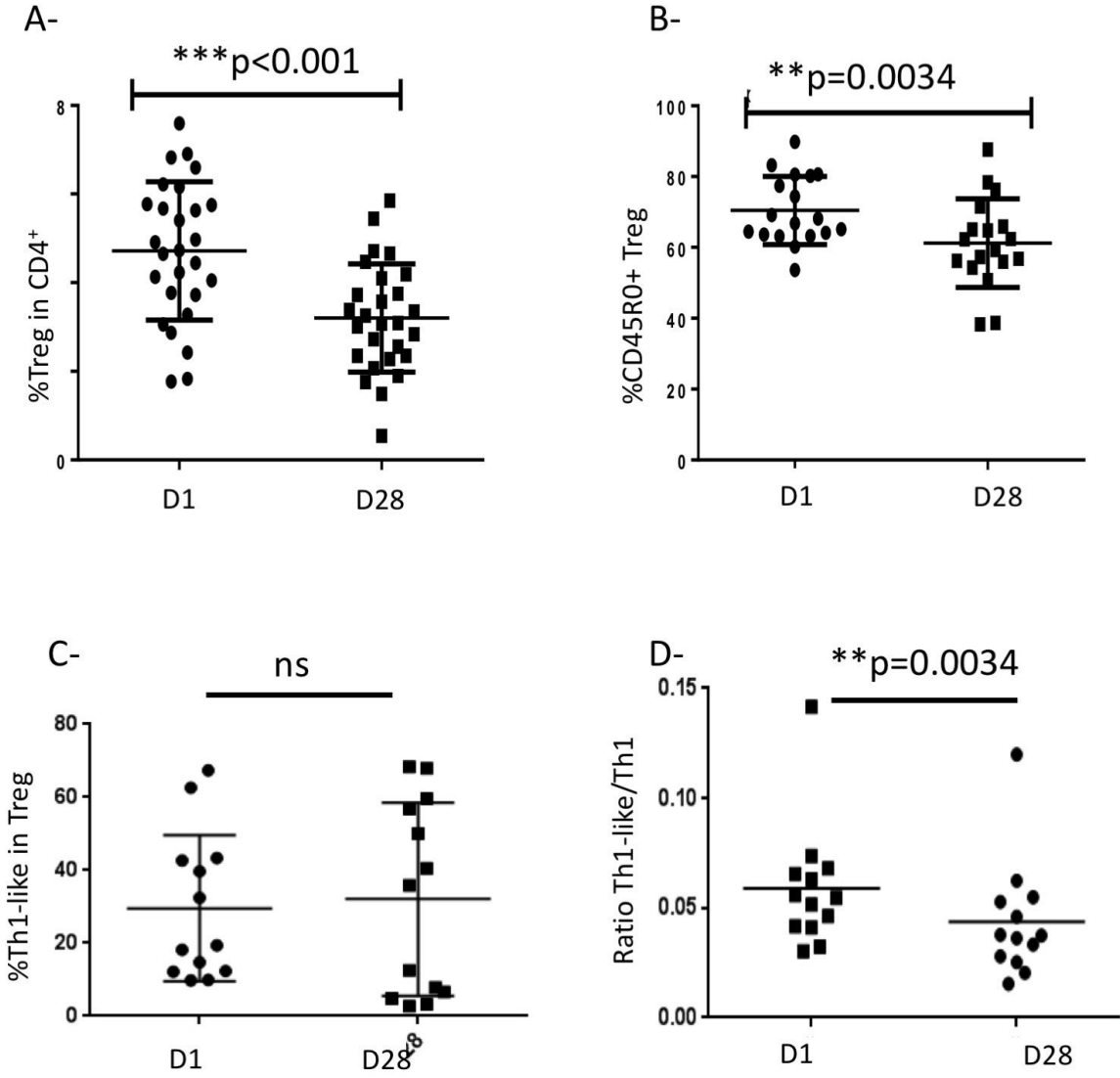


Figure 5

Figure 21 : Les Treg effecteurs et le ratio Th1-like/Th1 est diminué sous aflibercept dans les PBMC de patients atteints de CCRm

Des patients atteints de CCRm non prétraités ont été inclus dans l'essai FFCD 1302, dans lequel ils recevaient un traitement par folfiri + aflibercept tous les 14 jours en 1^{ère} ligne de traitement. Un prélèvement sanguin était réalisé avant traitement (D1) et après 2 cycles de traitement (D28). Le pourcentage de Treg dans les CD4⁺ (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}FOXP3⁺) était analysées après séparation des PBMC, ainsi que le pourcentage de CD45RO⁺ parmi les Treg, respectivement en panel A et B. Les Treg Th1-like (CD45RO⁺CXCR3⁺), et le ratio Treg Th1-like/Tconv Th1 ont été analysés chez 13 patients, et sont représentés en panel C et D. Les analyses statistiques ont été réalisées selon le test de Wilcoxon.

En conclusion, chez l'homme, les Treg Th1-like sont augmentés chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique, ainsi que le ratio Th1-like/Th1. Bien que nous n'observions pas de diminution significative du taux de Treg Th1-like, le ratio Th1-like/Th1 est significativement diminué après un traitement par chimiothérapie + aflibercept. Enfin, malgré une diminution marquée et quasiment systématique des Treg, nous n'avons pas retrouvé de diminution significative de la prolifération des Treg, suggérant l'existence d'autres mécanismes mis en jeu par le blocage concomitant de VEGF-A et PlGF. Ces résultats devront être confirmés dans des cohortes plus importantes, actuellement en cours d'inclusion.

Conclusion et perspectives :

Nous avons ainsi montré, dans un modèle murin et chez des patients atteints de cancer colorectal, que l'aflibercept était capable de diminuer la proportion de Treg périphériques et dans la tumeur (pour le modèle murin). De plus nous avons montré que l'aflibercept modulait particulièrement les Treg effecteurs CD45RO⁺. Enfin, nous avons observé que la proportion de Treg Th1-like, sous population de Treg effecteurs, était augmenté chez des patients atteints de CCRm, et diminué dans notre modèle murin CT26. Chez les patients atteints de CCRm, sous réserve d'un faible effectif, bien que nous n'ayons pas mise en évidence de baisse significative des Treg Th1-like, le ratio Treg Th1-like/Tconv Th1 était significativement diminué, suggérant un effet potentiel sur la réponse T CD4⁺ de type Th1. Cependant ces résultats doivent être confirmés dans de plus larges cohortes. Enfin, le rôle respectif du VEGF-A et du PlGF ou de leur blocage isolé ou combiné doivent être explorés.

Partie II : Étude de l'impact clinique de l'infiltrat immunitaire et des cellules immunitaires circulantes dans le cancer gastrique avancé.

Article 2: Infiltrating and peripheral immune cell analysis in advanced gastric cancer according to the Lauren classification and its prognostic significance

Simon Pernot, Magali Terme, Nina Radosevic-Robin, Florence Castan, Cécile Badoual, Elie Marcheteau, Frédérique Penault-Llorca, Olivier Bouche, Jaafar Bennouna, Eric Francois, Francois Ghiringhelli, Christelle De La Fouchardiere, Emmanuelle Samalin, Jean Baptiste Bachet, Christophe Borg, Valérie Boige, Thibault Voron, Trevor Stanbury, Eric Tartour, Sophie Gourgou, David Malka, Julien Taieb

Contexte :

Le cancer gastrique (CG) est un cancer fréquent. Les formes localement avancés et métastatiques ont un pronostic sombre. Plusieurs études de pièces opératoires ont montré la valeur pronostique favorable des LT CD8⁺ et des NK infiltrant la tumeur dans des CG localisés. La valeur des Treg est plus controversée. Mais la valeur pronostique des cellules immunitaires infiltrantes dans les formes localisées ne peut pas être extrapolée aux formes avancées, puisque cet infiltrat dépend du stade tumoral, et les mécanismes immunosuppresseurs sont plus importants au stade métastatique. Ces données n'ont à ce jour jamais été reproduites dans les formes avancées. De plus, aucune donnée n'est disponible concernant la valeur des cellules immunitaires circulantes dans le CG. Comme détaillé dans l'introduction, certains essais cliniques ont suggéré une efficacité des ICI dans les cancers gastriques avancés, tandis que plusieurs essais récents de phase III ne parvenaient pas à confirmer cette efficacité. Il a été observé qu'un faible nombre de patients bénéficiaient en fait de ces immunothérapies dans le CG avancé. Il existe une grande hétérogénéité des CG, et plusieurs groupes ont été identifiés. La classification la plus utilisée en pratique clinique est la classification histologique, basée sur

la classification de Lauren. Dans la classification de Lauren, les cancers sont classés en adénocarcinomes de type intestinaux, diffus, ou mixte. Une autre classification de l'OMS se superpose globalement à la classification de Lauren, les adénocarcinomes lieberkuhnien s'apparentant aux types intestinaux, et les adénocarcinomes à cellules indépendantes (ADCI) regroupant les types diffus, et mixtes avec un contingent ADCI >50%. Les adénocarcinomes de type diffus/mixtes sont en constante augmentation, contrairement aux types intestinaux, et représentent désormais 35-40% des CG. Tandis que ces deux formes sont très différentes sur le plan de l'épidémiologie, de la physiopathologie, du pronostic et de la chimiosensibilité, elles sont en général indistinctement incluses dans les essais cliniques, en particulier d'immunothérapie. Cependant, l'infiltrat immunitaire et la réponse immunitaire circulante de chacune de ces formes ne sont pas connus.

Une analyse des cellules immunitaires infiltrantes et circulantes a été réalisée dans le cadre d'une étude ancillaire d'un essai clinique prospectif randomisé de phase II, testant en première ligne de traitement une chimiothérapie seule, ou combinée soit à un anti-EGFR (panitumumab), soit à un anticorps ciblant la voie HGF/c-MET (anti-HGF, rilotumumab). Un des objectifs de cette étude ancillaire était d'étudier l'impact de la voie HGF/c-MET sur les Treg. Nous avons montré dans cette étude que les Treg étaient significativement diminués après traitement par chimiothérapie + rilotumumab, mais pas dans les autres bras de traitement. L'étude des mécanismes de la modulation des Treg par la voie HGF/c-MET sur la régulation des Treg font actuellement l'objet de travaux spécifiques au sein de notre équipe (Palle et al JFHOD 2018 ; Hirsch et al. ESMO 2018, annexes 2 et 3). Par ailleurs nous avons également en parallèle analysé les cellules tumorales circulantes. Si nous avons retrouvé que les CTC étaient pronostiques (Pernot et al, Eur J Cancer 2017 ; annexe 4) (549), nous n'avons pas retrouvé de corrélation avec les cellules immunitaires circulantes.

Cette étude ancillaire nous a également permis d'étudier la valeur pronostique et clinico-pathologique des cellules immunitaires infiltrantes et circulantes chez des patients atteints de CG avancé.

Patients et méthodes :

Nous avons inclus dans cette étude les patients atteints d'un cancer gastrique. Il s'agissait de patients atteints de maladie avancée non traités préalablement, et avec une preuve histologique d'un adénocarcinome gastrique de type intestinal, diffus ou mixte. Les types diffus et mixtes ont été regroupés pour couvrir les ADCI de la classification récente de l'OMS.

Les cellules immunitaires infiltrant la tumeur ont été analysées par immunohistochimie, réalisée de manière centralisée et dans un centre expert, avec une double lecture. Les cellules effectrices CD8⁺ et NK (CD57⁺) et les Treg (FOXP3⁺) ont été quantifiées sur le matériel biologique ayant permis le diagnostic histologique. L'expression des protéines MMR a également été analysée. En parallèle, les cellules effectrices (LT CD4⁺, LT CD8⁺, NK) et suppressives (Treg, MDSC) ont été étudiées dans le sang périphériques des patients, avant le 1^{er} cycle de traitement, par cytométrie de flux.

Principaux résultats :

Les tissus et prélèvements de sang périphérique de 67 patients ont été inclus dans cette étude. Parmi les cellules immunitaires circulantes, la proportion de Treg et de NK était significativement plus faible dans le groupe des CG de type diffus/mixtes, comparé aux CG de type intestinaux. Parmi les cellules immunitaires infiltrantes, les TIL CD8⁺ étaient significativement moins nombreux dans le groupe des CG diffus/mixtes. Les tumeurs MSI/dMMR sont connues pour avoir un infiltrat plus important en LT CD8⁺ que les tumeurs MSS/pMMR. De plus, les CG MSI/dMMR sont généralement associé au type intestinal. Nous avons donc analysé, après exclusion des tumeurs MSI/dMMR, l'infiltrat CD8⁺ chez les patients présentant un phénotype MSS/pMMR. La différence d'infiltrat CD8⁺ était également retrouvée dans ce sous-groupe de patients, et ne peut donc pas être expliqué par les formes MSI/dMMR. Par ailleurs nous avons retrouvé que l'infiltrat en LT CD8⁺ était associé à une meilleure survie globale en analyse univariée et multivariée. Cette valeur pronostique était conservée dans le sous-groupe de type intestinal. Le taux de NK circulant était également associé à une meilleure survie globale en analyse univariée, avec une tendance non significative en multivariée.

Conclusion :

Nous avons mis en évidence pour la première fois que les formes diffuses/mixtes sont moins infiltrées par les LT CD8⁺, indépendamment du statut MMR, et qu'elles entraînent une réaction immunitaire plus faible, à la fois sur le plan de la réponse effectrice (CD8⁺ infiltrants et NK circulants) et sur le plan de la réponse suppressive (Treg). Ces résultats suggèrent que les formes diffuses/mixtes pourraient être des tumeurs froides (cold tumor) ignorées par le système immunitaire de l'hôte. Elles seraient donc susceptibles de répondre moins bien à une stratégie d'immunothérapie non spécifique, et devraient donc être distinguées des types intestinaux dans les stratégies actuelles d'immunothérapies. Afin de permettre une réponse immunitaire efficace,

elles pourraient nécessiter des stratégies outrepassant ces mécanismes d'ignorance immunitaire telle que les CAR T cells.

En revanche, la valeur pronostique des TIL CD8⁺ et des NK circulants souligne l'importance de la réponse immunitaire effectrice intra-tumorale et systémique dans les CG avancées, et fournissent un rationnel important pour l'immunothérapie dans les CG de type intestinaux.



Infiltrating and peripheral immune cell analysis in advanced gastric cancer according to the Lauren classification and its prognostic significance

Simon Pernot^{1,2} · Magali Terme¹ · Nina Radosevic-Robin³ · Florence Castan⁴ · Cécile Badoual^{1,5} · Elie Marcheteau¹ · Frédérique Penault-Llorca³ · Olivier Bouche⁶ · Jaafar Bennouna⁷ · Eric Francois⁸ · Francois Ghiringhelli⁹ · Christelle De La Fouchardiere¹⁰ · Emmanuelle Samalin¹¹ · Jean Baptiste Bachet¹² · Christophe Borg¹³ · Valérie Boige¹⁴ · Thibault Voron¹ · Trevor Stanbury¹⁵ · Eric Tartour¹ · Sophie Gourgou⁴ · David Malka¹⁴ · Julien Taieb^{1,2}

Received: 20 February 2019 / Accepted: 25 June 2019

© The International Gastric Cancer Association and The Japanese Gastric Cancer Association 2019

Abstract

Background The correlation between immune cells and the Lauren classification subtypes and their prognostic impact in advanced gastric cancer (AGC) are unknown.

Methods Circulating natural killer (NK) cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells, regulatory T cells (Tregs) and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) were quantified in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 67 patients with untreated AGC enrolled in the PRODIGE 17-ACCORD 20 trial. CD56⁺ cells (NK), CD8⁺, and FoxP3⁺ (Treg) tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) were assessed in tumor samples.

Results Circulating NK and Treg proportions were significantly lower in patients with diffuse/mixed-type AGC ($n=27$) than those with intestinal type ($n=40$; median 6.3% vs 11.5%; $p=0.02$ and median 3.3% vs 5.2%; $p=0.03$, respectively). Proportions of circulating MDSC, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were not associated with one pathological type. Among tumor-infiltrating cells, CD8⁺ T cells, but not NK or FoxP3⁺ cells, were significantly lower in diffuse/mixed-type AGC (median 21 vs 59 cells/field; $p=0.009$). Patients with high circulating NK cell counts (> 17%) had a better overall survival than those with < 17% (HR 0.40; 95% CI [0.15–1.06]; $p=0.04$). Patients with high CD8⁺ TIL counts (> 31 cells/field) had significantly longer overall survival (HR 0.44; 95% CI [0.21–0.92]; $p=0.02$). The prognostic value of CD8⁺ TILs was maintained after adjustment for confounding factors, including the Lauren classification (HR = 0.42; 95% CI [0.18–0.96]; $p=0.039$).

Conclusion Diffuse/mixed-type AGC has lower rates of CD8⁺ TILs and circulating NK cells and Tregs than the intestinal type. This “cold tumor” phenotype may be associated with a worse outcome.

Keywords Advanced gastric adenocarcinoma · Biomarker · CD8⁺ T lymphocytes · Natural killer cells · Regulatory T cells

Introduction

Gastric cancer (GC) is the third leading cause of cancer-related death in the world [1]. Immunity plays a key role in carcinogenesis and tumor progression, with immune modulation currently an important strategy for improving cancer therapy. Among effector cells, CD8⁺ T lymphocytes and natural killer cells (NK) play a major role in immunosurveillance. On the other hand, regulatory T cells (Tregs) and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) have emerged as an important contributor to tumor progression in different tumor types [2, 3]. A higher density of immune cells in resected GC patients, in particular CD8⁺ T cells

Simon Pernot and Magali Terme contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10120-019-00983-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Simon Pernot
simon.pernot@aphp.fr

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 02 July 2019

Springer

and NK, has been associated with more favorable clinical outcomes [4–7]. Despite immunotherapies being tested in advanced GC (AGC), little is known about the prognostic role of immune cells in these patients. It is important that data from resected GC studies are not extrapolated to AGC, since PD-L1 expression and infiltration of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) differ with disease stage [8] and with the development of immune escape mechanisms with metastatic progression [6, 7]. Moreover, during metastatic dissemination, TILs and circulating immune cells could present a different profile and different clinical significance [9]. Circulating cells may reflect the general immune status of the patient and probably its ability to mount or maintain an efficient immune response against the tumor. The presence of immune cells in the tumor is linked to their capacity to migrate into the tumor but also for T cells to their priming. The clinical significance of circulating cells has never been assessed to our knowledge in metastatic gastric cancer.

Clinical trials evaluating immune checkpoint blockade in AGC have yielded conflicting results. Phase I–III trials have shown interesting efficacy results with anti-PD-1, anti-CTLA-4, and combination therapies [10–12]. However, both pembrolizumab and avelumab recently failed to extend survival in phase III trials, compared to chemotherapy, in pre-treated AGC patients [13, 14]. These controversial results highlight that not all AGC patients may benefit from immunotherapies and that careful identification and selection of patients will be required.

GC is a heterogeneous cancer with various forms depending on epidemiology, oncogenesis, pathology and molecular profile. The Lauren classification, the most widely used in clinical practice and trials, considers three types of GCs according to histologic features: intestinal, diffuse, and mixed types [15]. The diffuse type occurs more frequently in younger patients and in females compared with the intestinal type. Despite a decrease in the overall incidence of GC in recent decades, the incidence of the diffuse/mixed types increased tenfold between 1970 and 2000 [16–18], accounting for 35–45% of GC cases. Diffuse-type AGC is generally thought to have a worse prognosis and lower chemosensitivity than the intestinal type [19]. Recent reports showed a difference in PD-L1 expression among the different histological types [8, 20, 21]. However, data on circulating and TILs in intestinal and diffuse/mixed AGC are lacking.

The aim of our study was to determine the immune status of AGC patients by analyzing circulating cells and TILs and compare the immune profile of patients with diffuse/mixed type and intestinal type. Analysis of immune circulating and tumor-infiltrating cells could provide different information. Indeed, circulating cells may reflect the general immune status of the patient and probably its ability to mount or maintain an efficient immune response against the tumor. The presence of immune cells in the tumor is linked to their

capacity to migrate into the tumor but also for T cells to their priming. The prognostic value of these parameters has also been assessed.

Materials and methods

Patients

Patients with AGC enrolled in the multicenter PRODIGE 17-ACCORD 20 (MEGA) trial were asked to participate in this ancillary study. Patients with gastroesophageal junction or esophageal adenocarcinoma were not included in this immune cell analysis. To avoid heterogeneity and due to different epidemiology and pathogenesis [22], EGJA were excluded from the present analysis. The trial eligibility criteria and treatments were reported previously [22]. Briefly, patients with histologically proven, locally advanced or metastatic gastric adenocarcinoma with no prior treatment for advanced disease were eligible. Histological subtypes were reported according to the Lauren classification, assessed prospectively by the pathologist from the investigation center. Mixed type was defined by a dual pattern of differentiation—glandular/solid (intestinal) and isolated-cell carcinoma (diffuse), according to the Lauren classification. We grouped together diffuse and mixed types to cover all the signet ring cell carcinomas according to the most recent World Health Organization (WHO) classification.

Assessment of circulating and intratumoral immune cells was planned in the initial design of the trial and was part of the full study protocol, with specific informed consent required for all patients participating in this ancillary study. The trial was registered with the US and French National Institutes of Health registries (NCT01443065, EudraCT No. 2009-012797-12). The study protocol was approved by a French national ethics committee. The results from the therapeutic trial were previously reported. All combination regimens reached the primary study endpoint for efficacy, with no major differences [22].

Flow cytometry

Peripheral blood samples were collected before the first treatment cycle. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized peripheral blood on Ficoll–Hypaque gradients as previously described [23]. Fresh PBMCs from patients were stained with antibodies targeting CD4 (clone OKT4; Biolegend), CD8 (clone HIT8a; Biolegend), CD25 (clone BC96, Invitrogen), CD127 (clone eBioRDR5; Thermo Fisher), CD3 (clone UCHT1; Thermo Fisher), CD19 (clone HCD56; Biolegend) and CD56, CD33 (clone WM53, Biolegend), HLA-DR (clone LN3; Biolegend), CD14 (clone 61D3, Thermo Fisher), and

CD15 (clone HI98; Biolegend). Intracellular staining for anti-human FoxP3 (clone PCH101; Thermo Fisher) was done after fixation and permeabilization with the FoxP3 staining set (Thermo Fisher).

Isotype controls were used as negative controls. Dead cells were eliminated using the Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Kit (Thermo Fisher). Stained cells were analyzed on a LSRII cytofluorometer using FACS Diva (Becton Dickinson) and Flow-Jo Software (TreeStar).

Pathology and immunohistochemistry (IHC)

Four-micron sections of formalin-fixed, paraffin-embedded primary or metastatic GC tissue samples were submitted for TIL phenotyping with the following antibodies: anti-CD8 (clone SP16; Cell Marque, Rocklin, CA, USA), anti-FoxP3 (clone SP97; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) and anti-CD57 (clone NK-1; Cell Marque). Specimens were selected by the local pathologist. Centralized analysis was then performed by two independent observers. All IHC procedures were performed in a fully closed platform (Benchmark XT, Ventana/Roche). The number of TILs expressing each antigen was determined as the mean value of counts in each of three representative high-power microscopic fields, representing approximately 1 mm² (field diameter/surface 0.625 mm/0.31 mm², Axiophot 2, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany).

When more than three fields were available, the “hot-spot” method was used, consisting of selecting fields with the most abundant lymphocytic infiltration. The selection was done in the same manner in intestinal or diffuse/mixed type. Mismatch repair (MMR) tumor status was determined by IHC. MSI phenotype was defined by the loss of MLH1/PMS2 or MSH2/MSH6.

Statistical evaluation

The median proportions of immune cells were compared between baseline characteristics using the Kruskal–Wallis test.

Overall survival (OS) was defined as the time from randomization to death, from any cause. OS was estimated by the Kaplan–Meier method. Patients alive at the time of analysis were censored on the date of last informative follow-up. Univariate and multivariate analyses were performed using the Cox proportional hazard model to estimate the hazard ratio (HR) and the 95% confidence interval (CI). Comparisons were performed using the log-rank test. Median follow-up was estimated with the inverse Kaplan–Meier method.

A *p* value less than 0.05 was regarded as significant. All statistical tests were two-sided.

The statistical analyses were performed using STATA Version 13 (Texas, USA).

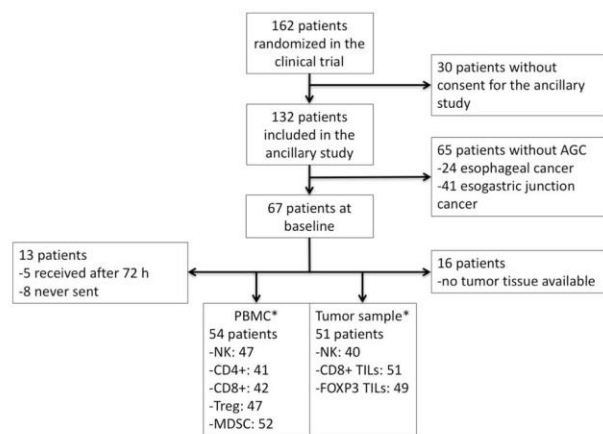
Results

Population and patient characteristics

The PRODIGE 17-ACCORD 20 (MEGA) trial included 162 patients. After exclusion of patients with esophageal and gastroesophageal junction adenocarcinomas, 67 patients with AGC were included in the present ancillary study. The patient and disease characteristics at baseline are shown in Table 1. Circulating NK cells were analyzed in 47 patients, CD4⁺ T cells in 41, CD8⁺ T cells in 42, Tregs in 47, and MDSCs in 52 (Fig. 1). Tumor sample (formalin-fixed, paraffin-embedded block with tumor tissue) was available in 51 patients, with a median number of H&E slides of 5 (range 1–15). Concerning the TILs, 51 samples were analyzed for CD8⁺, 40 for NK, and 49 for FoxP3. We were able to analyze MMR status

Table 1 Patient characteristics

	<i>N</i>	%
Age (years)		
Median (range)	64 (34–83)	
Sex		
Male	33	49.3
Female	34	50.7
ECOG		
0	19	28.8
1	47	71.2
Lauren classification		
Diffuse/mixed type	27	40.3
Intestinal type	40	59.7
Disease stage		
Locally advanced	1	1.5
1 Metastatic site	32	47.8
> 1 Metastatic site	34	50.7
Stage at diagnosis		
Synchronous metastasis	55	83.3
Metachronous metastasis	11	16.7
Site of pathological diagnosis		
Primitive tumor	57	89.1
Metastasis	6	9.3
NP	1	1.6
Type of material		
Biopsy specimen	40	62.5
Operative specimen	11	17.2
NA	13	20.3
MMR status		
MSI	2	3.1
MSS	35	54.7
ND	27	42.2



*: all staining were not performed on all patients samples due to insufficient material or uninterpretable staining

Fig. 1 Flowchart. Staining data were not available for all patient samples, because of insufficient material or uninterpretable staining

in 37 samples, the remaining were not interpretable due to insufficient material. MSI phenotype was found in 2 patients with intestinal type, and MSS phenotype in 35 patients (in 23 patients with intestinal type and 12 with diffuse/mixed type).

Circulating immune cells

Percentages of circulating effector cells in PBMCs were assessed by flow cytometry as follows: NK cells: $CD56^+ CD3^-$; $CD4^+$ T cells: $CD3^+ CD4^+$; $CD8^+$ T cells: $CD3^+ CD8^+$ (Suppl. Table 1). We previously reported the prognostic value of dynamic evolution of circulating tumor cells (CTC) from patients of this study [24]. We did not find any correlation between CTC count and circulating immune cells (data not shown), within the limitation of small number of patients evaluated for both CTC and immune cells. Among effector cells, NK cell proportions were significantly lower in PBMCs of patients with diffuse/mixed-type GC than in those with intestinal-type GC (median 6.3% vs 11.5%; $p=0.02$) (Fig. 2; Suppl. Table 2). No differences were observed in $CD4^+$ T cell (median 37.1% vs 38.1%; $p=0.55$) and $CD8^+$ T cell (median 21.9% vs 20.7%; $p=0.81$) percentages. The immunomodulatory $CD56^{\text{bright}}$ NK cell subset and NKT cells were not enriched within a specific pathological type. Immunosuppressive cells such as Tregs ($CD25^{\text{high}} CD127^{\text{low}} \text{FoxP3}^+$ in $CD4^+$ cells) and MDSC $CD33^+$ (Lin^- ; $CD3^- CD19^- CD56^-$) were also assessed (Suppl. Table 1). Tregs were significantly lower in PBMCs of patients with diffuse/mixed-type GC compared with intestinal-type GC (median 3.3% vs 5.2%; $p=0.03$), but not MDSCs (median 11.8% vs 13.6%; $p=0.71$) (Fig. 2; Suppl. Table 3). Thus, the general immune status of patients

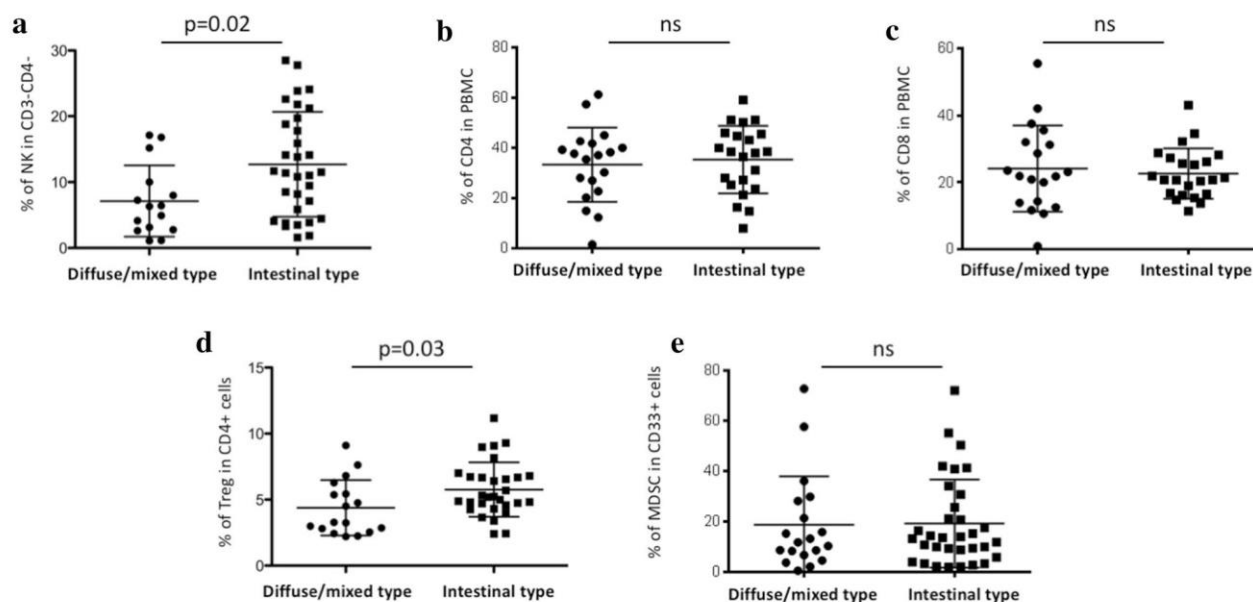


Fig. 2 Comparison of circulating cells between intestinal and diffuse/mixed-type AGC. The proportion of different subsets of effector immune cells was analyzed by flow cytometry in the peripheral blood of patients with diffuse and mixed-type or with intestinal-type AGC at diagnosis: **a** natural killer cell proportion ($CD3^- CD56^+$ cells); **b**

$CD4^+$ T cell proportion ($CD3^+ CD4^+$ cells); **c** $CD8^+$ T cell proportion ($CD3^+ CD8^+$ cells); different subsets of regulatory cells were also analyzed: **d** Treg proportion ($CD25^{\text{high}} \text{Foxp3}^+ CD127^{\text{low}}$ cells among $CD4^+$ cells); **e** MDSC proportion ($\text{Lin}^- \text{DR}^-$ cells among $CD33^+$ cells)

with diffuse/mixed-type AGC differs from those with intestinal-type AGC, with a lower proportion of circulating NK cells and Tregs.

Tumor-infiltrating immune cells

We then assessed the presence of tumor-infiltrating immune cells (CD8⁺ cells, CD57⁺ NK cells, and FoxP3⁺ cells), by IHC (Suppl. Table 2; Suppl. Figure 1).

Unlike circulating NK cells, tumor-infiltrating NK cells did not differ between the diffuse/mixed and intestinal types. However, the median number of NK cells infiltrating the tumors was very low (median 2.0 cells per field) (Suppl. Table 2). In comparison to infiltrating NK cells, the median number of CD8⁺ T cells and the median number of FoxP3⁺ cells infiltrating the tumor was 15 times higher (31 CD8⁺ cells per field) and 20 times higher (40 FoxP3⁺ cells per field), respectively. Infiltration of FoxP3-expressing cells did not correlate with histological type. However, the median number of CD8⁺ TILs was significantly lower in diffuse/mixed-type AGC (21 cells per field) compared with intestinal-type AGC (59 cells per field), $p=0.009$ (Fig. 3; Suppl. Table 4). The significant difference between intestinal and diffuse/mixed-type AGC was still observed after excluding MSI tumors among tumors with MSS phenotype (Suppl. Figure 2). Thus, intestinal-type AGCs were more infiltrated by CD8⁺ T cells than diffuse/mixed-type AGCs.

Prognostic impact of immune circulating and tumor-infiltrating cells

Patients with NK cells > 17% (higher quartile) had a significantly longer OS compared with those with ≤ 17% NK cells in univariate analysis (HR 0.40; 95% CI [0.15–1.06]; $p=0.04$) (Fig. 4; Suppl. Table 5). Patients with NK > 17%, adjusted for histological type, age, and ECOG performance status, had a non-significant trend

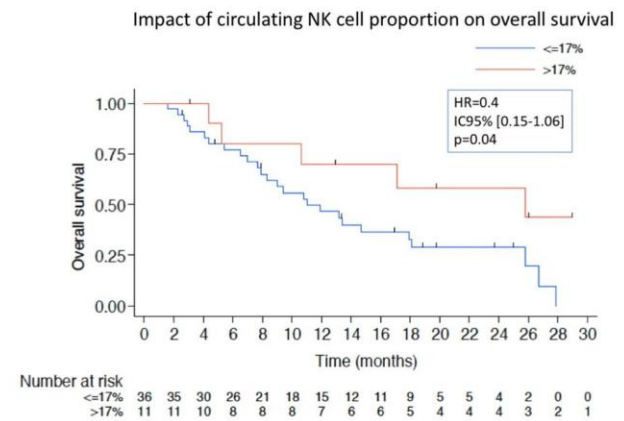


Fig. 4 Impact of circulating NK cell counts on overall survival 95% CI

toward OS benefit in multivariate analyses (HR 0.45; 95% CI [0.16–1.27]; $p=0.13$) (Suppl. Table 5). The prognostic impact of circulating CD4 and CD8 was also analyzed but none were associated with OS. Immunosuppressive Treg cells and MDSCs were not prognostic factors of OS (Suppl. Table 5).

Concerning tumor-infiltrating cells, FoxP3⁺ cells had no prognostic effect (Suppl. Table 5). However, CD8 TILs were correlated with OS. OS for patients with more than 31 CD8⁺ TILs per field (above the median) was significantly longer than OS for patients with ≤ 31 CD8⁺ TILs (HR 0.44; 95% CI [0.21–0.92]; $p=0.02$) (Fig. 5). In multivariate analysis with adjustment for pathological type, age, and ECOG performance status, the CD8⁺ TIL count was the only independent factor for OS (HR 0.42; 95% CI [0.18–0.96]; $p=0.039$) (Suppl. Table 5).

The association of CD8 TIL counts and OS was observed in the intestinal-type subgroup (HR 0.39; 95% CI [0.16–0.98]; $p=0.047$). In the diffuse/mixed-type, patients

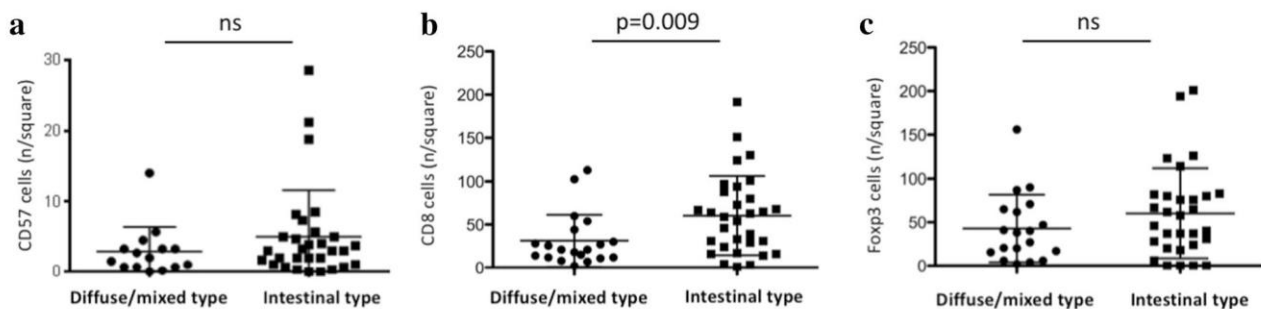


Fig. 3 Comparison of TI cells between intestinal and diffuse/mixed-type AGC. The count of different subsets of tumor-infiltrating effector and regulatory immune cells was analyzed in tumor samples of patients with diffuse- and mixed-type or with intestinal-type AGC

at diagnosis, by immunohistochemistry: **a** natural killer cell count (CD57⁺ cells); **b** CD8⁺ T cell count (CD8⁺ cells); **c** Treg count (Foxp3⁺)

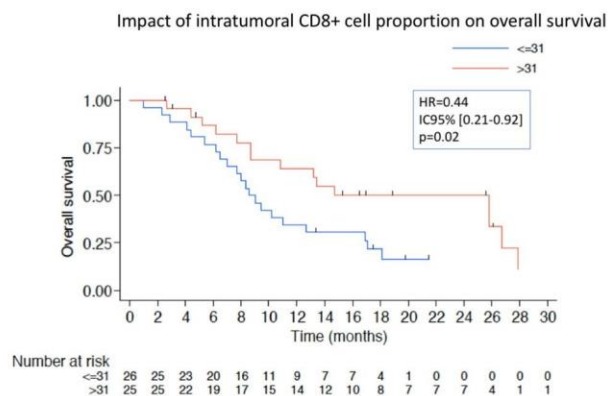


Fig. 5 Impact of intratumoral CD8⁺ cell counts on overall survival 95% CI

with > 31 CD8⁺ TILs per field tended to have better OS (HR 0.35; 95% CI [0.08–1.60]; $p = 0.13$).

Discussion

Gastric cancer is a heterogeneous disease and the two main histological tumor types (diffuse/mixed or intestinal) exhibit different outcomes. Immune cells have a pivotal role in controlling tumor development. In this study, we took advantage of a prospective, multicenter trial to compare the immune profile of patients with diffuse/mixed or intestinal AGC. We observed lower circulating NK cell and Treg proportions, as well as lower CD8 TILs in diffuse/mixed-type AGC than in intestinal-type AGC. Moreover, we showed that CD8 TILs and circulating NK cells have a prognostic role in OS in AGC, which supports the hypothesis that the innate and adaptive immune response could play a role in tumor control. As far as we know, our study is the first to show that immune cells occur in different proportions in diffuse/mixed and intestinal types of AGCs, and to provide evidence of the prognostic value of CD8 TILs and circulating NK cells in AGC.

In a study in AGC patients using RNAscope, PD-L1 had a decreased expression in diffuse GC compared to intestinal-type AGC [21]. Thus, our observations (low CD8 T cell infiltration) combined with other (low PD-L1) in diffuse-type AGC can lead to hypothesize that diffuse-type AGC might be a “cold tumor” [25]. Furthermore, analysis of circulating cells showed that in diffuse-type NK cells and Treg are less abundant than in intestinal type. All these points suggest that diffuse type of AGC may represent an immunologically ignorant phenotype [26].

Several mechanisms contributing to this immunologically ignorant phenotype have been described in diffuse-type AGC. First, a genomically stable tumor subtype

enriched for the diffuse histological variant reportedly had a lower mutational load and did not exhibit PD-L1 expression [27]. Second, a lower expression of HLA-DR antigen, a class II HLA antigen, has been described in diffuse-type GC [28]. This lower expression may impair the antigen-presenting capability of antigen-presenting cells [29]. In addition to HLA class II, it could be of interesting to assess expression of class I HLA in further studies, which could specifically modulate antigen recognition to CD8⁺ T cell. Finally, an epithelial (E)-cadherin deficiency, due to CDH1 mutation, is a driver process in diffuse-type or signet ring cell carcinomas oncogenesis initiation [30]. In addition, E-cadherin also plays a role in CD8⁺ T cell accumulation in epithelial tissues [31]. Other components of the stroma and the tumor microenvironment content could be implied in the differential immune phenotype of diffuse and intestinal type. By example, Vascular Endothelial Growth Factor, key factor for angiogenesis, is also known to be an important modulator factor of immune cells such as Treg or of exhaustion of CD8⁺ T cells [32, 33]. Tumor vasculature could also modulate migration of immune cells into the tumor [34]. Previous reports showed that VEGF expression and tumor is lower in diffuse-type compared to intestinal-type GC [35, 36]. Other components as cancer-associated fibroblasts regulating TGF β signaling have been described in diffuse-type GC and could be implied in the “cold tumor” phenotype [37]. Therefore, future studies providing an analysis of these different components and a correlation with TILs could be of interest to improve understanding of the mechanisms leading to low TILs infiltration of diffuse-type GC.

The immunologically ignorant phenotype of diffuse/mixed-type AGC may also result in a lower sensitivity to immune checkpoint inhibitors of this tumor subtype. Successful anti-tumor immune response after PD-1/PD-L1 blockade requires reactivation and clonal proliferation of TILs [38], and is associated with tumor mutational load [21]. Recently, the results of the KEYNOTE 061 trial showed no benefit of pembrolizumab compared to palliative second-line chemotherapy in patients with AGC [13]. However, there was a trend toward pembrolizumab efficacy in intestinal-type AGC patients (HR 0.66; 95% CI [0.40–1.11]), but not in those with diffuse-type AGC (HR 0.88; 95% CI [0.54–1.45]).

In our study, the prognostic value of CD8 TILs and circulating NK cells regarding survival underlies the clinical meaning of the different immune subsets in diffuse-type and intestinal-type AGCs. The impact of CD8 TILs was maintained in the intestinal-type subgroup, with a non-significant trend observed in the diffuse/mixed subgroup. This suggests that survival may depend more on CD8 infiltration than histological type, which was not per se prognostic in our study. Therefore, a lower CD8 infiltration in

patients with diffuse-type tumors in our study may partly explain the worse prognosis observed compared to other studies.

The role of NK cells is well known in resected GC. Several studies have reported an increased OS in patients with a high intratumoral number of NK cells [39–41]. In our study, we found that circulating NK cells had a prognostic role in OS, but not intratumoral NK cells. The low impact of intratumoral NK cells could be due to the low infiltration of NK cells in metastatic GC compared with localized GC. We did not find any association between other immune cell subsets and survival, in particular with Tregs and MDSCs. The prognostic impact of Tregs remains controversial in GC, with studies reporting contrasting results [5].

The limited number of patients with available tumor samples in our study is a clear limitation of the present work. Moreover, the small tumor samples received for some patients allowed us to do only part of the planned analyses for some specimens. This may have prevented both the detection of the prognostic value of other immune cells and the analysis of the immune signature by combining parameters. Moreover, tumor biopsies, used for IHC assessments, may not represent the intratumoral heterogeneity. Finally, MSI tumors and EBV-positive cancers have been shown to be crucial predictors of efficacy of immunotherapy in gastric cancer and to have increased TILs. Due to poor availability of tumor tissue, we did not assess EBV status, and cannot exclude that it could be confounding factors, even if EBV gastric cancer are generally estimated to be only 5–10% [42]. However, in our study, MSI phenotype was found in only two specimens and the high TILs infiltration in intestinal compared to diffuse/mixed was observed regardless the MMR status. In conclusion, our study in patients prospectively randomized in a multicenter clinical trial shows that diffuse/mixed-type AGC has lower local and systemic immunogenicity, with a decreased number of effector CD8 TILs and circulating NK cells, but also decreased immunosuppressive Tregs compared to intestinal GC. This suggests that diffuse/mixed AGC could be an immunologically ignorant tumor. This immunological profile could contribute to a worse prognosis in patients with diffuse-type AGC and a lower sensitivity to immunotherapy. If these results are confirmed, the efficacy of immunotherapies will need to be evaluated according to the histological/pathological type of AGC. In particular, combined treatment to overcome some mechanisms of immune ignorance, such as CAR T Cells [43], may be of interest in diffuse-type AGC and should be evaluated. Moreover, our study is the first to demonstrate the prognostic implication of CD8⁺ TILs and circulating NK cells in AGC, providing a crucial rationale for immunotherapies in intestinal-type AGC.

Acknowledgements This work was supported by Amgen.

Funding The funding source had no involvement in study design, the collection, or analysis and interpretation of data.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Dr. Pernot reports grants from Amgen, during the conduct of the study; personal fees and non-financial support from Amgen, personal fees and non-financial support from Servier, non-financial support from Bayer, outside the submitted work. Dr. Terme reports personal fees from Roche, personal fees from Gilead, outside the submitted work. Dr. Badoual reports personal fees from Roche, MSD, personal fees from Astrazeneca, personal fees from BMS, outside the submitted work. Dr. Penault-Llorca reports personal fees from Roche/Ventana, personal fees from Amgen, outside the submitted work. Dr. BOUCHE reports personal fees from ROCHE, personal fees from AMGEN, personal fees from MERCK, personal fees from SERVIER, personal fees from LILLY, personal fees from BAYER, personal fees from PIERRE FABRE, outside the submitted work. Dr. Bennouna reports personal fees from Roche, personal fees from Boehringer-Ingelheim, personal fees from Astra-Zeneca, personal fees from AMGEN, personal fees from Novartis, personal fees from BMS, outside the submitted work. Dr. FRANCOIS reports personal fees and non-financial support from Roche, personal fees and non-financial support from Servier, personal fees from Merck, personal fees from Amgen, personal fees from Sanofi, personal fees from Novartis, personal fees from Bayer, outside the submitted work. Dr. de la Fouchardière reports personal fees and non-financial support from Amgen, outside the submitted work. Dr. SAMALIN reports personal fees and non-financial support from AMGEN, outside the submitted work. Dr. BACHET reports personal fees and non-financial support from Amgen, personal fees from Bayer, personal fees from Celgene, personal fees and non-financial support from Merck Serono, personal fees and non-financial support from Roche, personal fees from Sanofi, personal fees and non-financial support from Servier, personal fees from Shire, outside the submitted work. Dr. Ghiringhelli reports personal fees from Servier, personal fees from Roche, personal fees from Amgen, personal fees from Merck Serono, personal fees from Sanofi outside the submitted work. Dr. Malka reports grants and non-financial support from Amgen, during the conduct of the study; personal fees and non-financial support from Amgen, personal fees and non-financial support from Bayer, personal fees and non-financial support from Merck, personal fees and non-financial support from Merck Serono, personal fees and non-financial support from Roche, personal fees and non-financial support from Sanofi, personal fees and non-financial support from Servier, personal fees from Shire, personal fees from Halio Dx, personal fees from Agios, outside the submitted work. Dr. Taieb reports personal fees from: Celgene, Servier, Roche, Amgen, Merck Serono, MSD, SIRTEX, Lilly, Sanofi, outside the submitted work. Dr. Voron, Dr Castan, Dr Gourgou, Dr Radosevic-Robin, Dr Borg, Dr Stanbury, Dr Tartour, Dr Boige, and Dr Marcheteau have nothing to disclose.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136:E359–386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
2. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:295–307. <https://doi.org/10.1038/nri1806>.
3. Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Res*. 2017;5:3–8. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0297>.

4. Lee HE, Chae SW, Lee YJ, Kim MA, Lee HS, Lee BL, et al. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2008;99:1704–11. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604738>.
5. Kang BW, Kim JG, Lee IH, Bae HI, Seo AN. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes for gastric cancer in the era of immunology. *World J Gastrointest Oncol*. 2017;9:293–9. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v9.i7.293>.
6. Arigami T, Uenosono Y, Ishigami S, Matsushita D, Hirahara T, Yanagita S, et al. Decreased density of CD3⁺ tumor-infiltrating lymphocytes during gastric cancer progression. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29:1435–41.
7. Gulubova M, Manolova I, Kyurkchiev D, Julianov A, Altunkova I. Decrease in intrahepatic CD56⁺ lymphocytes in gastric and colorectal cancer patients with liver metastases. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2009;117:870–9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02547.x>.
8. Xing X, Guo J, Wen X, Ding G, Li B, Dong B, et al. Analysis of PD1, PDL1, PDL2 expression and T cells infiltration in 1014 gastric cancer patients. *Oncoimmunology*. 2018;7:e1356144. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1356144>.
9. Haanen JBAG, Baars A, Gomez R, Weder P, Smits M, de Gruijl TD, et al. Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55:451–8. <https://doi.org/10.1007/s00262-005-0018-5>.
10. Janjigian YY, Ott PA, Calvo E, Kim JW, Ascierto PA, Sharma P, et al. Nivolumab ± ipilimumab in pts with advanced (adv)/metastatic chemotherapy-refractory (CTx-R) gastric (G), esophageal (E), or gastroesophageal junction (GEJ) cancer: CheckMate 032 study. *J Clin Oncol*. 2017;35:4014–4014. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.4014.
11. Fuchs CS, Doi T, Jang RW, Muro K, Satoh T, Machado M, et al. Safety and efficacy of pembrolizumab monotherapy in patients with previously treated advanced gastric and gastroesophageal junction cancer: phase 2 clinical KEYNOTE-059 trial. *JAMA Oncol*. 2018;4:e180013. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.0013>.
12. Kang Y-K, Boku N, Satoh T, Ryu M-H, Chao Y, Kato K, et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2017;390:2461–71. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31827-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31827-5).
13. Shitara K, Özgüroğlu M, Bang Y-J, Di Bartolomeo M, Mandalà M, Ryu M-H, et al. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2018;392:123–33. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31257-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31257-1).
14. Bang Y-J, Ruiz EY, Van Cutsem E, Lee K-W, Wyrwicz L, Schenker M, et al. Phase 3, randomised trial of avelumab versus physician's choice of chemotherapy as third-line treatment for patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer: primary analysis of JAVELIN Gastric 300. *Ann Oncol*. 2018. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy264>.
15. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31–49.
16. Bamboat ZM, Tang LH, Vinuela E, Kuk D, Gonen M, Shah MA, et al. Stage-stratified prognosis of signet ring cell histology in patients undergoing curative resection for gastric adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2014;21:1678–85. <https://doi.org/10.1245/s10434-013-3466-8>.
17. Taghavi S, Jayarajan SN, Davey A, Willis AI. Prognostic significance of signet ring gastric cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30:3493–8. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.42.6635>.
18. Henson DE, Dittus C, Younes M, Nguyen H, Albores-Saavedra J. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973–2000: increase in the signet ring cell type. *Arch Pathol Lab Med*. 2004;128:765–70. [https://doi.org/10.1043/1543-2165\(2004\)128%3c765:DTITI A%3e2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/1543-2165(2004)128%3c765:DTITI A%3e2.0.CO;2).
19. Pernot S, Voron T, Perkins G, Lagorce-Pages C, Berger A, Taieb J. Signet-ring cell carcinoma of the stomach: impact on prognosis and specific therapeutic challenge. *World J Gastroenterol*. 2015;21:11428–38. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i40.11428>.
20. Li Z, Lai Y, Sun L, Zhang X, Liu R, Feng G, et al. PD-L1 expression is associated with massive lymphocyte infiltration and histology in gastric cancer. *Hum Pathol*. 2016;55:182–9. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.05.012>.
21. Yuan J, Zhang J, Zhu Y, Li N, Tian T, Li Y, et al. Programmed death-ligand-1 expression in advanced gastric cancer detected with RNA in situ hybridization and its clinical significance. *Oncotarget*. 2016;7:39671–9. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9381>.
22. Malka D, Castan F, Francois E, Bouche O, Bennouna J, Ghiringhelli F, et al. FOLFOX alone or combined with rilotumumab or panitumumab as first-line treatment in patients (pts) with advanced gastroesophageal adenocarcinoma (AGEA): an open-label, randomized phase II trial (PRODIGE 17 ACCORD 20 MEGA). *J Clin Oncol*. 2015;33:4013–4013. https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.4013.
23. Fuss IJ, Kanof ME, Smith PD, Zola H. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol*. 2009;7(Unit 7):1. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0701s85>.
24. Pernot S, Badoual C, Terme M, Castan F, Cazes A, Bouche O, et al. Dynamic evaluation of circulating tumour cells in patients with advanced gastric and oesogastric junction adenocarcinoma: prognostic value and early assessment of therapeutic effects. *Eur J Cancer Oxf Engl*. 1990;2017(79):15–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.03.036>.
25. van der Woude LL, Gorris MAJ, Halilovic A, Figdor CG, de Vries IJM. Migrating into the tumor: a roadmap for T cells. *Trends Cancer*. 2017;3:797–808. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.09.006>.
26. Hegde PS, Karanikas V, Evers S. The where, the when, and the how of immune monitoring for cancer immunotherapies in the era of checkpoint inhibition. *Clin Cancer Res*. 2016;22:1865–74. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1507>.
27. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513:202–9. <https://doi.org/10.1038/nature13480>.
28. Teh M, Lee YS. HLA-DR antigen expression in intestinal-type and diffuse-type gastric carcinoma. *Cancer*. 1992;69:1104–7.
29. Rodríguez JA. HLA-mediated tumor escape mechanisms that may impair immunotherapy clinical outcomes via T-cell activation. *Oncol Lett*. 2017;14:4415–27. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6784>.
30. Humar B, Blair V, Charlton A, More H, Martin I, Guilford P. E-cadherin deficiency initiates gastric signet-ring cell carcinoma in mice and man. *Cancer Res*. 2009;69:2050–6. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2457>.
31. Hofmann M, Pircher H. E-cadherin promotes accumulation of a unique memory CD8 T-cell population in murine salivary glands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:16741–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107200108>.

32. Terme M, Pernot S, Marcheteau E, Sandoval F, Benhamouda N, Colussi O, et al. VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2013;73:539–49. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2325>.
33. Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Pernot S, Nizard M, Pointet A-L, et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8⁺ T cells in tumors. *J Exp Med.* 2015;212:139–48. <https://doi.org/10.1084/jem.20140559>.
34. Tartour E, Pere H, Maillere B, Terme M, Merillon N, Taieb J, et al. Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2011;30:83–95. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9281-4>.
35. Takahashi Y, Cleary KR, Mai M, Kitadai Y, Bucana CD, Ellis LM. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 1996;2:1679–84.
36. Ohtani H, Nagura H. Differing microvasculature in the two major types of gastric carcinoma: a conventional, ultrastructural and ultrastructural immunolocalization study of von Willebrand factor. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1990;417:29–35.
37. Ishimoto T, Miyake K, Nandi T, Yashiro M, Onishi N, Huang KK, et al. Activation of transforming growth factor beta 1 signaling in gastric cancer-associated fibroblasts increases their motility, via expression of rhomboid 5 homolog 2, and ability to induce invasiveness of gastric cancer cells. *Gastroenterology.* 2017;153(191–204):e16. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.03.046>.
38. O'Donnell JS, Long GV, Scolyer RA, Teng MWL, Smyth MJ. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition. *Cancer Treat Rev.* 2017;52:71–81. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.11.007>.
39. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer.* 2000;88:577–83.
40. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Xiangming C, Iwashige H, et al. Clinical impact of intratumoral natural killer cell and dendritic cell infiltration in gastric cancer. *Cancer Lett.* 2000;159:103–8.
41. Rosso D, Rigueiro MP, Kassab P, Ilias EJ, Castro OAP, Novo NF, et al. Correlation of natural killer cells with the prognosis of gastric adenocarcinoma. *Arq Bras Cir Dig ABCD Braz Arch Dig Surg.* 2012;25:114–7.
42. Naseem M, Barzi A, Brezden-Masley C, Puccini A, Berger MD, Tokunaga R, Battaglin F, Soni S, McSkane M, Zhang W, Lenz HJ. Outlooks on Epstein-Barr virus associated gastric cancer. *Cancer Treat Rev.* 2018;66:15–22.
43. Dolcetti R, De Re V, Canzonieri V. Immunotherapy for gastric cancer: time for a personalized approach? *Int J Mol Sci.* 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19061602>.

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

Affiliations

Simon Pernot^{1,2}  · Magali Terme¹ · Nina Radosevic-Robin³ · Florence Castan⁴ · Cécile Badoual^{1,5} · Elie Marcheteau¹ · Frédérique Penault-Llorca³ · Olivier Bouche⁶ · Jaafar Bennouna⁷ · Eric Francois⁸ · Francois Ghiringhelli⁹ · Christelle De La Fouchardiere¹⁰ · Emmanuelle Samalin¹¹ · Jean Baptiste Bachet¹² · Christophe Borg¹³ · Valérie Boige¹⁴ · Thibault Voron¹ · Trevor Stanbury¹⁵ · Eric Tartour¹ · Sophie Gourgou⁴ · David Malka¹⁴ · Julien Tai eb^{1,2}

¹ Université de Paris, PARCC, INSERM, 75015 Paris, France

² Hôpital Européen Georges-Pompidou, APHP; Department of GI oncology, Université de Paris, Paris, France

³ Department of Biopathology, Centre Jean Perrin and University Clermont Auvergne/INSERM U1240, Clermont-Ferrand, France

⁴ Biometrics Unit, Institut du Cancer Montpellier-Val d'Aurelle, Université de Montpellier, Montpellier, France

⁵ Department of Pathology, Université de Paris, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁶ CHU Robert Debré, Reims, France

⁷ Institut de Cancérologie de l'Ouest-Site René Gauducheau, Saint Herblain, France

⁸ Centre Antoine-Lacassagne, Nice, France

⁹ Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France

¹⁰ Centre Léon Bérard, Lyon, France

¹¹ Institut du Cancer Montpellier-Val d'Aurelle, Université de Montpellier, Montpellier, France

¹² Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France

¹³ Medical Oncology Unit, CHU Minjoz, Besancon, France

¹⁴ Département de Médecine Oncologique, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, 94805 Villejuif, France

¹⁵ UNICANCER, Paris, France

Supplemental material

Supplemental tables

Supp Table 1: Descriptive analysis of circulating cells

	N	Mean (%)	SD (%)	Median (%)	Min-Max (%)
Circulating immune cells					
Circulating NK cells	47	10.9	7.6	9.5	1.1-28.5
Circulating Tregs	47	5.3	2.2	4.9	2.2-11.2
Circulating MDSCs	52	19	17.9	13.2	0.5-72.8

Supplemental Table 2: Descriptive analysis of tumor-infiltrating cells

	N	Mean (cells per field)	SD (cells per field)	Median (cells per field)	Min-Max (cells per field)
Intratumoral NK cells	40	2.8	2.8	2	0-14
Intratumoral CD8+ cells	51	49	42.7	31	1-191.5
Intratumoral FoxP3 cells	49	53.6	47.5	40	0-201

Supplemental Table 3, 4, 5: correlation between immune cells and clinicopathological features; *Spearman correlation

Supplemental table 3: Circulating NK cells

	N	Median (%)	Range	p
Age	47			Correlation coefficient rho=0.26 p=0.07*
Sex				0.46
male	25	11.4	1.1-28.5	
female	22	7.2	1.1-24.1	
ECOG				0.43
0	15	10.0	2.8-27.8	
1	31	8.5	1.1-28.5	
Lauren classification				0.02
Diffuse/mixed type	15	6.3	1.1-17.1	

Intestinal type	32	11.5	1.6-28.5	
Disease stage				0.71
1 metastatic site	22	9.0	1.1-27.8	
>1 metastatic site	24	9.0	1.1-28.5	
Stage at diagnosis				0.45
Synchronous metastasis	38	8.1	1.1-28.5	
Metachronous metastasis	8	10.4	3.1-24.1	

Supplemental table 3: Circulating Tregs

	N	Median (%)	Range	p
Age	47			Correlation coefficient rho=0.19 p=0.21*
				0.27
Sex				
male	25	5.3	2.4-11.2	
female	22	4.7	2.2-9.3	
ECOG				0.28
0	12	5.7	3-11.2	
1	34	4.9	2.2-9.3	
Lauren classification				0.03
Diffuse/mixed type	17	3.3	2.2-9.1	
Intestinal type	30	5.2	2.4-11.2	
Disease stage				0.76
1 metastatic site	22	5.1	2.2-9.1	
>1 metastatic site	24	4.8	2.2-11.2	
Stage at diagnosis				0.98
synchronous metastasis	38	4.8	2.2-11.2	
metachronous metastasis	8	5.2	2.2-9.3	

Supplemental table 4: TI CD8

	N	median (%)	Range	p
Age	51			Correlation coefficient rho=-0.12 p=0.40*
Sex				0.69

male	25	31	3-130	
female	26	34.5	1-191.5	
ECOG				0.06
0	16	62	8-191.5	
1	34	27.5	1-130	
Lauren classification				0.009
Diffuse/mixed type	20	21	2-113	
Intestinal type	31	59	1-191.5	
Disease stage				0.82
1 metastatic site	24	31	1-151	
>1 metastatic site	26	34.5	4-191.5	
Stage at diagnosis				0.018
synchronous metastasis	42	28.5	1-130	
metachronous metastasis	8	66.5	16-191.5	

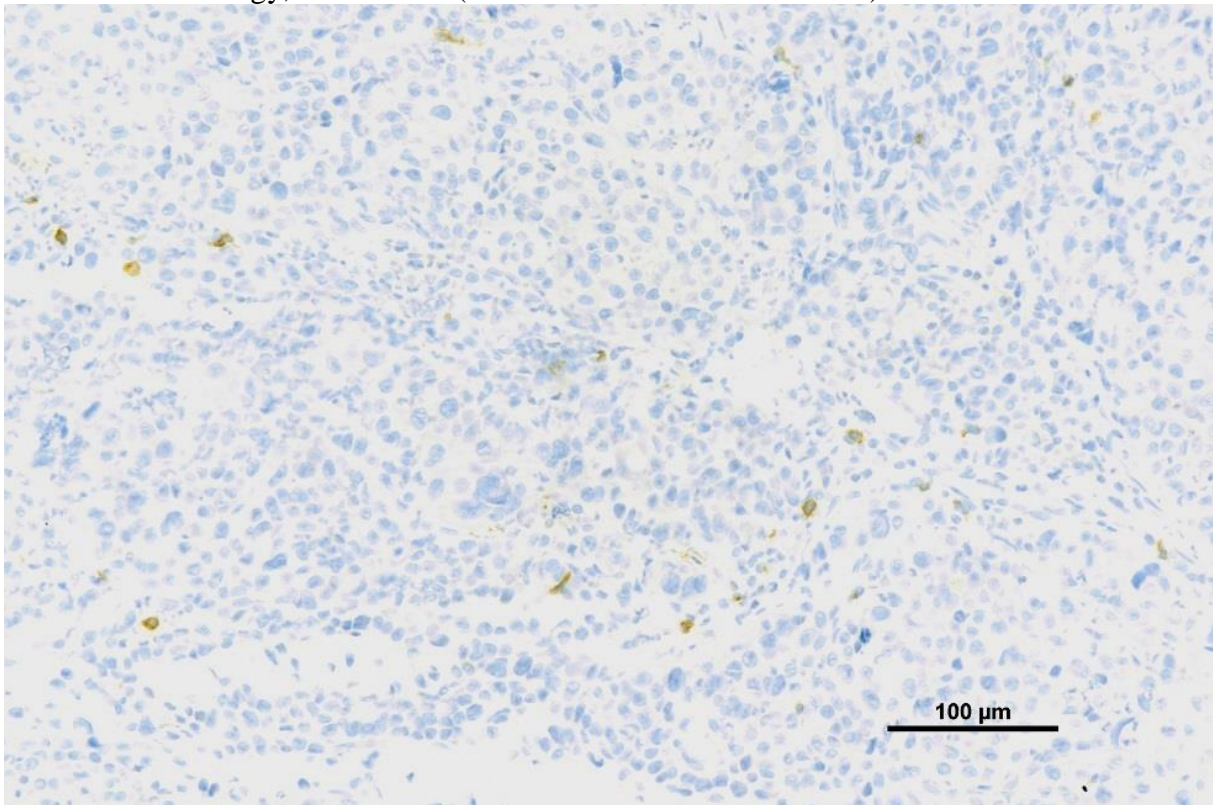
Supplemental table 5: Prognostic value of immune cells

		N	median OS (months)	Univariate analysis			Multivariate analysis		
				HR	95% CI [;]	p	HR	95% CI [;]	p
circulating NK cells	≤17%	36	11	1					
	>17%	11	25.8	0.4	[0.15 ; 1.06]	0.04*	0.45	[0.16 ; 1.27]	0.13
circulating Tregs	≤5%	25	8.7	1					
	>5%	22	14.7	0.71	[0.35 ; 1.42]	0.33			
circulating MDSCs	≤13%	25	9.4	1					
	>13%	27	16.9	0.62	[0.31 ; 1.22]	0.16			
				Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Count (N/field)	N	median OS (months)	HR	95% CI [;]	p	HR	95% CI [;]	p
Tumor-infiltrating Foxp3 cells	≤40	25	13.4	1					

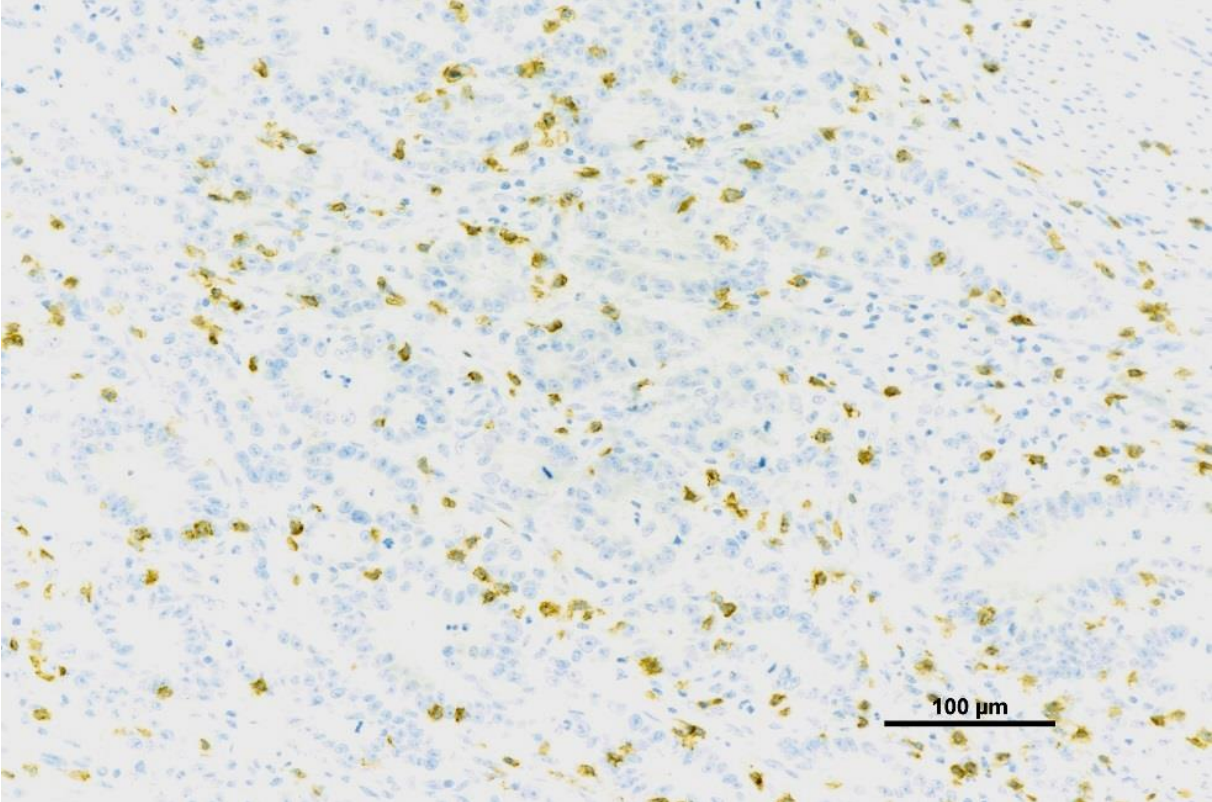
	>40	24	10.8	1.44	[0.73 ; -2.83]	0.3 0			
Tumor-infiltrating NK cells	≤2	21	10.8	1					
	>2	19	16.9	1.01	[0.46 ; 2.24]	0.9 7			
Tumor-infiltrating CD8	≤31	26	8.6	1					
	>31	25	25.8	0.44	[0.21 ; 0.92]	0.0 2	0.42	[0.18 ; 0.96]	0.04

Supplemental Figure 1: histological images of typical cases

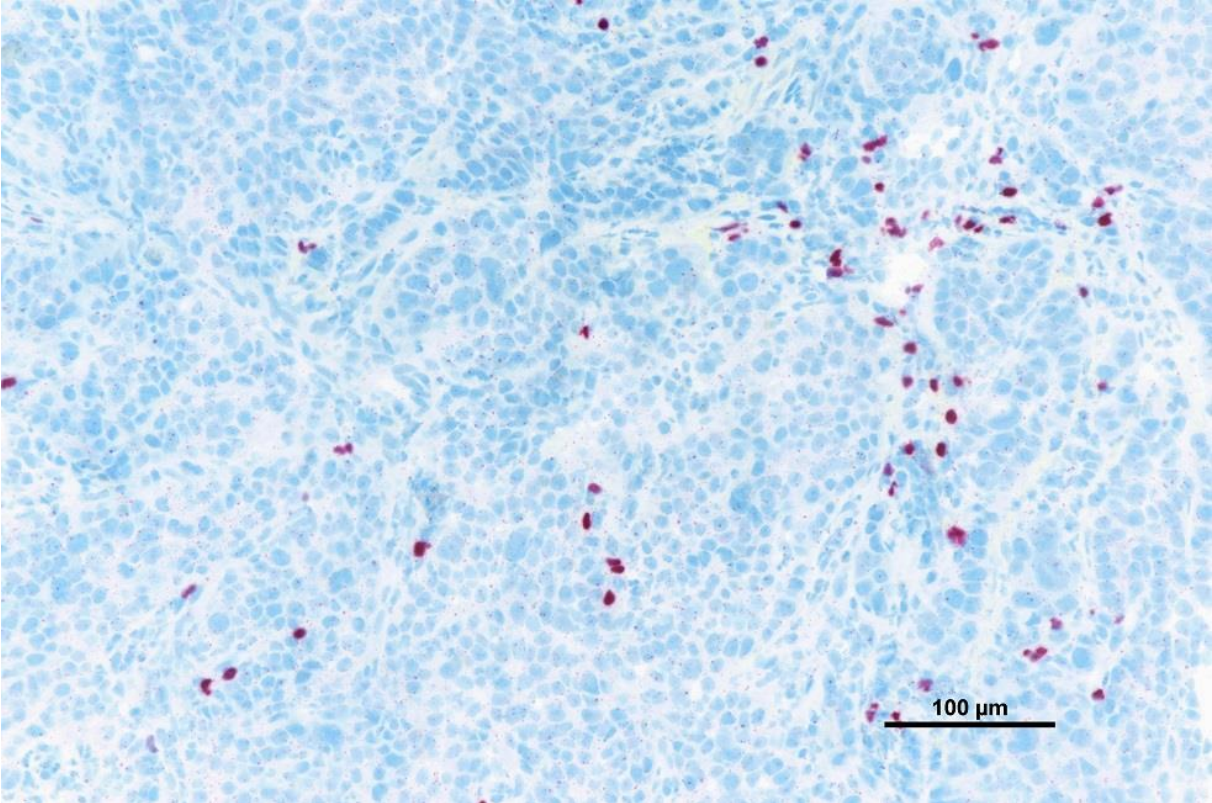
1.A Diffuse histology, TILs CD8+ (the cells with brown membrane)



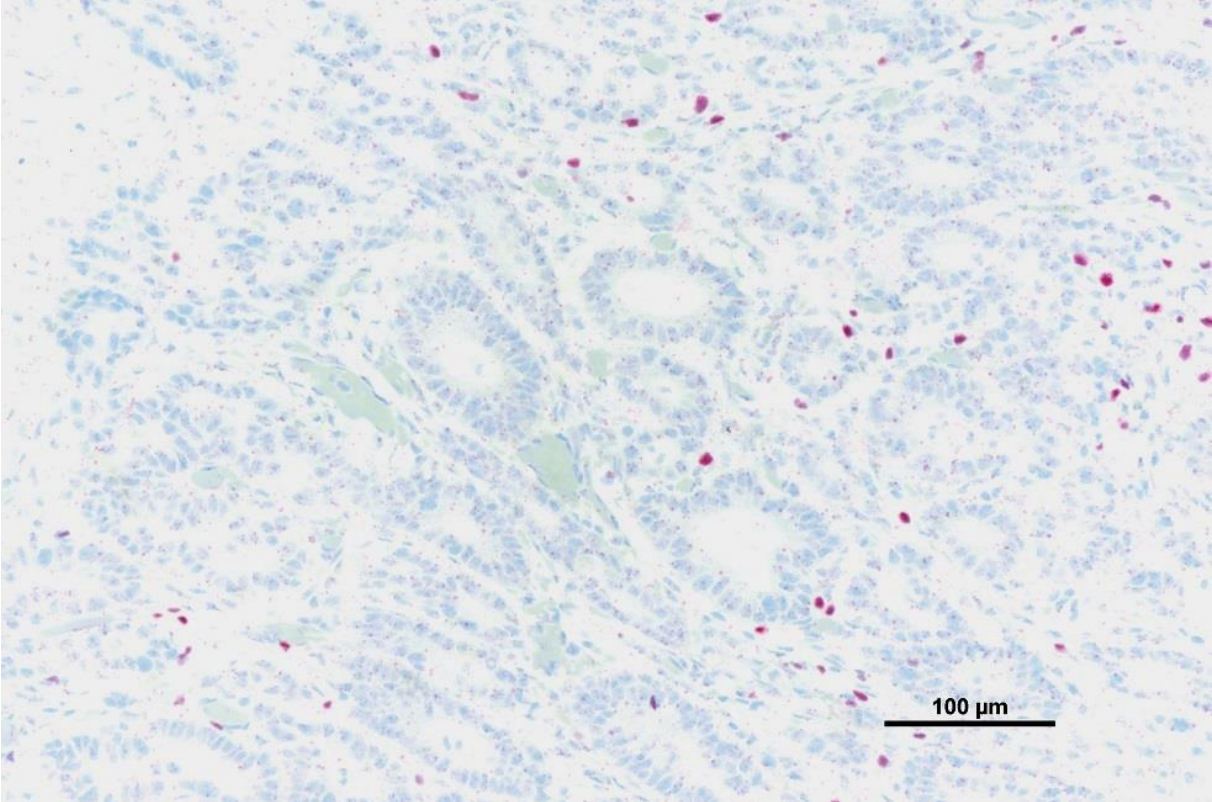
1.B Intestinal histology, TILs CD8+ (the cells with brown membrane)



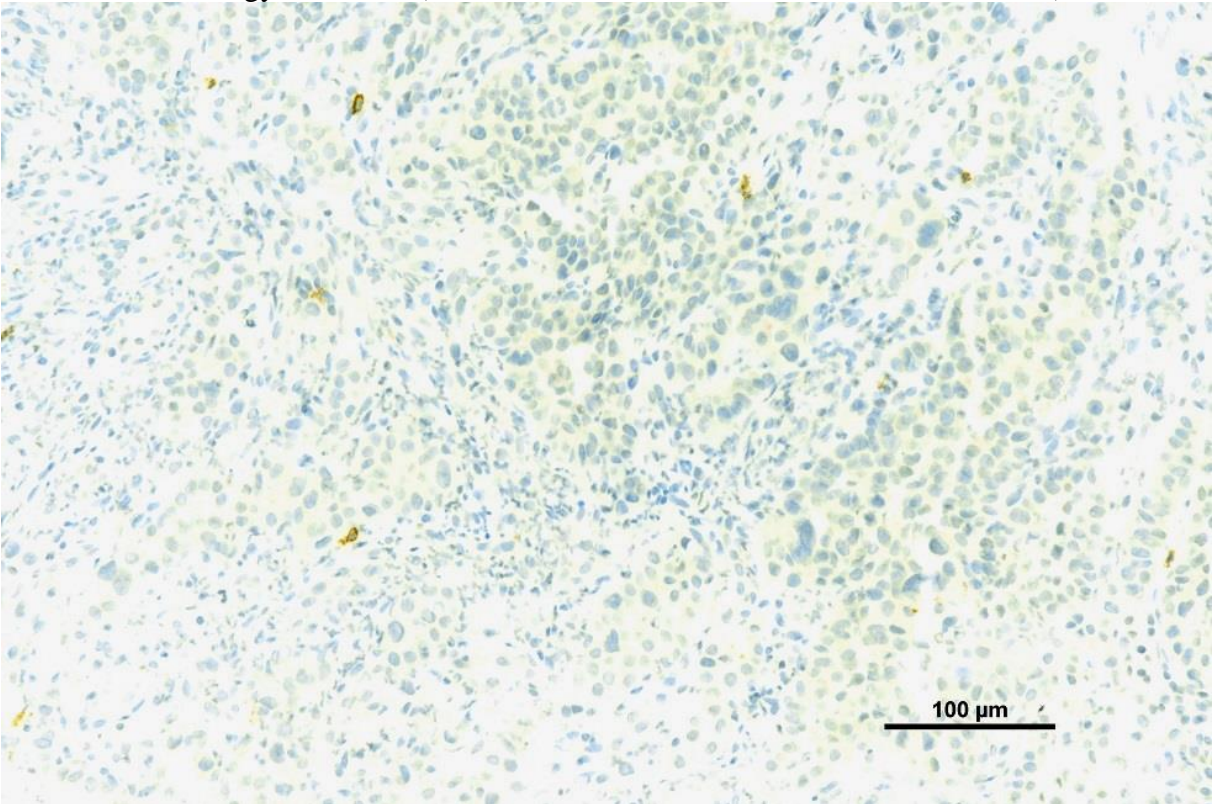
1.C Diffuse histology, TILs FoxP3+ (the cells with red nucleus)



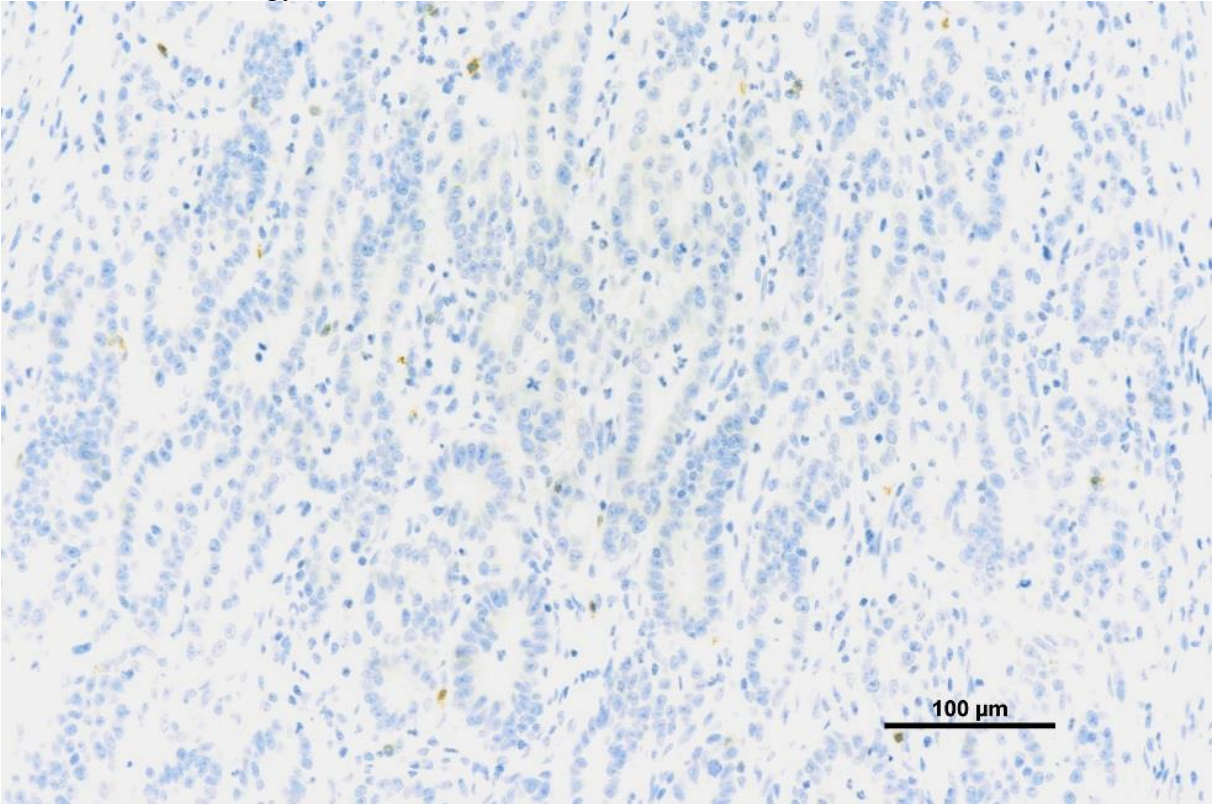
1.D Intestinal histology, TILs FoxP3+ (the cells with red nucleus)



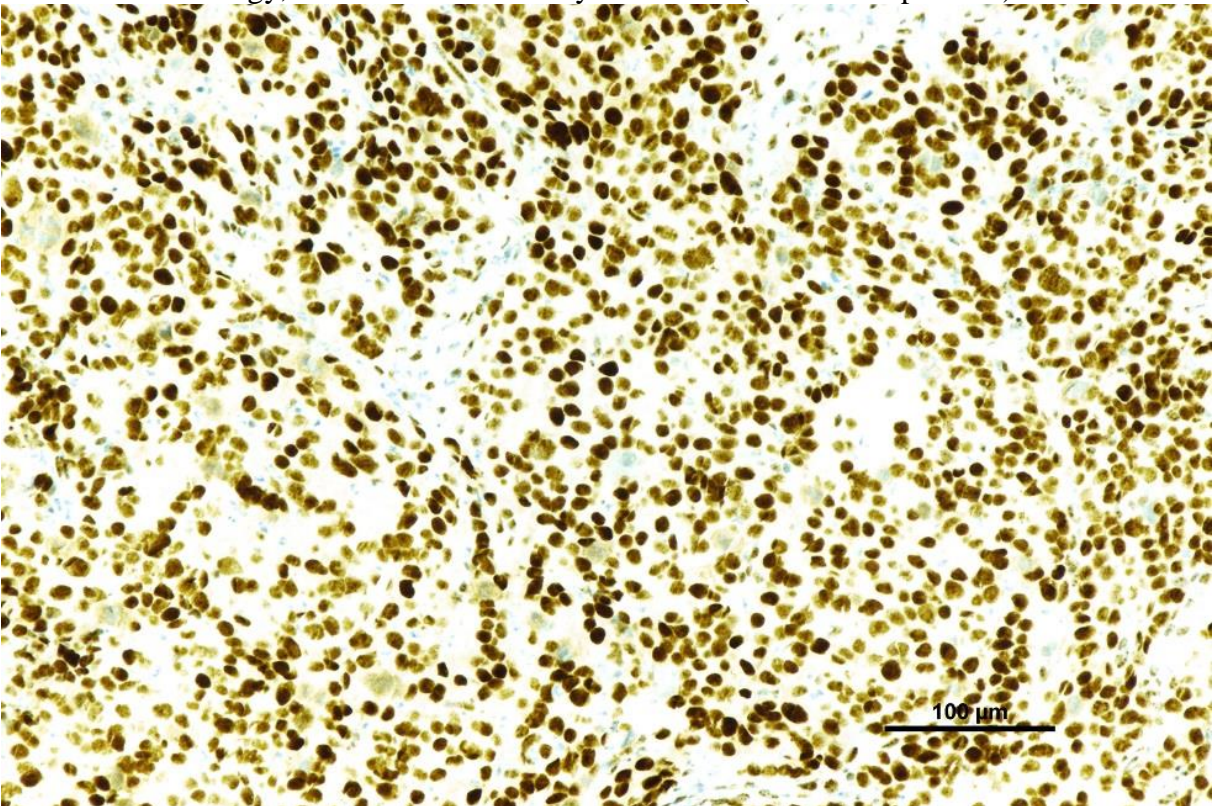
1.E Diffuse histology, TILs NK (CD57+, the cells with brown membrane /arrows/)



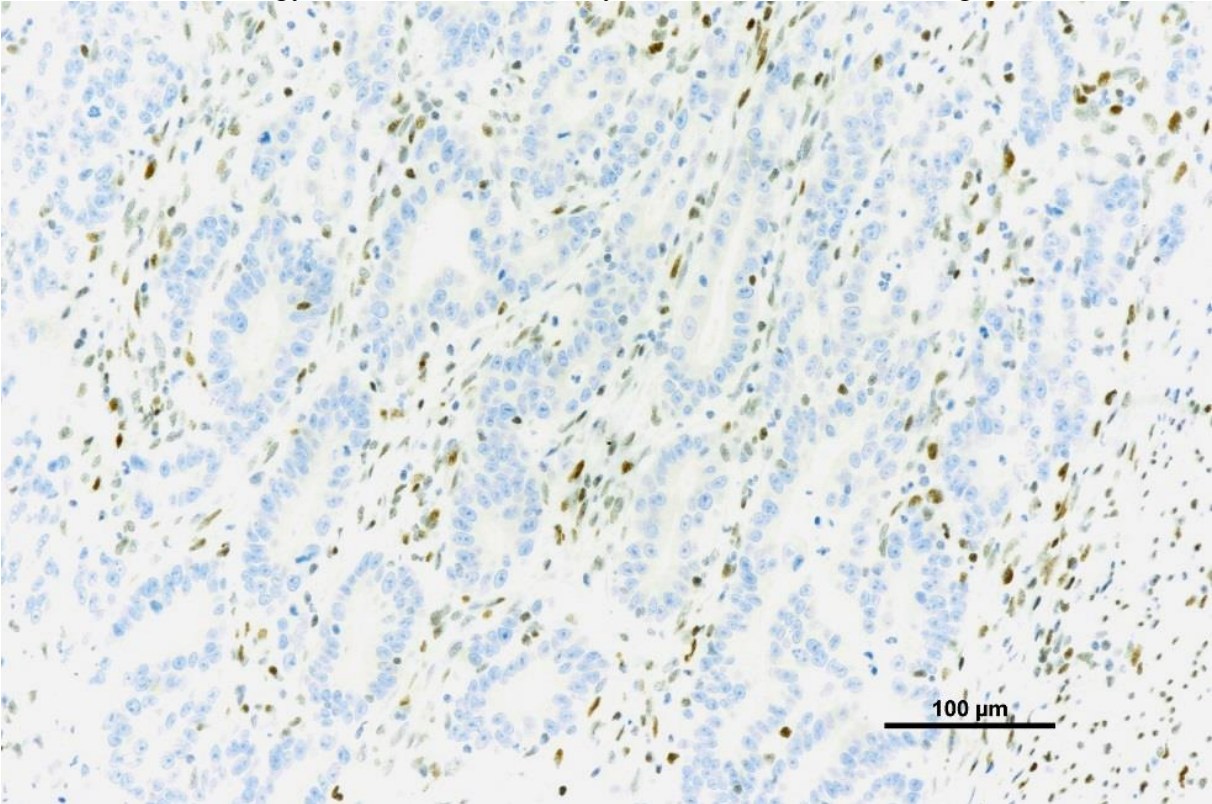
1.F Intestinal histology, TIL NK (CD57+, the cell with brown membrane /arrow/)



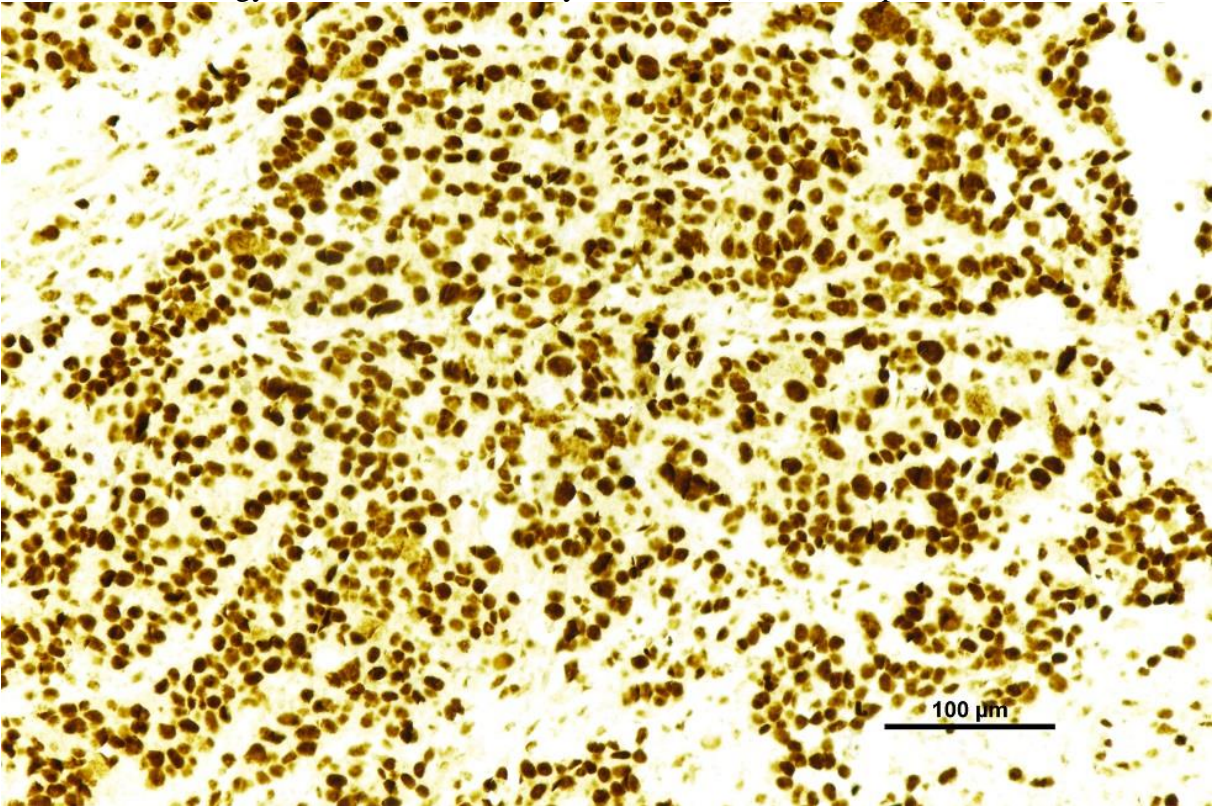
1.G Diffuse histology, immunohistochemistry for MLH1 (tumor cells positive)



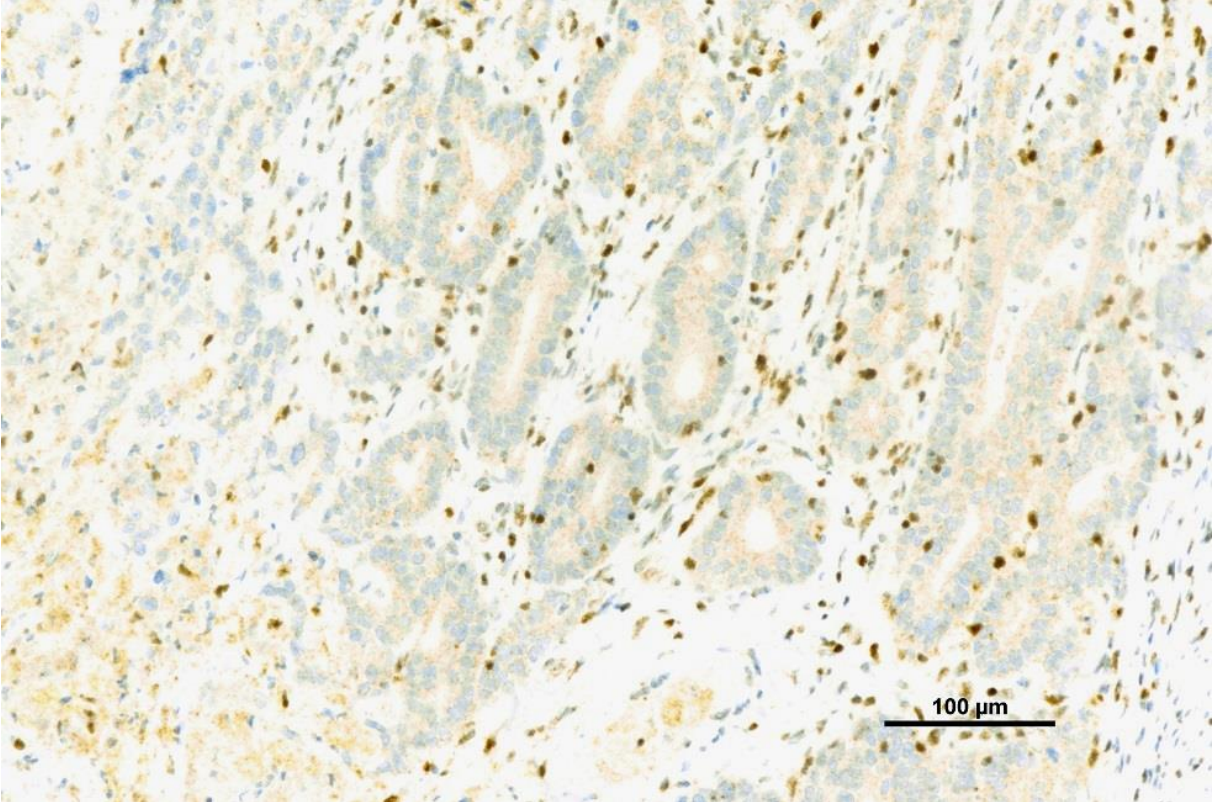
1.H Intestinal histology, immunohistochemistry for MLH1 (tumor cells negative)



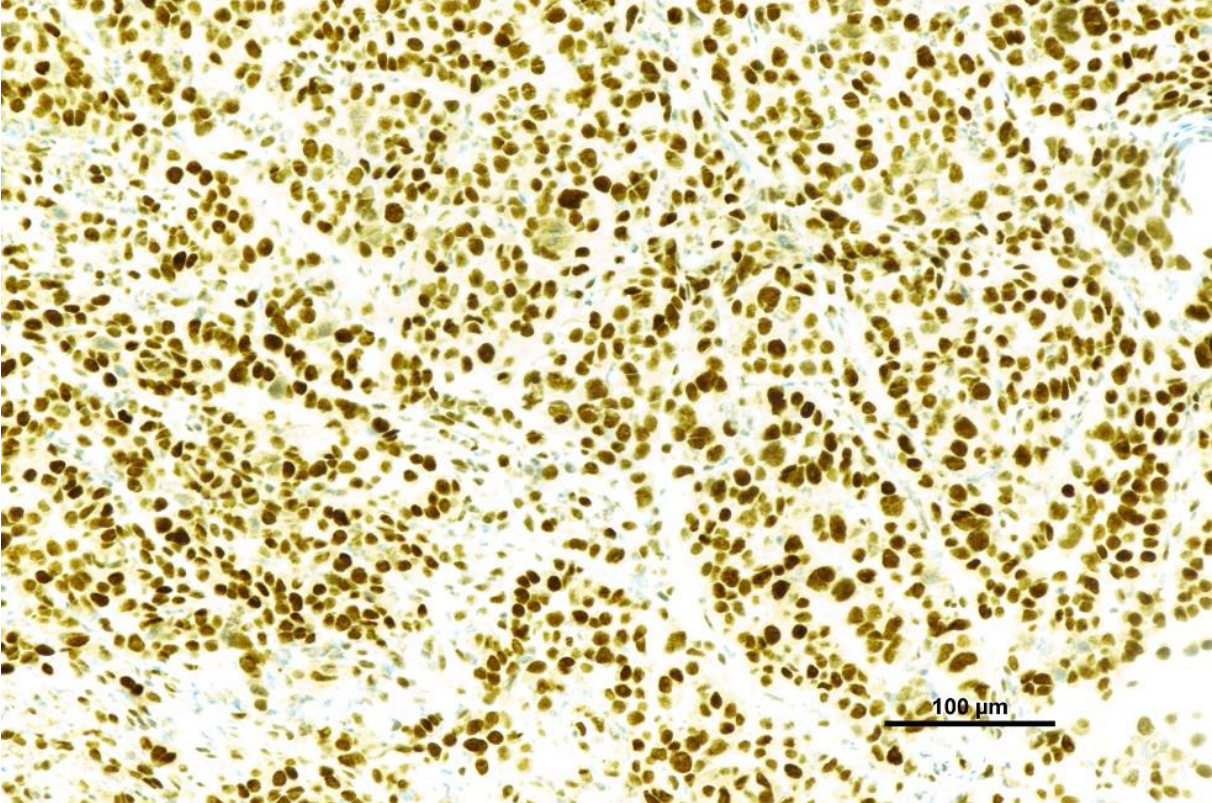
1.I Diffuse histology, immunohistochemistry for PMS2 (tumor cells positive)



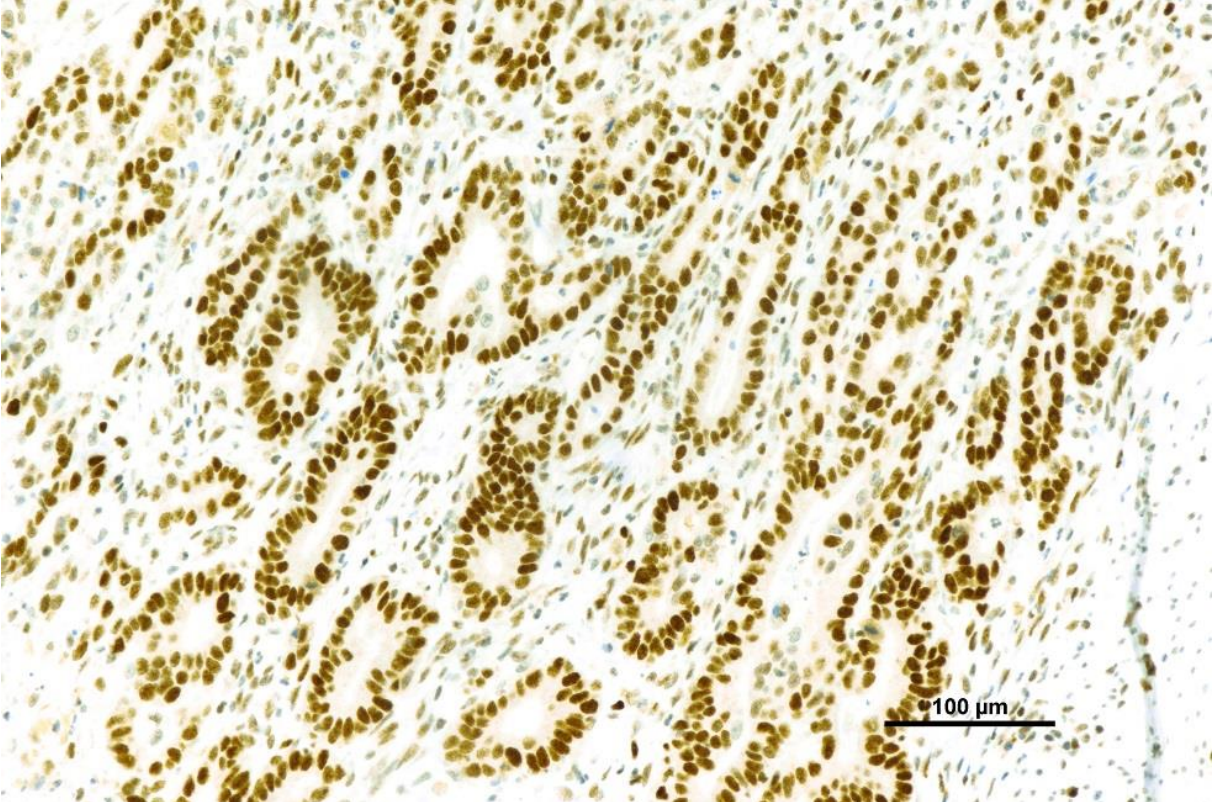
1.J Intestinal histology, immunohistochemistry for PMS2 (tumor cells negative)



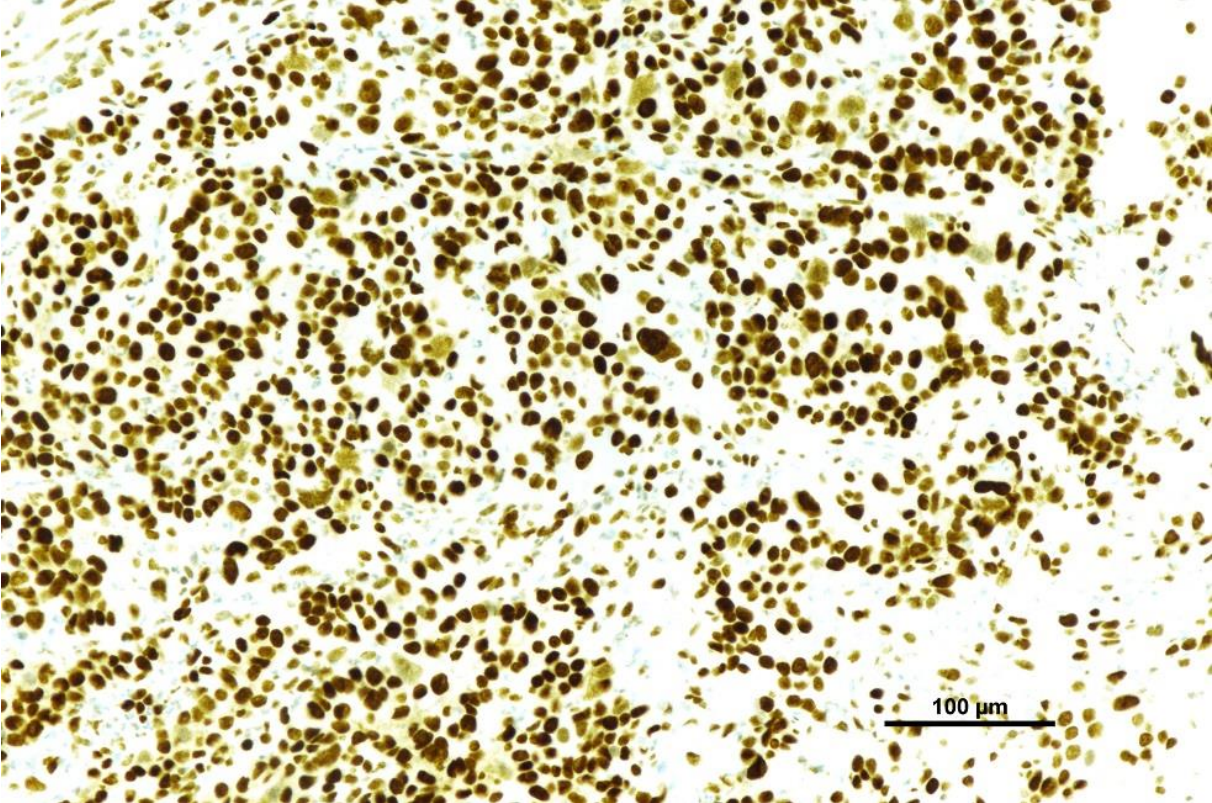
1.K Diffuse histology, immunohistochemistry for MSH2 (tumor cells positive)



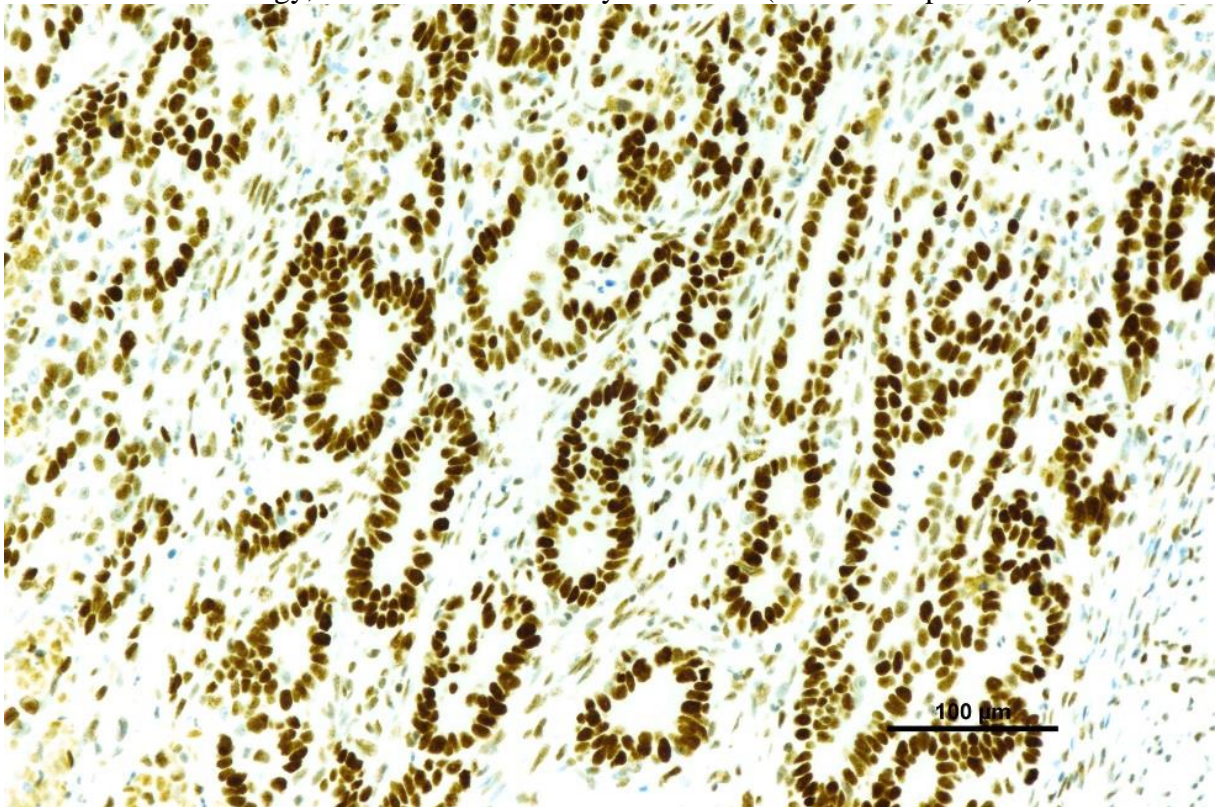
1.L Intestinal histology, immunohistochemistry for MSH2 (tumor cells positive)



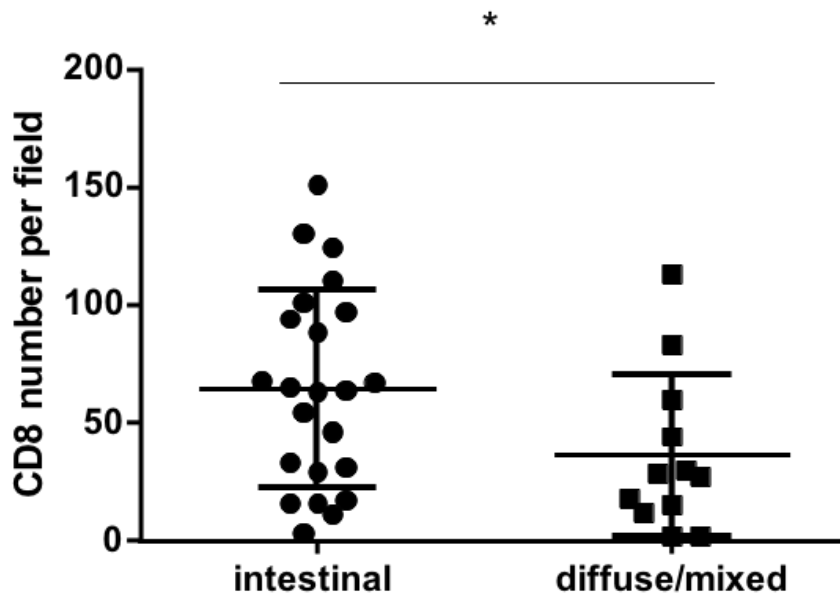
1.M Diffuse histology, immunohistochemistry for MSH6 (tumor cells positive)



1.N Intestinal histology, immunohistochemistry for MSH6 (tumor cells positive)



Supplemental Figure 2 : CD8+ T cell infiltration of the tumors in MSS phenotype tumor according to the Lauren classification



*: p<0.05

Discussion et perspectives

Mon travail a porté sur la modulation des Treg par les anti-angiogéniques dans le cancer colorectal d'une part, et sur l'existence de différences de microenvironnement tumoral indépendante du statut MMR dans le cancer gastrique, et la valeur pronostique des cellules immunitaires infiltrantes et circulantes d'autre part. Les résultats que nous avons observés permettent d'envisager certaines perspectives, mais certaines questions restent encore sans réponses.

1. La valeur pronostique des cellules immunitaires infiltrantes est-elle reproductible ?

L'échappement au système immunitaire est une caractéristique principale des cancers lorsqu'ils se développent. Cependant, les signaux résiduels d'une réponse immunitaire anti-tumorale active au sein de la tumeur signent généralement un bon pronostic.

LT CD8 infiltrants⁺

L'infiltration en LT CD8⁺ est un élément associé à un meilleur pronostic dans de nombreux types tumoraux. Les premières observations ont été faites dans les cancers colorectaux et dans les cancers de l'ovaire (48). Depuis, la valeur pronostique des LT CD8⁺ a été montrée dans de nombreux autres types de cancers comme les cancers du poumon, du sein, de la prostate, colorectaux, ORL, des ovaires, de la vessie, du pancréas, du foie, et les mélanomes (46). Depuis, différentes sous-populations ont été analysées, permettant d'affiner la valeur pronostique de ces TIL, notamment en prenant compte la localisation intra-tumorale ou péri-tumorale, ou la sous population de LT mémoires CD45⁺ comme dans l'immunoscore pour le cancer colorectal (47). Dans le cas du cancer gastrique localisé, la valeur pronostique des TIL CD8⁺ a été observée dans une large série de 220 patients opérés (344), et confirmée dans une méta-analyse récente regroupant plusieurs séries, principalement asiatiques (550). Seule une étude retrouvait que l'infiltration CD8⁺ était associée à un moins bon pronostic, mais aussi à une expression plus élevée de PD-L1, suggérant qu'au-delà des LT CD8⁺ isolément, leur intégration dans un microenvironnement tumoral spécifique jouait un rôle important. Dans le même sens, la densité en TIL CD8⁺ a été identifiée comme un facteur de mauvais pronostic dans d'autres tumeurs, en

particulier les cancers du rein à cellules claires, les cancers de la prostate et certains lymphomes (46). Une des hypothèses soulevées pour les cancers du rein est qu'il s'agit d'une tumeur à haut niveau d'angiogenèse, susceptible d'entraîner une accumulation de Treg, et une accumulation de LT CD8⁺ polyclonaux non spécifiques de la tumeur et de cytotoxicité moindre. Au regard de ces résultats discordants liés au microenvironnement tumoral, la valeur pronostique des TIL CD8⁺ observée dans une situation ne peut donc pas être extrapolée à d'autres types de cancer. La question de la valeur pronostique dans les formes métastatiques en particulier, mérite d'être soulevée, puisque le microenvironnement des formes métastatiques est différent des formes localisées, (551), à l'origine de modifications de l'infiltrat immunitaire. En effet, dans différents types de tumeurs, il a été observé que la progression et la diffusion métastatique était associée à une augmentation de l'exhaustion des LT, et une diminution de l'infiltrat CD8⁺ dans la tumeur primitive, tandis que l'infiltrat semblait encore moins dense dans la métastase comparée à celui de la tumeur primitive (46). La valeur pronostique des TIL CD8⁺ concernant les formes métastatiques est nettement moins documentée, les patients ayant des formes métastatiques étant moins souvent opérés et donc le matériel moins disponible. Par exemple, dans le cancer colorectal, une méta-analyse récente regroupait les données issues de près de 5000 tumeurs coliques primitives mais seulement 418 données de patients métastatiques (552)(Kong, *dis colon rectum* 2018). La valeur pronostique des TIL CD8⁺ dans les cancers métastatiques reflète généralement les données observées dans les formes localisées, mais sont tout de même plus controversées. Dans le CCRm, certaines études ont retrouvé que les TIL étaient associées à un meilleur pronostic (553,554), alors que d'autres études et la méta-analyse de Kong et al. ne retrouvaient pas cette association (315,552,555) (HR=1,85 ; IC95% 0.93-8.2). Dans les cancers du rein métastatiques, la densité de TIL CD8⁺ était associée à un plus mauvais pronostic, comme observé dans les formes localisées (46). Dans les cancers gastriques, aucune étude en dehors de la nôtre n'avait évalué la valeur pronostique des TIL CD8⁺ dans les formes métastatiques. Nous montrons ainsi dans notre étude cette valeur pronostique favorable de la densité en TIL CD8⁺ dans les formes métastatiques de cancer gastrique. Ces résultats suggèrent que les tumeurs métastatiques n'ont pas échappé de manière irréversible à l'immunosurveillance et constituent un rationnel majeur pour l'utilisation des ICI ou d'autres immunothérapies dans les cancers gastriques métastatiques.

Les NK infiltrant la tumeur

Dans le CCR comme dans le CG, l'infiltrat tumoral en NK est généralement également associé à un meilleur pronostic (285,286,556,557), même si cela n'est pas toujours retrouvé. En revanche, dans notre étude menée dans les CG métastatiques, les NK intratumoraux n'étaient pas associés au pronostic. Cependant, cette étude était limitée par le très faible nombre de NK infiltrant les tumeurs. En effet il est possible que les formes métastatiques soient moins infiltrées que les formes localisées habituellement étudiées, et que l'analyse des NK soit donc moins adaptée aux formes avancées.

Les Treg intratumoraux

La valeur pronostique des Treg intratumoraux est également controversé. Ils sont généralement associés à un moins bon pronostic dans la plupart des types de cancer, comme les cancers du sein, les cancers du poumon, les hépatocarcinomes, les cancers de l'ovaire, les cancers du rein, les cancers pancréatiques (178,179). Dans les cancers colorectaux et les cancers gastriques, cependant, un effet favorable des Treg sur le pronostic a été observé dans plusieurs études (198,199). Ces discordances sont probablement liées à identification non optimale des Treg intratumoraux. En effet, les études sont généralement basées sur l'analyse du FOXP3, alors que les LT CD4⁺FOXP3⁺ regroupent en réalité une population très hétérogène. Certaines cellules non suppressives expriment transitoirement FOXP3. Il a été récemment montré dans le cancer colorectal, qu'en effet 2 populations de cellules T CD4⁺FOXP3⁺ coexistaient, l'une non suppressive FOXP3^{low}, associée à un bon pronostic, et l'autre suppressive FOXP3^{high} associée à un mauvais pronostic (291). De plus, l'identification de différentes sous-populations aux fonctions différentes permet également d'expliquer la difficulté à mettre en évidence l'impact pronostic des Treg intratumoraux pris dans leur ensemble. En particulier, nous avons mis en évidence dans un modèle de CCR l'existence de Treg exprimant le VEGFR2, modulés directement par l'axe anti-VEGFA/VEGFR2. Ces Treg spécifiques pourraient être particulièrement d'intérêt pour la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, il a été observé que la population spécifique de cellules FOXP3⁺VEGFR2⁺ intratumorales est un marqueur prédictif indépendant de récurrence et d'une moins bonne survie globale et survie sans maladie chez les patients atteints de CCR opéré (558). Les techniques récentes d'immunohistochimie multiparamétriques ou de transcriptomiques permettront probablement à l'avenir d'affiner l'identification des populations de Treg à l'avenir.

2. Les cellules immunitaires circulantes ont-elles un impact clinique différent de celui des cellules immunitaires infiltrant la tumeur ?

Dans le contexte tumoral, l'analyse des cellules immunitaires circulantes pourrait être un des moyens de mieux analyser les différentes populations immunitaires. En effet, elle présente théoriquement plusieurs avantages : elle offre un accès simple et non invasif aux cellules du patient, permettant une évaluation répétée et dynamique ; elle permet une analyse plus fine des populations par cytométrie de flux multiparamétrique ; et elle permet d'éviter le biais d'hétérogénéité tumorale induit par l'échantillonnage des prélèvements tumoraux. Cependant, l'immunité circulante n'est pas nécessairement un reflet des phénomènes intratumoraux. En effet le monitoring des cellules immunitaires circulantes ne prend pas en compte certains éléments, comme l'adressage des cellules immunitaires dans la tumeur lié aux chimiokines et à leurs récepteurs, et les différences entre les zones centrales et le front d'invasion tumorale, largement décrites. Par ailleurs, on peut supposer que les cellules immunitaires infiltrantes et les cellules immunitaires circulantes ont une fonction différente, ces dernières ayant la capacité de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires, de déclencher une réponse mémoire systémique, et de limiter la diffusion métastatique. L'analyse de ces deux populations pourrait donc apporter des informations différentes. Néanmoins, il est généralement admis que l'immunité systémique est un reflet de la capacité du système immunitaire de l'hôte à développer une réponse anti-tumorale, que ce soit par une corrélation directe avec les compartiments intratumoraux, ou par des interactions entre les compartiments circulants et intratumoraux (559). Une étude dans le cancer colorectal ne retrouvait pas de corrélation entre les CD8⁺ intratumoraux et circulants, mais montrait en revanche une forte corrélation entre la densité en TIL CD8⁺ d'une part et le taux de LT CD4⁺ circulants d'autre part, reflétant ces interactions entre différents composants circulants et intratumoraux (299). Nous n'avons pas non plus dans notre étude dans le cancer gastrique retrouvé de corrélation entre les cellules circulantes et infiltrantes du même type. Enfin, comme détaillé en introduction, l'association de différentes cellules immunitaires circulantes avec les stades tumoraux et le pronostic des cellules immunitaires circulantes a été largement établi dans différents types de cancer, soulignant le rôle de l'immunité circulante chez les patients atteints de cancer.

Concernant les Treg, la corrélation entre les populations intratumorales et circulantes n'est pas connue, alors que dans la plupart des types tumoraux y compris les cancers colorectaux, les

Treg circulants sont généralement associés à un mauvais pronostic (302,560). Cependant, il existe différentes populations fonctionnelles de Treg et il est possible que les sous-populations circulantes soient différentes des populations infiltrantes.

Enfin, la signification clinique des NK circulants a rarement été étudiée dans les cancers solides. Dans l'étude que nous présentons dans le cancer gastrique métastatique, les NK circulants sont associés au pronostic, mais pas les Treg circulants. En revanche, une association au type histologique est observée à la fois pour Treg circulants et les NK circulants, alors que l'infiltration intra-tumorale en NK ou en LT FOXP3⁺ n'est pas associée à un type histologique particulier, soulignant le lien important entre les phénomènes carcinologiques, influençant l'immunogénicité des tumeurs, et la réponse immunitaire systémique.

La réponse immunitaire systémique pourrait avoir pour rôle essentiel le contrôle de la diffusion métastatique. En effet certaines études ont retrouvé une corrélation entre le nombre de cellules tumorales circulantes (CTC) et les cellules immunitaires circulantes (LT CD8⁺, NK, Treg, macrophages...) chez des patients atteints de cancers du poumon ou du sein (561–564). Nous avons également émis cette hypothèse dans les cancers gastriques métastatiques, d'autant que les formes diffuses que nous avons retrouvées comme moins immunogènes, ont des capacités de diffusion métastatique plus importantes (340). Ainsi, nous avons réalisé une évaluation des CTC dans le cadre l'étude PRODIGE 17, et retrouvé que les CTC avaient un rôle pronostic important, et que leur diminution au cours du traitement était également associée à un meilleur pronostic (549) (Pernot Eur J Cancer 2017, annexe 4). Cependant, nous n'avons retrouvé aucune corrélation avec les cellules immunitaires circulantes effectrices ou régulatrices étudiées dans le cadre de cette étude.

3. Quel est l'impact des effets immunomodulateurs des anti-angiogéniques sur la réponse anti-tumorale ?

Nous avons mis en évidence une baisse des Treg avec les anti-VEGF chez des patients atteints de CCRm, et d'autres effets immunomodulateurs ont également été décrits, suggérant que la voie VEGF-A/VEGFR2 est un axe important dans les mécanismes d'échappement immunitaire. Les anti-angiogéniques sont utilisés en routine dans de nombreux types de cancers y compris les cancers colorectaux. Cependant, dans cette localisation, l'impact de la modulation des Tregs par les AA fait l'objet de plusieurs interrogations.

Les Treg modulés par l'axe VEGF-A/VEGFR2 ont-ils un phénotype et une fonction spécifique ?

Tout d'abord, nous avons montré que le VEGF-A module directement les Treg par l'axe VEGF-A/VEGFR2. La prolifération de Treg spécifiques exprimant le VEGFR2, est directement inhibée par le blocage de cette voie. Étant donné le rôle central du VEGF dans la carcinogenèse, et la valeur pronostique du taux de VEGF chez les patients atteints de cancer, on peut émettre l'hypothèse que ces Treg VEGFR2⁺ possèdent des fonctions particulières, éventuellement plus immunosuppressives. Les travaux de Suzuki et al suggéraient également cela puisque les Treg FOXP3⁺VEGFR2⁺ intratumoraux étaient associés à un moins bon pronostic chez des patients atteints de CCR (558). Cependant, dans nos travaux menés dans le modèle CT26, si le nombre et la prolifération des Treg était diminué par un traitement anti-angiogénique ciblant la voie VEGF-A/VEGFR, leurs fonctions suppressives n'étaient pas affectées, lorsque mis en culture avec des LT CD4⁺ conv.

En revanche, nous avons montré dans les modèles murins que les AA permettaient une baisse des Treg Th1-like, et du ratio Th1-like/Th1. Cet effet pourrait être particulièrement intéressant dans le rétablissement d'une réponse effectrice Th-1 si l'on considère que les Treg Th1-like sont effectivement spécialisés dans le contrôle de la réponse Th1. Comme décrit précédemment, au-delà d'une spécificité fonctionnelle intrinsèque, la spécialisation des différentes sous-populations est liée d'une part à la capacité migratoire spécifique de chacune (170) et d'autre part à leur prolifération spécifique en parallèle de celle de la population Th correspondante, en réponse à une stimulation antigénique particulière (162). Ces capacités ne sont pas appréciables par une des fonctions suppressives in vitro telle que nous l'avons analysé sous-estime peut-être la spécialisation des Treg modulés par l'axe VEGFR-A/VEGFR2.

Une perspective de ce travail est donc de mieux caractériser la spécificité phénotypique et fonctionnelle des Treg VEGFR2⁺ in vitro et in vivo. La caractérisation in vivo de ces Treg est cependant difficile car il s'agit d'une très faible population, particulièrement en périphérie chez l'Homme, et reste assez peu nombreuse et difficile à isoler dans les tumeurs.

Nous analyserons ainsi par cytométrie en flux, RT-PCR quantitative et microarray, le phénotype des Treg VEGFR-2⁺ issus de souris porteuses de tumeur et de patients atteints de cancer. Nous pourrions alors étudier : l'expression de récepteurs de chimiokines impliquées dans le recrutement et la spécialisation des Treg au niveau des tumeurs (telles que CXCR3, CCR4, CCR5, CXCR4, CCR10, CCR6), l'expression de molécules impliquées dans la survie (Bad, Bcl2) et la prolifération (Ki67) des Treg, ou encore l'expression de molécules impliquées dans

la fonction des Treg (telles que PD-1, Tim-3, CTLA-4, CD73 et TGF β). Nous pourrions ainsi comparer le profil phénotypique des Treg VEGFR-2⁺ avec les Treg VEGFR-2⁻.

Afin d'étudier les propriétés immunosuppressives des Treg VEGFR-2⁺, nous analyserons d'une part leur capacité de production cytokinique, notamment de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 ou le TGF β .

Quel est l'impact de la modulation des Treg sur la réponse effectrice, et en particulier la réponse Th1 ?

Si l'impact des AA sur différents phénomènes immunosuppresseurs est de plus en plus décrit, leur rôle dans le rétablissement d'une réponse immunitaire effectrice efficace est moins bien décrit. Il a été observé dans certains modèles murins que les traitements ciblant la voie VEGF-A/VEGFR2 entraînait une augmentation des TIL effecteurs et de la production d'IFN γ , alors que dans d'autres modèles, le sorafenib n'avait pas d'impact sur la réponse Th1.

Nous étudierons plus précisément leur impact sur les cellules immunitaires effectrices. Pour cela nous isolerons par tri au cytomètre de flux des Treg VEGFR-2⁺ issus du sang périphérique, de rates ou de ganglions de souris porteuses de tumeur et de patients atteints de cancer que nous cultiverons avec des Tconv en tenant compte des différentes sous-populations, des lymphocytes T CD8⁺ ou des cellules NK. Nous pourrions alors analyser l'impact des Treg VEGFR-2⁺ sur la prolifération des lymphocytes T, par suivi de la prolifération au CFSE ou thymidine tritiée, ainsi que sur les capacités lytiques des cellules NK. Enfin nous comparerons ces résultats avec ceux obtenus avec des Treg VEGFR-2⁻.

La baisse des Treg elle prédictive de l'efficacité ou de la toxicité des anti-angiogéniques (bevacizumab ou aflibercept) ?

Par ailleurs, à ce jour, aucun facteur prédictif d'efficacité des anti-angiogéniques n'a été identifié dans le cancer colorectal. Chez l'homme, la diminution des Treg a néanmoins été corrélée à la survie globale chez des patients atteints de cancer du rein métastatique traités par sunitinib (521). Cependant, le sunitinib est un inhibiteur multicible et le rôle de l'inhibition de VEGFA/VEGFR2 n'est donc pas clairement établi.

Si on émet l'hypothèse que la modulation des mécanismes immunosuppresseur favorise la réponse effectrice, et donc l'effet anti-tumoral, la baisse des Treg pourrait être associée à une meilleure efficacité anti-tumorale et servir de biomarqueur prédictif.

Nous souhaitons donc évaluer la valeur pronostic des Treg et surtout la valeur pronostique et prédictive de la diminution des Treg par les anti-angiogéniques sur une plus grande cohorte de patients. Dans ce but, des études ancillaires d'essais cliniques prospectifs sont en cours. Dans le premier, la cohorte COBEQOL/EPITOPES CRC02, les patients traités en 1^{ère} ligne métastatique par une chimiothérapie associée ou non au bevacizumab ont été prélevés à J0 et J28, afin d'analyser le taux de Treg CD45RA⁻ et/ou Ki67 et son évolution comme facteur pronostique/prédictif d'efficacité du bevacizumab. Les inclusions dans cette première étude sont terminées, et le suivi est en cours, permettant une analyse prochaine de ces données, qui seront également corrélées à d'autres paramètres immunitaires. Une analyse intermédiaire des premiers patients est en cours. Une deuxième étude est en cours. Il s'agit d'un essai de phase II prospectif et randomisé incluant des patients de 65 ans ou plus pour recevoir une chimiothérapie de 1^{ère} ligne par LV5FU2 seul ou en association avec de l'aflibercept (étude Prodiges 25). L'étude, qui prévoyait initialement d'inclure 118 patients avant fin 2017, est actuellement encore en cours d'inclusion avec 106 patients inclus à la date du 13 octobre 2019. Les données de cette étude, qui constitue la première cohorte randomisée pour l'étude des Treg, ne seront donc analysables qu'après la fin des inclusions et de la période de suivi de 2 ans.

Par ailleurs, ces phénomènes immunomodulateurs pourraient avoir un impact sur la toxicité des AA. En effet, les AA et en particulier l'aflibercept peut entraîner une toxicité digestive dont la diarrhée. L'étude VELOUR retrouvait une diarrhée de grade ≥ 3 chez près de 20% des patients versus 7% dans le groupe sans aflibercept (491). Des observations récentes ont montré que chez des patients avec une diarrhée sévère induites sous chimiothérapie + aflibercept, des biopsies systématiques de la muqueuse colique retrouvaient dans tous les cas une colite lymphocytaire (183). Le rôle spécifique et non redondant du VEGF et du PlGF a été suggéré. En effet, la suppression de l'expression du PlGF favorise l'induction de colite chez la souris dans un modèle de colite induite (565). Si des lésions ischémiques en réponse à l'hypoxie de la muqueuse intestinale semble jouer un rôle dans la survenue de ces phénomènes pathologiques, on peut émettre l'hypothèse que la modulation des mécanismes immunosuppresseurs par les anti-VEGF-A et anti-PlGF pourrait aussi favoriser l'accumulation de LT CD8⁺ à l'origine de ces colites. En effet ces colites microscopiques lymphocytaires s'apparentent à un moindre degré aux colites immuno-induites que l'on observe fréquemment lors d'un traitement avec un ICI, plutôt qu'aux colites ischémiques. Pour supporter cette hypothèse de toxicité immuno-induite, il a aussi été observé que ces colites régressaient avec une corticothérapie à visée digestive

(budésonide). Nous souhaitons analyser dans le cadre des études ancillaires CRC02 et PRODIGE 25 la corrélation entre la modulation des Treg et la survenue de la toxicité digestive.

4. D'autres voies de l'angiogenèse peuvent-elles participer à la modulation des Treg

Le PlGF peut-il moduler l'effet de la voie VEGF-A/VEGFR sur les Treg

En mettant en évidence le rôle de la voie VEGF-A/VEGFR2 dans la diminution des Treg, nous avons observé que les patients traités par bevacizumab avaient une diminution significative des Treg comparés à ceux traités par chimiothérapie seule. Cependant, la baisse des Treg pouvait être plus ou moins marquée. En effet, si 2/3 des patients traités par bevacizumab avaient une diminution de plus de 10% des Treg après 2 cycles de bevacizumab, 1/3 des patients ne montrait pas ou peu de diminution. Des mécanismes de résistance secondaire aux anti-angiogéniques ciblant la voie VEGF-A/VEGFR2 ont été décrits et peuvent contribuer à l'échappement tumoral, en particulier via la régulation positive de facteurs pro-angiogéniques alternes, comme la voie PlGF/VEGFR1. Par ailleurs, certains effets immunomodulateurs ont été décrits en lien avec le PlGF et sont décrits en introduction.

Lorsque nous avons étudié les effets immunomodulateurs avec l'aflibercept, nous avons retrouvé une baisse profonde des Treg quasi systématique chez les patients traités en 1^{ère} ligne par l'association chimiothérapie + aflibercept dans le cadre de l'essai FFCD 1302. Bien que nous ne disposions pas de données comparatives, on peut émettre l'hypothèse que le blocage combiné de la voie VEGF-A/VEGFR-2 et PlGF/VEGFR-1 pourrait augmenter l'effet immunomodulateur, comparé à un blocage isolé de la voie VEGF-A/VEGFR2. Il faut souligner cependant que le blocage isolé de VEGFR-1 ne diminuait pas les Treg chez la souris dans nos travaux, mais tenant compte des interactions complexes entre les voies PlGF/VEGFR1 et VEGF-A/VEGFR2, il n'est pas exclu que le blocage combiné des 2 voies pourrait agir de manière synergique et/ou permettre d'éviter certaines résistances au blocage du VEGFR2.

Nous avons observé avec l'aflibercept dans le modèle CT26 et chez les patients atteints de CCRm que la baisse des Treg effecteurs était quasi systématique et assez marquée et que le ratio Th1-like/Th1. Cependant, cette baisse n'était pas toujours associée d'une baisse de la prolifération. Ainsi, les mécanismes par lesquels le PlGF pourrait avoir un impact sur la modulation des Treg dans le contexte d'un blocage du VEGF-A/VEGFR2 restent à élucider.

Une des perspectives de notre travail est l'analyse de l'effet propre du PlGF ou de l'inhibition du PlGF, ainsi que l'analyse de l'effet combiné ou du blocage des 2 voies. La mise en évidence d'un effet immunomodulateur spécifique de l'aflibercept pourrait permettre d'envisager des stratégies thérapeutiques associant aflibercept à immunothérapies. En effet, si de nombreuses études sont disponibles ou en cours avec des combinaison bevacizumab + immunothérapie, aucune donnée n'est disponible avec l'aflibercept.

La voie HGF/c-Met peut-elle moduler les Treg, et par quel mécanisme

Dans l'étude ancillaire de l'essai randomisé PRODIGE 20 menée dans le cancer gastrique métastatique, nous avons observé que les Treg étaient significativement diminués chez les patients traités par chimiothérapie + rilotumumab (anti-HGF), alors qu'il n'y avait pas de baisse des Treg chez les patients des autres bras (chimiothérapie seule ou chimiothérapie + anti-EGFR) (données non montées). Cet effet pourrait être lié en partie à l'interaction entre les voies HGF/c-MET et VEGF/VEGFR2. En effet il a été montré que l'activation de la voie HGF/c-MET pouvait induire l'expression de VEGF ainsi que celle de VEGFR-2. Ainsi l'inhibition de la voie HGF/c-MET pourrait indirectement inhiber VEGF-A/VEGFR2, à l'origine de la baisse des Treg.

Cependant, la modulation de la voie HGF/c-MET pourrait avoir un impact direct sur les cellules immunitaires. Dans le but d'étudier le rôle de l'HGF dans la modulation des Treg dans le cancer de l'estomac, plusieurs travaux ont été réalisés par notre équipe (Palle et al. JFHOD 2018 ; Hirsch et al. ESMO 2018, annexe 2 et 3). Ces travaux ont premièrement montré que les Treg et les T conv périphériques issus d'une cohorte prospective de patients atteints de cancer de l'estomac n'exprimaient pas le c-Met à leur surface. Ces données suggèrent donc un effet indirect de l'HGF sur la modulation des Treg.

En revanche, il a été montré que les monocytes de ces patients, cellules précurseur des DC, exprimaient le c-Met à leur surface. Par ailleurs, il a été confirmé que les monocytes circulants des patients issus de l'étude MEGA/Prodige 17 exprimaient également le c-met. Enfin, in vitro, Le traitement de monocytes par HGF en présence de GM-CSF et d'IL-4 induisait le développement de cellules exprimant les marqueurs de DC CD11c et HLA-DR, diminuait l'expression des molécules de co-stimulation CD80, CD83 et CD86 et inhibait leur maturation induite par LPS. De plus, la stimulation par le HGF augmentait la sécrétion de la cytokine protoléroène IL-10. Ainsi, la différenciation des monocytes en présence d'HGF pourrait entraîner

une différenciation en DC immature pro-toléro-gène, et ainsi moduler la proportion de Treg. Nous allons poursuivre ces travaux de caractérisation des effets de l'HGF sur les monocytes, en étudiant in vitro l'effet de ces monocytes différenciés en présence d'HGF sur la prolifération et la fonction des Treg, et en étudiant in vivo ces monocytes exprimant c-MET au sein des tumeurs dans des modèles murins ou des pièces opératoires de cancer gastrique.

5. Nos résultats peuvent-ils permettre une meilleure sélection des patients candidats à l'immunothérapie dans le CCR et le CG

Les ICI ont été testés dans ces deux principales localisations de cancers de l'épithélium glandulaire digestif. Cependant, que ce soit dans le CG comme dans le CCRm, l'efficacité reste limitée à un petit nombre de patients, qu'on ne sait pas encore bien identifier. Le rôle du MMR est bien démontré dans les deux localisations, et il a été bien établi que les tumeurs MSI/dMMR sont de bons candidats à l'immunothérapie. En revanche, dans les tumeurs MSS/pMMR, peu de patients répondent, et pour le moment aucun facteur prédictif d'efficacité n'a été identifié. Dans les CCRm, la charge mutationnelle tumorale pourrait être un élément intéressant, comme montré dans une analyse de sous-groupe d'un essai récent (Xueyu Chen et al ASCO 2019). Dans les cancers gastriques, la principale piste explorée à ce jour est l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales, éventuellement combiné avec l'expression PD-L1 par les TIL (Combined positive score, CPS), puisqu'elle est un élément pronostic dans ces cancers, et que de plus il s'agit du seul facteur prédictif validé dans une autre localisation (cancers pulmonaires). Cependant, ces potentiels facteurs prédictifs n'ont pas été confirmés dans les essais récents. Dans certains types tumoraux, l'analyse des TIL a été suggéré comme potentiel facteur prédictif d'efficacité de l'immunothérapie (566). La valeur pronostic des TIL dans le CCR est largement décrite y compris dans les tumeurs MSS/pMMR. Nous avons retrouvé dans notre étude que les TIL CD8⁺ étaient associés à un meilleur pronostic dans le CG métastatique. Ces données constituent un fort rationnel pour l'étude des TIL CD8⁺ comme facteur prédictif d'efficacité des ICI, dans les CCR et les CG métastatiques MSS/pMMR, et permettre ainsi de sélectionner des nouvelles populations susceptibles de répondre aux ICI au-delà de ceux MSI/dMMR. De plus, les TIL CD8⁺ étaient, après exclusion des CG MSI/dMMR, significativement moins nombreux dans les formes diffuses ou mixtes que dans les formes

intestinales, de même que les Treg circulants et les NK circulants. Ces données, suggèrent que les formes diffuses/mixtes de CG pourraient être des tumeurs ignorées par le système immunitaire, et donc potentiellement moins sensibles aux immunothérapies. La classification histologique de Lauren pourrait également être un facteur prédictif à prendre en compte, ou au moins de stratification dans les futurs essais d'immunothérapie dans les CG.

Par ailleurs, les Treg ont été décrits comme participant aux mécanismes de résistance aux ICI (567). La quantification des Treg périphériques, et la compréhension du rôle et de la régulation des différentes sous-populations pourrait également contribuer à mieux sélectionner les patients susceptibles de répondre à l'immunothérapie.

6. Nos résultats peuvent-ils fournir des pistes d'optimisation des stratégies d'immunothérapies

Intégration de cet effet dans des combinaisons AA + immunothérapie : un challenge non résolu dans le CCR pMMR

Nos travaux ont mis en évidence le rôle majeur de l'angiogenèse et des anti-angiogéniques dans la régulation des Treg. En parallèle notre équipe a également mis en évidence le rôle de l'angiogenèse l'accumulation des MDSC d'une part (Pointet JFHOD 2015, annexe 5) et sur l'exhaustion des CD8 d'autre part (Voron et Al. J exp med, annexe 1) (450), et que les AA étaient capables de diminuer ces phénomènes d'exhaustion, en particulier l'expression de PD1. Nous avons, dans ces travaux, suggéré que les AA pourraient conditionner l'environnement immunitaire des tumeurs et améliorer l'efficacité des immunothérapies, en particulier les anti-PD-1. Nos travaux ont donc constitué un fort rationnel pour des combinaisons AA et immunothérapies. Depuis, de nombreux travaux ont étudié les effets biologiques et cliniques de ces associations. Ces résultats ont donné lieu à de nombreux essais cliniques, en particulier avec la combinaison atezolizumab (anti-PD-L1) et bevacizumab (anti-VEGF-A) avec de résultats préliminaires très encourageants dans différents types de tumeur. Nous avons décrit ces effets biologiques et cliniques en introduction de ce manuscrit.

Cependant malgré ces signaux biologiques et cliniques, la combinaison atezolizumab + bevacizumab n'a montré aucun signal d'efficacité chez des patients atteints les CCRm pMMR dans un essai randomisé récent.

La caractérisation phénotypique et fonctionnelle des Treg pourrait permettre d'améliorer la compréhension des mécanismes immunitaires précis mis en jeu par les AA, et des phénomènes d'échappement à ces mécanismes. Une perspective de notre travail sera d'étudier plus précisément l'évolution des cellules immunitaires induites par des combinaisons AA/ICI, en particulier les différentes sous-population de Treg, les autres cellules immunosuppressives comme les MDSC, et leur impact sur la réponse effectrice.

Par ailleurs, la compréhension du rôle du PlGF et de l'HGF pourrait également permettre d'optimiser ces stratégies combinées, en ciblant plusieurs voies de l'angiogenèse. Nous étudierons ainsi dans des modèles murins les effets biologiques et cliniques des combinaisons aflibercept et/ou cabozantinib avec un anti-PD-1.

Au-delà des combinaisons AA/ICI, d'autres stratégies doivent être explorées dans les tumeurs ignorées par le système immunitaire

Enfin, l'identification dans les cancers gastriques des formes diffuses/mixtes comme ayant un phénotype évoquant une « cold tumor », ignorées par le système immunitaire, doit faire rechercher de nouvelles stratégies thérapeutiques, afin de rendre ces tumeurs immunogènes. Les mécanismes d'ignorance immunitaires ne sont cependant pas bien élucidés. Parmi les mécanismes possibles, on peut citer une plus faible charge mutationnelle de ces tumeurs classées comme « génomiquement stables », une faible expression de PD-L1, une perte d'expression du CMH, ou encore une perte d'expression d'E-Cadherine entraînant une diminution de l'accumulation des LT CD8⁺CD103⁺ (T résidents mémoires). En tout cas, ces mécanismes et le faible nombre de cellules régulatrices ou effectrices observés font suggérer que des stratégies d'immunothérapie non spécifique comme une combinaison AA/ICI visant à moduler la réponse immunitaire ne suffiront pas à transformer une tumeur ignorée en tumeur immunogène. Ainsi, d'autres stratégies d'immunothérapie devront être envisagée pour ces patients. En particulier, des traitements combinés visant à outrepasser ces mécanismes d'ignorance immunitaire, comme les CAR-T cells, pourraient être particulièrement d'intérêt.

Conclusion générale

Au travers de ces travaux, nous avons mis en évidence le rôle prépondérant de la voie VEGF-A/VEGFR-2 dans l'induction directe d'une accumulation de Treg favorisant un microenvironnement tumoral immunosuppresseurs. Nos travaux préliminaires suggèrent que, parallèlement à la voie VEGF-A/VEGFR2, d'autres voies alternes de l'angiogenèse comme le PlGF/VEGFR1 ou la voie HGF/c-Met pourraient également avoir un rôle dans la modulation des Treg.

Nous avons mis également en évidence que les traitements ciblant les voies de l'angiogenèse étaient capables de diminuer les Treg, en particulier les Treg Th1-like. Parallèlement, d'autres travaux réalisés dans le laboratoire ont permis de mettre en évidence d'autres mécanismes immunosuppresseurs du VEGF-A comme l'exhaustion des LT CD8⁺, ou l'accumulation des MDSC monocytiques, et la réversion de ces phénomènes par les AA.

La compréhension de ces mécanismes pourrait permettre tout d'abord d'avoir des marqueurs d'efficacité des AA permettant de limiter des prescriptions inutiles. Ensuite, identifier les patients ayant une immunomodulation plus forte avec ces molécules pourrait permettre de mieux sélectionner les patients susceptibles de répondre aux combinaisons AA/immunothérapies, qui n'ont pour l'instant pas démontré d'efficacité dans le cancer colorectal MSS/pMMR. Enfin, ces travaux permettent d'envisager certaines optimisations des combinaisons actuellement testées, grâce à un ciblage combiné de différentes voies anti-angiogéniques au pouvoir immunomodulateur, et à une stimulation spécifique d'une réponse Th1.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence chez des patients traités pour un cancer gastrique métastatique dans une étude prospective, que les TIL CD8⁺ et les NK circulants étaient des facteurs associés à une meilleure survie des patients. Si la valeur des TIL était démontrée dans les cancers localisés, cette étude est la première à montrer qu'ils ont une valeur pronostique dans les formes avancées. Par ailleurs, nous avons montré que les formes histologiques diffuses ou mixtes avaient un microenvironnement tumoral différent, avec un plus faible nombre de Treg circulants et une plus faible infiltration en TIL CD8⁺. Ces résultats suggèrent que les cancers gastriques diffus sont des tumeurs ignorées par le système immunitaire, et susceptibles de moins bien répondre aux ICI. Au total, nos travaux fournissent un rationnel important pour supporter l'utilisation des ICI dans le cancer gastrique avancé de forme intestinal, à l'inverse des formes diffuses. En revanche, de nouvelles stratégies d'immunothérapie peuvent être

envisagées dans les formes diffuses, afin de surpasser cette ignorance immunitaire, comme l'utilisation de CAR T cells.

Annexes

Annexe 1 : Voron et al. J Exp Med 2015

VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8⁺ T cells in tumors

Thibault Voron,^{1,4*} Oriane Colussi,^{1,5*} Elie Marcheteau,^{1*} Simon Pernot,^{1,5} Mevyn Nizard,¹ Anne-Laure Pointet,^{1,5} Sabrina Latreche,¹ Sonia Bergaya,¹ Nadine Benhamouda,² Corinne Tanchot,¹ Christian Stockmann,¹ Pierre Combe,³ Anne Berger,⁴ Franck Zinzindohoue,⁴ Hideo Yagita,⁶ Eric Tartour,^{1,2} Julien Taieb,^{1,5*} and Magali Terme^{1*}

¹INSERM U970, Paris Cardiovascular Research Center, Université Paris–Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75015 Paris, France
²Service d'immunologie biologique, ³Service d'oncologie médicale, ⁴Service de chirurgie digestive, ⁵Service d'hépatogastroentérologie et d'oncologie digestive, Hôpital Européen Georges Pompidou, 75015 Paris, France
⁶Department of Immunology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo 113-8421, Japan

Immune escape is a prerequisite for tumor development. To avoid the immune system, tumors develop different mechanisms, including T cell exhaustion, which is characterized by expression of immune inhibitory receptors, such as PD-1, CTLA-4, Tim-3, and a progressive loss of function. The recent development of therapies targeting PD-1 and CTLA-4 have raised great interest since they induced long-lasting objective responses in patients suffering from advanced metastatic tumors. However, the regulation of PD-1 expression, and thereby of exhaustion, is unclear. VEGF-A, a proangiogenic molecule produced by the tumors, plays a key role in the development of an immunosuppressive microenvironment. We report in the present work that VEGF-A produced in the tumor microenvironment enhances expression of PD-1 and other inhibitory checkpoints involved in CD8⁺ T cell exhaustion, which could be reverted by anti-angiogenic agents targeting VEGF-A–VEGFR. In view of these results, association of anti-angiogenic molecules with immunomodulators of inhibitory checkpoints may be of particular interest in VEGF-A-producing tumors.

One of the major processes involved in tumor appearance and growth is the capacity of tumor cells to develop escape mechanisms to the immune system (Schreiber et al., 2011). Thus, induction of cells with immunosuppressive properties, such as regulatory T (T reg) cells or myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), and promotion of T cell exhaustion are key mechanisms of immune evasion. T cell exhaustion is phenotypically characterized by the expression of inhibitory molecules called inhibitory checkpoints, such as Program Cell Death-1 (PD-1), and functionally by a gradual dysfunction state where effector functions of T cells are blocked. Studies have shown that PD-1–PD-L1 pathway blockade could improve antitumor immune responses in mouse models (Sakuishi et al., 2010). Administration of anti-PD-1 antibody to metastatic melanoma patients leads to durable objective responses in 17–28% of patients.

These responses are associated with an increase in CD8⁺ T cell infiltration (Topalian et al., 2012; Hamid et al., 2013). Thus, blocking the PD-1 pathway could help to overcome T cell exhaustion and restore efficient antitumor responses. In tumors or during chronic viral infections, PD-1 expression is maintained (Wherry et al., 2007). The mechanisms involved in PD-1 expression and exhaustion of tumor-infiltrating T cells are poorly understood, even though a link to antigen persistence has been suggested (Wherry, 2011). Factors produced in the tumor microenvironment could be involved in the induction of PD-1 expression, and thereby of exhaustion in the tumors, for the following reasons: only tumor-infiltrating CD8⁺ T cells and noncirculating CD8⁺ T cells bear an exhausted phenotype and express PD-1 (Baitsch et al., 2011);

*T. Voron, O. Colussi, E. Marcheteau, J. Taieb, and M. Terme contributed equally to this paper.

© 2015 Voron et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

CORRESPONDENCE

Julien Taieb:
julien.taieb@egp.aphp.fr

Abbreviations used: BTLA, B- and T-lymphocyte attenuator; CsA, cyclosporin A; CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; Flt3, Fms-like tyrosine kinase 3; LAG-3, lymphocyte activation gene-3; MDSC, myeloid-derived suppressor cells; NFAT, nuclear factor of activated T-cells; PD-1, Program Death-1; Pi3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PLCγ, phospholipase C γ; TKI, tyrosine kinase inhibitor; T reg cell, regulatory T cells; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, VEGF receptor.

and vaccination protocols have been shown to stimulate antigen-specific CD8⁺ T cells in tumor patients, but these CD8⁺ T cells remain hypo-responsive at the tumor site (Appay et al., 2006). Among immunosuppressive factors produced by tumor cells, VEGF-A exhibits proangiogenic properties but also has a key role in the induction of an immunosuppressive micro-environment (inhibition of dendritic cell maturation, accumulation of MDSC, and induction of T reg cells; Gabrilovich et al., 1996; Huang et al., 2007). We have recently shown that VEGF-A could also directly induce T reg cell proliferation in a VEGFR2-dependent manner in tumor-bearing mice and metastatic colorectal cancer patients (Terme et al., 2013). Targeting the VEGF-A-VEGFR axis with antiangiogenic molecules could decrease T reg cell and MDSC proportions in tumor-bearing mice and cancer patients (Finke et al., 2008; Ko et al., 2009; Cao et al., 2011; Terme et al., 2013). Sunitinib, a multitarget tyrosine kinase inhibitor (TKI) that blocks vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3 (VEGFR1, R2, and R3), platelet-derived growth factor receptors α and β , stem cell factor receptor, and Flt3, has been shown to decrease PD-1 expression at the mRNA level in tumor-infiltrating T cells (Ozao-Choy et al., 2009). However, it is unclear whether the effect of this multitarget molecule results directly from VEGF-A-VEGFR axis inhibition or through another signaling mechanism. In vitro studies have shown that VEGF-A could decrease T cell functions (Gavalas et al., 2012; Ziogas et al., 2012) without addressing the direct role of VEGF-A on the regulation of PD-1 expression and thereby on T cell exhaustion in tumors. Thus, we studied the impact of VEGF-A-VEGFR blockade on PD-1 and other inhibitory receptor expression on CD8⁺ T cells and the direct role of tumor-derived VEGF-A on tumor-induced T cell exhaustion.

RESULTS AND DISCUSSION

Targeting VEGF-A-VEGFR pathway is sufficient to decrease PD-1 expression on intratumoral CD8⁺ T cells

We first analyzed the impact of VEGF-A-VEGFR blockade on PD-1 expression on tumor-infiltrating CD8⁺ T cells in a mouse model of colorectal cancer (CT26). CT26 tumor cells produce high levels of VEGF-A in vitro (Terme et al., 2013). In vivo, the VEGF-A concentration was ~ 10 times higher in the tumor microenvironment, reaching 366.9 ± 53.8 pg/ml as compared with plasma level (31.4 ± 4.38 pg/ml). In the same way, PD-1 expression was low on splenic CD8⁺ T cells from naive ($3.12 \pm 2.60\%$) and tumor-bearing mice ($3.27 \pm 2.43\%$), but strongly increased on intratumoral CD8⁺ T cells (54.85 ± 16.16 pg/ml; $P < 0.0001$). CT26 tumor-bearing mice were treated with anti-VEGF-A antibody or different TKI targeting (sunitinib) or not (masitinib) VEGFR. DMSO or mouse serum were given to mice as control for TKI and anti-VEGF-A antibody, respectively, without modulating PD-1 expression compared with nontreated tumor-bearing mice (unpublished data). Treatments targeting the VEGF-A-VEGFR axis resulted in a significant reduction of PD-1 expression on intratumoral CD8⁺ T cells, whereas masitinib (Fig. 1, a-c, right), a TKI that targets c-Kit, PDGFR, and Fak

kinases but not VEGFR (Dubreuil et al., 2009), had no effect. These treatments induced significant antitumor effects (Fig. 1, a and b, left). Thus, blocking VEGF-A-VEGFR axis decreases PD-1 expression on intratumoral CD8⁺ T cells and restores IFN- γ production in intratumoral CD8⁺ T cells ($28.35 \pm 5.7\%$ in control group and $62.11 \pm 5.3\%$ in anti-VEGF-A-treated mice after PMA/ionomycin restimulation; $P = 0.0015$). Interestingly, the antitumor effect of anti-VEGF-A is at least in part due to CD8⁺ T cells because depletion of CD8⁺ T cells reduced antitumor effect during anti-VEGF-A treatment (Fig. 1 d). We next looked for evidence of VEGF-A involvement in PD-1 expression and found that the intratumoral VEGF-A level was significantly correlated with PD-1 expression on tumor-infiltrating CD8⁺ T cells (Fig. 1 e; $r = 0.502$; $P = 0.0398$). We also took advantage of a fibrosarcoma cell line nullizygous for VEGF-A expression (Stockmann et al., 2008). Importantly, in VEGF-null tumors (MEF KO), the percentage of PD-1 expression on intratumoral CD8⁺ T cells was greatly decreased compared with MEF wild-type counterparts (Fig. 1 f).

VEGF-A enhances PD-1 expression on VEGFR-expressing CD8⁺ T cells in vitro

To understand whether VEGF-A can act directly on CD8⁺ T cells, we first analyzed the expression of the two VEGF-A receptors, VEGFR-1 and -2, on CD8⁺ T cells in vivo. We observed that these two receptors are expressed only at very low levels in spleens of tumor-free and tumor-bearing mice, but are strongly increased on tumor-infiltrating CD8⁺ T cells (Fig. 2 a). These VEGFR⁺ CD8⁺ T cells also expressed PD-1 (unpublished data). Because tumor-infiltrating T cells bear an activated phenotype unlike splenic CD8⁺ T cells, these results suggested that VEGFR expression could be associated with T cell activation (Whiteside and Parmiani, 1994). To recapitulate this phenomenon in vitro, we analyzed expression of these receptors after stimulation of purified CD8⁺ T cells with different doses of anti-CD3 by flow cytometry and confocal microscopy. Expression of VEGFR-1 and -2 was induced by stimulation with $3 \mu\text{g/ml}$ of anti-CD3 and became significant at $10 \mu\text{g/ml}$ after 48 h of culture (Fig. 2, b-d). Because CD8⁺ T cells can express VEGF receptors after activation, we then analyzed the impact of VEGF-A on these T cells. Anti-CD3 stimulation induced expression of PD-1, but addition of VEGF-A enhanced PD-1 expression on these cells in a dose-dependent manner (Fig. 2, e-f). Furthermore, this effect was blocked when anti-VEGF-A antibody was added to the culture (unpublished data). Thus, VEGF-A directly increases PD-1 expression on activated CD8⁺ T cells.

VEGF-A directly enhances expression of inhibitory receptors involved in T cell exhaustion

PD-1 is the first inhibitory receptor associated with T cell exhaustion. However, other receptors are expressed on exhausted T cells, such as Tim-3, CTLA-4, and Lag-3 (Sakuishi et al., 2010; Woo et al., 2012; Duraiswamy et al., 2013). Density and co-expression of these different molecules have been associated with the magnitude of T cell exhaustion. The more

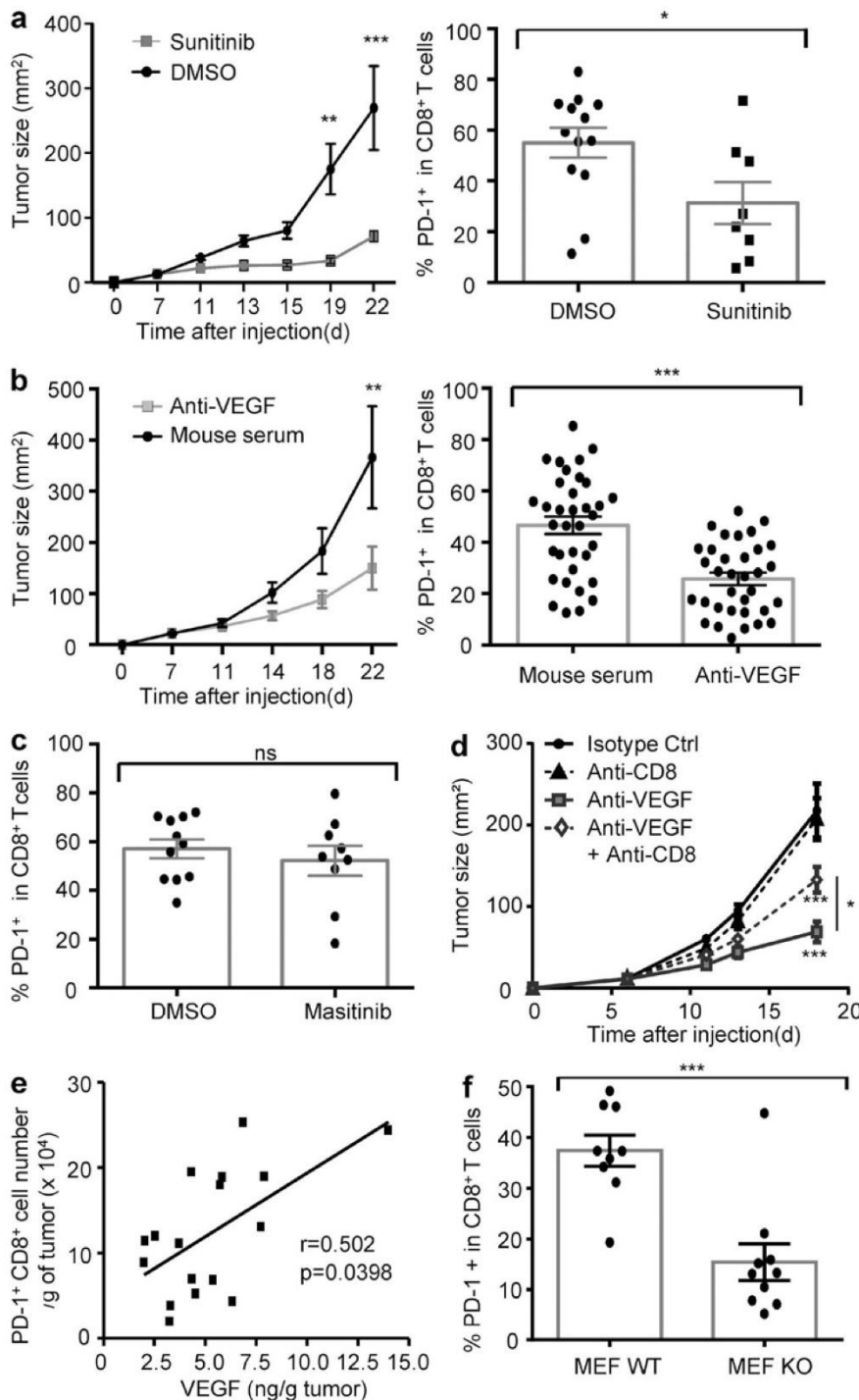


Figure 1. VEGF-A-VEGFR inhibition decreases PD-1 expression on intratumoral CD8⁺ T cells. CT26 tumor-bearing mice were treated with sunitinib or DMSO (as a control; a), or anti-VEGF-A antibody or mouse serum (as a control; b), or masitinib or DMSO (as a control; c). Treatments were started when tumors reached 9–10 mm². Tumor growth (left) was shown. Mice were sacrificed at day 22 after 2 wk of treatment, and PD-1 expression on tumor-infiltrating CD8⁺ T cells was analyzed (right). Each dot represents an individual mouse, and histograms represent mean \pm SEM of 2–4 pooled experiments with at least 4 mice/group. *, $P = 0.0439$; ***, $P < 0.001$. (d) Depletion of CD8⁺ T cells decreases anti-VEGF-A-induced antitumor effects. (e) Correlation of VEGF-A concentration/gram of tumor tissue and number of PD-1-expressing CD8⁺ T cells/gram of tumor tissue (determined by flow cytometry). Each dot represents an individual tumor sample. (f) PD-1 expression on tumor-infiltrating CD8⁺ T cells was analyzed on wild-type MEF-tumor bearing mice (MEF WT) and VEGF-A-deleted MEF cells (MEF KO) after 14 d of tumor growth. Each dot represents an individual mouse. Histograms represent mean \pm SEM of 2 pooled experiments with 4–5 mice/group. For tumor growths, one representative experiment out of 3 is shown with 5 mice/group. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

the T cells express these receptors the more they are dysfunctional (Blackburn et al., 2009). We observed that VEGF-A not only enhances PD-1 expression but also increases the percentages of Tim-3- and CTLA-4-expressing CD8⁺ T cells in a dose-dependent manner (Fig. 3, a–c). The levels of the expression for each molecule (PD-1, Tim-3, CTLA-4, and Lag-3) were also increased in a dose-dependent manner (Fig. 3 d).

We then analyzed the simultaneous co-expression of these receptors. Strikingly, compared with the basal expression of 0–1 inhibitory receptor expressed on CD8⁺ T cells in the absence of exogenous VEGF-A, increasing VEGF-A concentrations induced the simultaneous expression of 3–4 inhibitory receptors on more than 2/3 of T cells (Fig. 3 e). To determine whether VEGF-R1 or VEGF-R2 are involved in

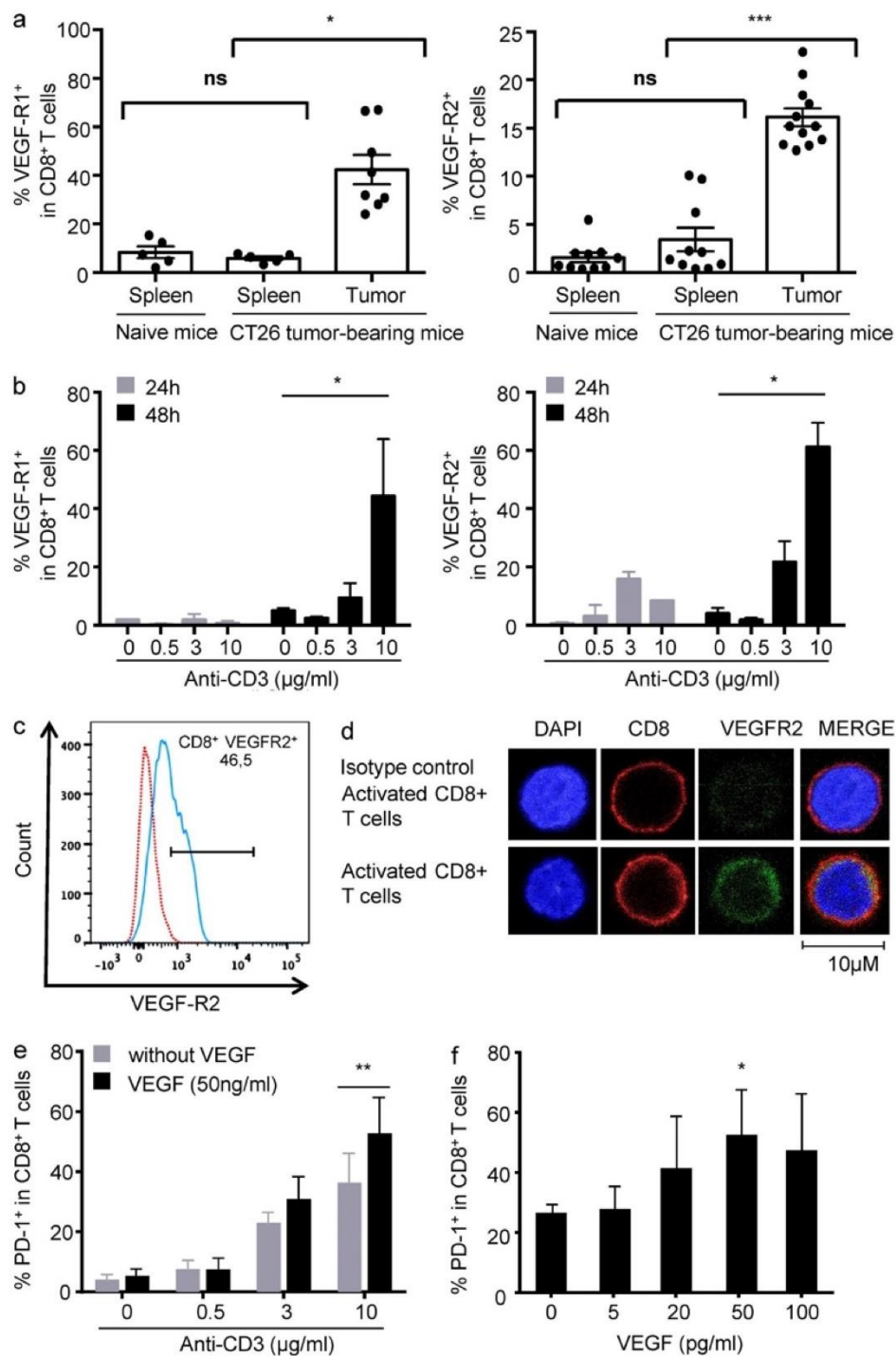


Figure 2. VEGF-A enhances PD-1 expression on CD8⁺ T cells in vitro. (a) VEGF-R1 (left) and -R2 (right) expression is shown on CD8⁺ T cells from tumors and spleen of tumor-free (naive) and CT26 tumor-bearing mice. Each dot represents an individual mouse, histograms represent mean \pm SEM of 2 pooled experiments with 3–5 mice/group. (b) VEGF-R1 (left) and -R2 (right) expression on purified CD8⁺ T cells after 24 and 48 h of culture with various doses of plate-bound anti-CD3 antibody. (c and d) Same experimental setting as in b, but showing a representative staining of VEGF-R2 by flow cytometry (c) and confocal microscopy (d). Isotype control of anti-VEGFR2 antibody is shown (blue line for c and top for d). (e) PD-1 expression on purified CD8⁺ T cells after 48 h of culture with plate-bound anti-CD3 with or without VEGF-A (50 ng/ml). (f) Same experiment as in e but with 10 μ g/ml of plate-bound anti-CD3 and various doses of VEGF-A. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

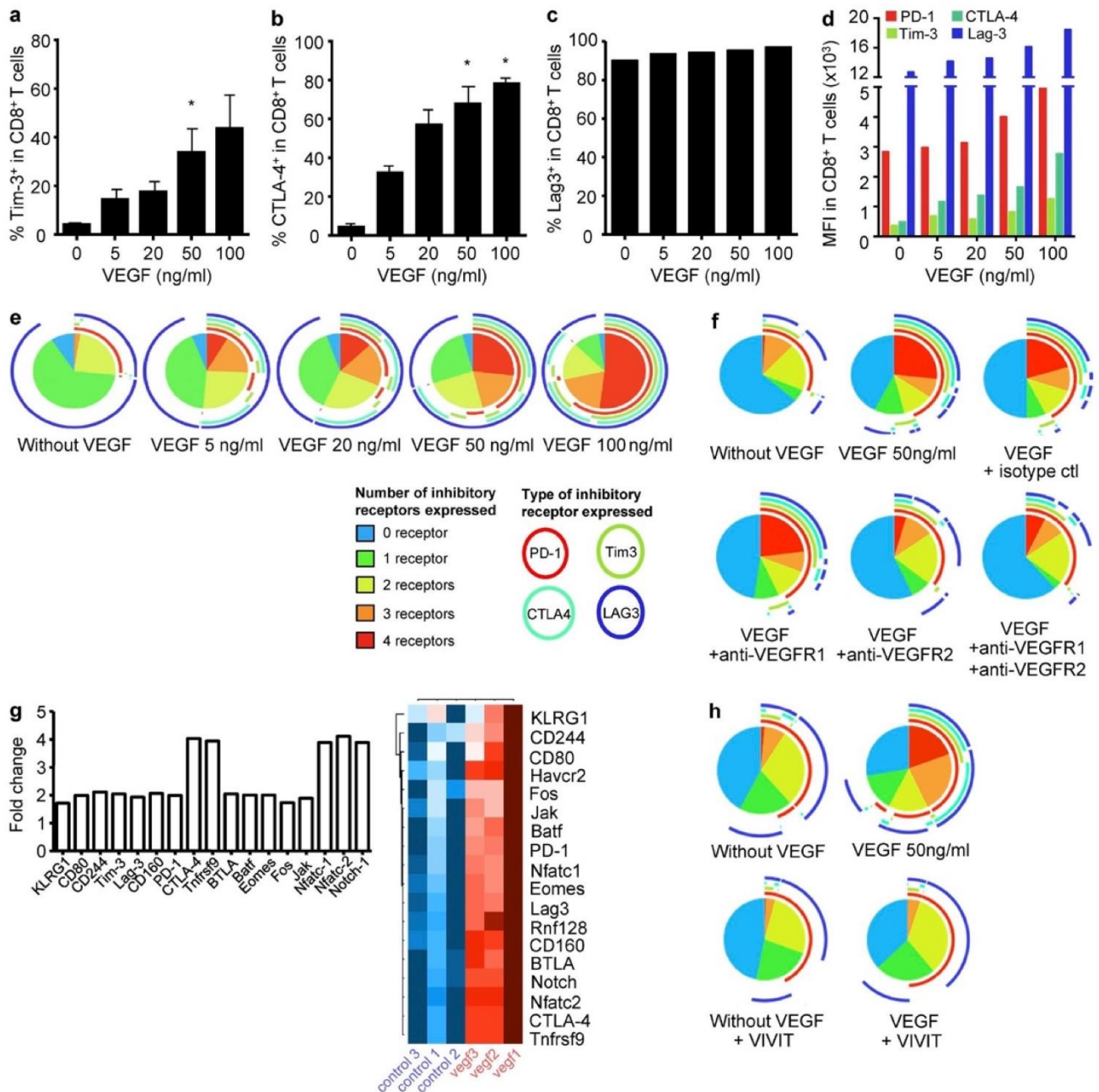


Figure 3. VEGF-A enhances co-expression of inhibitory receptors involved in CD8⁺ T cell exhaustion in a VEGF-R2 and NFAT-dependent manner. Percentages of Tim-3 (a), CTLA-4 (b), and Lag-3 (c) expression on purified CD8⁺ T cells after 48 h of culture with plate-bound anti-CD3 (10 μg/ml) and various doses of VEGF-A. Histograms represent means ± SEM of 3 pooled experiments. (d) Same experimental settings as in (a) but mean fluorescence intensity (MFI) is shown. (e) The simultaneous expression of inhibitory receptors (PD-1, Tim-3, CTLA-4, and Lag-3) was examined on stimulated CD8⁺ T cells. (f) Same experimental setting as in (e) but in the presence of anti-VEGF-R1 or -R2 antibodies. (g) Transcriptional analyses of gene products linked to T cell exhaustion and VEGF-R2 signaling in CD8⁺ T cells stimulated or not with VEGF-A using a microfluidic card designed for qRT-PCR (TaqMan Low Density Mouse Immune Array from Applied Biosystems). Graph represents log fold changes (relative to nontreated controls, calculated with the $\Delta\Delta CT$ method (normalization with RNA18s as endogenous control) of transcripts. (h) Same experimental setting as in (e) in the presence of 11R-VIVIT. For simultaneous expression of inhibitory receptors, one representative experiment out of three is shown. *, $P < 0.05$.

VEGF-A-mediated T cell exhaustion, we added neutralizing antibodies to the CD8⁺ T cell culture in the presence of VEGF-A. Anti-VEGF-R2, but not anti-VEGF-R1 antibody,

was able to block the VEGF-A-induced up-regulation of these inhibitory receptors (Fig. 3 f), demonstrating the involvement of VEGF-R2 in this phenomenon. To extend this

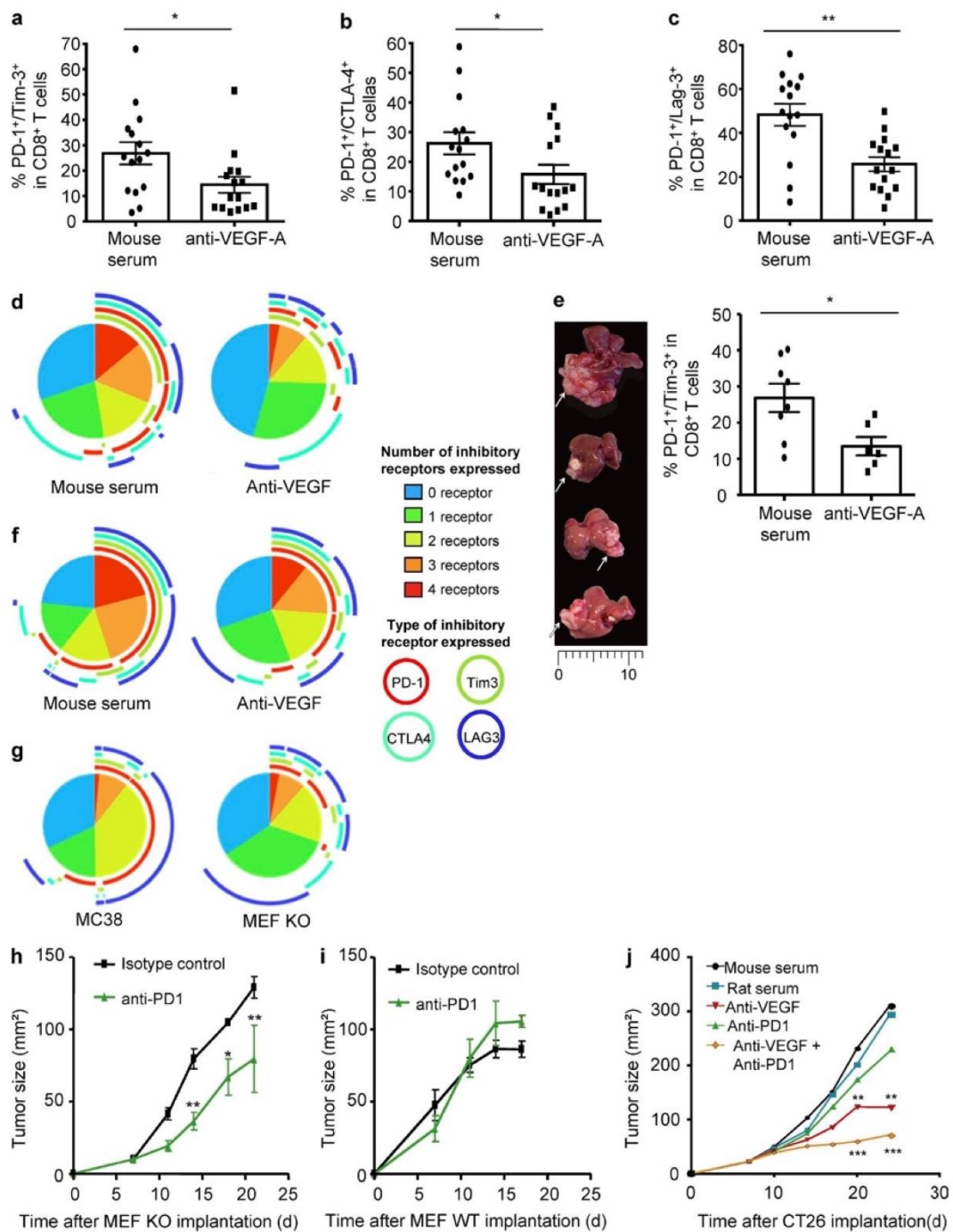


Figure 4. VEGF-A neutralization decreases expression of inhibitory receptors involved in exhaustion on CD8⁺ T cells in heterotopic and orthotopic mouse tumor models. Mice bearing subcutaneous CT26 tumors were treated with anti-VEGF-A antibody or mouse serum (as a control). Co-expressions of PD-1/Tim-3 (a), PD-1/CTLA-4 (b), or PD-1/Lag-3 (c) on intratumoral CD8⁺ T cells have been analyzed. 3 pooled experiments are shown with 5 mice/group. *, P < 0.05; **, P < 0.01. (d) Co-expression of PD-1, Tim-3, CTLA-4, and Lag-3 has been determined on intratumoral CD8⁺ T cells after 14 d of anti-VEGF-A treatment (day 22). (e) Anti-VEGF-A was given to mice bearing CT26 hepatic metastases. Representative pictures of hepatic metastases (left panel) and the percentages of intratumoral CD8⁺ T cells expressing PD-1/Tim-3 (right panel) were shown. Two pooled experiments are shown with 3–4 mice/group. *, P < 0.05. (f) Same experimental setting as in d, but on CT26 hepatic metastases. (g) Co-expression of inhibitory receptors on CD8⁺ T from MC38 and MEF KO tumors. (h–i) VEGF-KO MEF (h) and wild-type MEF tumor-bearing mice (i) were treated with anti-PD-1 alone twice a week starting at day 7. (j) CT26 tumor-bearing mice were treated with anti-VEGF-A or anti-PD-1 alone or both. Tumor growth was monitored twice a week. One representative experiment out of three is shown, with five mice per group. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

observation, we analyzed the differential expression of genes coding for inhibitory receptors involved in CD8⁺ T cell exhaustion. Quantitative RT-PCR analysis showed that other inhibitory receptors, such as CD244/2B4, CD160, and BTLA, were also enhanced by VEGF-A stimulation (Fig. 3 g). These results showed that VEGF-A enhances expression of many different inhibitory receptors involved in CD8⁺ T cell exhaustion. Furthermore, an increased expression of NFAT was observed after VEGF-A stimulation (Fig. 3 g). NFAT is known to be involved in VEGF-R2 signaling (Liu et al., 2003; Schweighofer et al., 2009), as well as in the control of PD-1 and CTLA-4 expression (Gibson et al., 2007; Oestreich et al., 2008). To determine if VEGF-A-induced T cell exhaustion is dependent on NFAT activation, we used a specific NFAT inhibitor (11R-VIVIT; Le Roy et al., 2012). Interestingly, NFAT inhibition blocked the VEGF-A-induced simultaneous expression of the 4 inhibitory receptors (Fig. 3 h). Among the different signaling pathways activated by VEGFR2 (PI3K-Akt, PLC γ , and Erk), the PLC γ -calcineurin pathway is known to activate NFAT (Schweighofer et al., 2009). Upon VEGF-A treatment, increased PLC γ phosphorylation was observed in CD8⁺ T cells by Western blot (unpublished data). Furthermore, inhibition of PLC γ and calcineurin by the chemical inhibitor U73122 and cyclosporine A (CsA), respectively, resulted in an inhibition of VEGF-A-induced inhibitory receptor expression on CD8⁺ T cells (unpublished data). Together, these results show that VEGF-A enhances the expression of inhibitory receptors involved in T cell exhaustion via activation of the VEGFR2-PLC γ -calcineurin-NFAT pathway.

Targeting VEGF-A in tumor models reverts expression of inhibitory molecules associated with T cell exhaustion

To document if VEGF-A neutralization could revert expression of PD-1 and other inhibitory receptors *in vivo*, we tested anti-VEGF-A treatment on CT26-bearing mice. CT26 cells were implanted subcutaneously but also directly to the liver by subcapsular injection of tumor cells in the left lobe of the liver resulting in the development of liver metastases within 7–10 d, which is more relevant than our subcutaneous tumor model. Consistent with our *in vitro* results, VEGF-A inhibition decreased the proportion of tumor-infiltrating CD8⁺ T cells expressing PD-1/Tim-3, PD-1/CTLA-4, and PD-1/Lag-3 (Fig. 4, a and c). Analysis of simultaneous expression of these receptors on CD8⁺ T cells revealed that anti-VEGF-A treatment decreased the proportion of tumor-infiltrating CD8⁺ T cells expressing 3–4 receptors when treatment was started when tumors reached ~ 10 mm² (Fig. 4 d). It is of note that anti-VEGF-A treatment has no effect on the expression of 3–4 inhibitory receptors on tumor-infiltrating CD8⁺ T cells when very large tumors were treated (>90 mm² at the beginning of the treatment). Mice bearing hepatic metastases (Fig. 4 e, left) were treated with anti-VEGF-A from day 10–20. Analysis of inhibitory receptors revealed a decrease of CD8⁺ T cells bearing 3–4 inhibitory receptors and mainly of PD-1/Tim-3 expression confirming our results in this more relevant tumor site (Fig. 4, e and f). Interestingly, in two tumor models where

intratumoral VEGF-A level is low, VEGF-null tumors (MEF-KO) and the MC38 colorectal tumor model (133.3 ± 15.35 pg/ml), the proportion of tumor-infiltrating CD8⁺ T cells expressing 3–4 inhibitory receptors was limited ($<25\%$; Fig. 4 g). Together, these results showed that targeting VEGF-A can decrease the VEGF-induced expression of inhibitory receptors mediating CD8⁺ T cell exhaustion, not only in subcutaneously established tumors, but also in hepatic metastases from colorectal cancer.

Combination of anti-PD-1 antibodies with VEGF-A blockade induced a strong and synergistic antitumor effect in tumors producing high levels of VEGF-A

Immunotherapeutic strategies using anti-PD-1 antibodies have been recently developed and resulted in strong antitumor responses in advanced solid tumors (Topalian et al., 2012). However, not all patients experienced an objective response. Because anti-VEGF-A treatment decreases PD-1 expression on intratumoral CD8⁺ T cells but does not fully restore the steady-state level of PD-1 expression, we hypothesized that VEGF-A blockade could help to sensitize T cells to anti-PD-1 antibody treatment in some tumors. We administered anti-PD-1 antibody to VEGF-deleted-MEF tumor cells (Fig. 4 h) or wild-type MEF tumor cells (Fig. 4 i). Interestingly, anti-PD-1 antibody induced a significant antitumor effect only in VEGF-KO MEF tumor-bearing mice (Fig. 4 h) and not in WT MEF tumor-bearing mice (Fig. 4 i), suggesting that VEGF produced by tumor cells limits anti-PD-1-induced antitumor effects. We next tried to combine anti-VEGF-A antibody with anti-PD-1 antibody in our CT26 mouse model of colorectal cancer expressing high levels of VEGF-A (Fig. 4 j). Anti-VEGF-A treatment reduced tumor growth ($P < 0.0001$; Fig. 1 b), and anti-PD-1 antibody alone had no significant effect, but the anti-VEGF-A and anti-PD-1 combination induced a strong antitumor effect (71.91 ± 64.66 mm²) as compared with anti-VEGF-A alone (123 ± 56.21 mm²; $P = 0.05$) or anti-PD-1 alone (227 ± 28.9 mm²; $P = 0.05$). This result suggests that high VEGF-A levels may be involved in resistance to anti-PD-1 treatments and that antiangiogenic therapies targeting VEGF-A-VEGFR in these tumors expressing high levels of VEGF-A could synergize with anti-PD-1 treatment strategies and enhance anti-PD-1-dependent antitumor effects.

Our work shows, to our knowledge for the first time, that VEGF-A produced by the tumor enhances expression of inhibitory immune checkpoints mediating T cell exhaustion on intratumoral CD8⁺ T cells. *In vivo* analysis of VEGFR expression in mouse tumor models revealed that only tumor-infiltrating activated CD8⁺ T cells, and not circulating CD8⁺ T cells, can express VEGFR, which seems to be linked to TCR engagement. *In vitro*, addition of VEGF-A after TCR engagement on CD8⁺ T cells increases expression of inhibitory checkpoints (PD-1, Tim-3, CTLA-4, and Lag-3) in a VEGFR-2/PLC γ /calcineurin/NFAT-dependent manner. In CT26 heterotopic and liver metastases tumor models where intratumoral VEGF-A level is high, anti-VEGF-A treatment

could down-regulate the expression of these inhibitory receptors. Combining antiangiogenic agents targeting the VEGF-A–VEGF-R2 axis could synergize with immunotherapeutic approaches, as shown here, by combining anti-VEGF-A with anti-PD-1 in VEGF-expressing tumors, which are resistant to anti-PD-1 treatment. As in mouse tumor models, tumor-infiltrating CD8⁺ T cells, but not circulating CD8⁺ T cells, derived from colorectal cancer patients express VEGFR2 (48.4 ± 14.25%). Further investigations are needed to determine if VEGF-A could modulate inhibitory receptor expression on human CD8⁺ T cells.

MATERIALS AND METHODS

Animals

6–8-wk-old female BALB/c or C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories and kept in specific pathogen-free conditions at the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U970 animal facility. Experiments respected institutional guidelines and were approved by the Paris-Descartes University ethics committee (CEE434.MT.072.12).

Animal models and treatments

Heterotopic tumor models. Two-colon carcinoma models were used: CT26 and MC38. CT26, an N-nitroso-N-methylurethane-induced undifferentiated colon carcinoma cell line, was obtained from American Type Culture Collection and MC38 was provided by N. Chaput (Institut Gustave-Roussy, France). VEGF KO and wild-type MEF cells were provided by C. Stockmann (INSERM, Paris, France). The VEGF-A-deficient MEFs are isogenic with the wild-type MEFs (Stockmann et al., 2008). CT26 cells (2 × 10⁵) or VEGF-KO MEF and wild-type MEF cells (10⁶) or MC38 (5 × 10⁵) were injected subcutaneously at day 0 in the right flank of BALB/c mice (CT26) or C57BL/6 mice. Tumor growth was monitored twice a week using a caliper.

Model of colorectal liver metastases. At day 0, the BALB/c mice were anesthetized with i.p. injection of 100 µl of ketamine/xylazine and operated on through a midline laparotomy. After liver exposure, a single liver tumor was induced by direct injection of 1.5 × 10⁴ CT26 cells under the liver capsule of the left lobe. The midline incision was closed with interrupted suture. At day 10, all mice were randomized between the control and the treated groups before treatment. At day 24, mice were sacrificed.

Treatments. Treatments were started when the tumors reached 9–10 mm². Sunitinib (Sutent) and masitinib (4-[4-methylpiperazin-1-ylmethyl]-N-[4-methyl-3-[4-pyridin-3ylthiazol-2-ylamino] phenyl]benzamide-mesylate methane sulfonic acid salt) were given by oral gavage at 40 mg/kg daily and 30 mg/kg bid, respectively. Sunitinib and masitinib were dissolved in DMSO and diluted in PBS before administration. Control mice received DMSO diluted in PBS. In this study, masitinib was used as a negative control to probe the VEGFR inhibition of sunitinib. Masitinib is a highly selective TKI that targets a limited number of key kinases involved in various cancers and inflammatory diseases, including c-Kit, PDGFR and Fak, but not VEGFR (Dubreuil et al., 2009). Masitinib is currently the most selective TKI in clinical development or already approved to date. An anti-mouse-VEGF-A antibody (B20-4.1.1) was administered i.p. at 5 mg/kg twice a week.

In some experiments, a neutralizing anti-mouse PD-1 antibody (RPM1-14; Yamazaki et al., 2005) was administered i.p. at 0.25 mg twice a week. Sunitinib was provided by Pfizer, anti-mouse-VEGF-A antibody was provided by Genentech, and masitinib was provided by AB Science SA. After treatments, tumors were dissociated using Gentle Macs dissociator (Miltenyi Biotec). For CD8⁺ T cell depletion studies, anti-CD8 antibody (clone 2.43; BioXcell) or isotype control antibody (rat IgG2a) was administered at 100 µg

i.p. to CT26-tumor bearing mice the day before starting anti-VEGF-A treatment. CD8 depletion was checked by flow cytometry.

Flow cytometry

Cell surface-staining was performed on tumor-infiltrating cells using anti-CD8 (53–6.7; eBioscience), anti-PD-1 (J43; eBioscience), anti-CTLA-4 (UC10-4B9; BioLegend), anti-Lag-3 (C9B7W; BioLegend), anti-Tim-3 (RMT3-23; BioLegend), anti-mouse VEGF-R2 (89B3A5; BioLegend), and anti-mouse VEGF-R1 (141522; R&D Systems). Isotype controls were used as a negative control. Dead cells were excluded using live/dead fixable aqua dead cell kit (Invitrogen, UK). Stained cells were analyzed with LSRII cytometer using FACS Diva Software (BD), and FlowJo Software (Tree Star). The co-expression of inhibitory molecules was analyzed using SPICE v5.3 software.

Confocal microscopy

Anti-CD3-stimulated CD8⁺ T cells were stained for confocal microscopy. In brief, cells were fixed in 2% paraformaldehyde on superfrost plus slides. Cells were washed 3 times in PBS-Triton X-100 0.1%, and then blocked with PBS containing BSA and glycine for 30 min before incubation with primary antibodies: anti-VEGFR2 (55B11; Cell Signaling Technology) or anti-CD8 (clone 53–6.7; eBioscience), or isotype control antibodies (rabbit IgG isotype control (Cell Signaling Technology) and rat IgG2a isotype control (eBioscience)). Cells were then washed with PBS Triton 0.1% and incubated with secondary antibodies: goat anti-rabbit Alexa Fluor 647 and goat anti-rat Alexa Fluor 488 (Life Technologies). After washing, cells were incubated with DAPI and mounted over Fluoromount G (Interchim). Confocal microscopy was performed using the SP8 Leica microscope using LAS AF software (Leica) and ImageJ software.

VEGF dosage

Tumors were mechanically dissociated with lysis buffer (T-PER Tissue Protein Extraction Reagent; Thermo Fisher Scientific) containing a protease inhibitor (Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free; Thermo Fisher Scientific). For each tumor model, the same quantity of tumors has been dissociated in the lysis buffer (100 mg of tumors in 2 ml of lysis buffer). Supernatant was obtained after centrifugation. VEGF-A concentration was evaluated by ELISA (mouse VEGF DuoSet; R&D Systems).

Isolation and culture of lymphocytes

CD8⁺ T lymphocytes were purified from splenocytes using a CD8⁺ isolation kit (Miltenyi Biotec). Purified CD8⁺ T lymphocytes were cultured in the presence of plate-bound anti-CD3 (10 µg/ml) with or without recombinant murine VEGF-A (50 ng/ml; Miltenyi Biotec). After 48 h of culture, cells were harvested and analyzed by cytometry or used to extract mRNA. In some experiments, anti-VEGF-R1 (20 µg/ml; R&D Systems) or anti-VEGF-R2 (10 µg/ml; clone 91202; R&D Systems) antibodies or isotype control were added to the culture medium. In some experiments, 11R-VIVIT (Merck Millipore) was added 1 h at 5 µM before the addition of VEGF-A and during the stimulation with VEGF-A.

RNA sample preparation and quantitative RT-PCR analyses

Total RNA from VEGF-A-treated or nontreated CD8⁺ T cells were purified using RNeasy kit (QIAGEN). Reverse transcription was performed with QuantiTect Reverse Transcription kit (QIAGEN). Quantitative real-time PCR was performed on a Step-One Plus (Applied Biosystems) using TaqMan Low Density array (Applied Biosystems). RNA18S was used to normalize gene expression.

Statistical analyses

Results are expressed as means ± SEM or ranges, as appropriate. The Mann-Whitney test was used to compare two groups. The Kruskal-Wallis test was

used to compare three or more groups. Comparison between tumor growth curves have been performed using a two-way ANOVA test, and multiple comparisons have been corrected with the Bonferroni coefficient. Statistical significance was determined with Prism software (GraphPad Software). Significance was assumed at $P < 0.05$.

This work was supported by Roche, Pfizer, Association pour la Recherche contre le Cancer, Ligue contre le Cancer, and Association des Gastroentérologues Oncologues. TV was supported by Association Benoit Malassagne, Société Française de Chirurgie Digestive, and Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (APHP - FERCM). M. Terme was supported by the Site de Recherche Intégré sur le Cancer-Programme Cancer Research for Personalized Medicine (CARPEM), the Association des Gastroentérologues Oncologues, and the Labex Immunooncology. S. Pernot and J. Taieb received a research grant from Roche. J. Taleb has an advisory role for Roche.

The authors declare no further conflicting financial interests.

Submitted: 24 March 2014

Accepted: 11 December 2014

REFERENCES

- Adotevi, O., H. Pere, P. Ravel, N. Haicheur, C. Badoual, N. Merillon, J. Medioni, S. Peyrard, S. Roncelin, V. Verkarre, et al. 2010. A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. *J. Immunother.* 33:991–998. <http://dx.doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181f4c208>
- Appay, V., C. Jandus, V. Voelter, S. Reynard, S.E. Coupland, D. Rimoldi, D. Lienard, P. Guillaume, A.M. Krieg, J.-C. Cerottini, et al. 2006. New generation vaccine induces effective melanoma-specific CD8⁺ T cells in the circulation but not in the tumor site. *J. Immunol.* 177:1670–1678. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.177.3.1670>
- Baitsch, L., P. Baumgaertner, E. Devèvre, S.K. Raghav, A. Legat, L. Barba, S. Wiekowski, H. Bouzourene, B. Deplancke, P. Romero, et al. 2011. Exhaustion of tumor-specific CD8⁺ T cells in metastases from melanoma patients. *J. Clin. Invest.* 121:2350–2360. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI46102>
- Blackburn, S.D., H. Shin, W.N. Haining, T. Zou, C.J. Workman, A. Polley, M.R. Betts, G.J. Freeman, D.A.A. Vignali, and E.J. Wherry. 2009. Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* 10:29–37. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1679>
- Cao, M., Y. Xu, J.J. Youn, R. Cabrera, X. Zhang, D. Gabrilovich, D.R. Nelson, and C. Liu. 2011. Kinase inhibitor Sorafenib modulates immunosuppressive cell populations in a murine liver cancer model. *Lab. Invest.* 91:598–608. <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2010.205>
- Dubreuil, P., S. Letard, M. Ciufolini, L. Gros, M. Humbert, N. Castéran, L. Borge, B. Hajem, A. Lernet, W. Sippl, et al. 2009. Masitinib (AB1010), a potent and selective tyrosine kinase inhibitor targeting KIT. *PLoS ONE.* 4:e7258. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007258>
- Duraiswamy, J., K.M. Kaluza, G.J. Freeman, and G. Coukos. 2013. Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Res.* 73:3591–3603. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4100>
- Finke, J.H., B. Rini, J. Ireland, P. Rayman, A. Richmond, A. Golshayan, L. Wood, P. Elson, J. Garcia, R. Dreicer, and R. Bukowski. 2008. Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* 14:6674–6682. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5212>
- Gabrilovich, D.I., H.L. Chen, K.R. Girgis, H.T. Cunningham, G.M. Meny, S. Nadaf, D. Kavanaugh, and D.P. Carbone. 1996. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* 2:1096–1103. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1096-1096>
- Gavalas, N.G., M. Tsiatas, O. Tsiatilonis, E. Politi, K. Ioannou, A.C. Ziogas, A. Rodolakis, G. Vlahos, N. Thomakos, D. Haidopoulos, et al. 2012. VEGF directly suppresses activation of T cells from ascites secondary to ovarian cancer via VEGF receptor type 2. *Br. J. Cancer.* 107:1869–1875. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2012.468>
- Gibson, H.M., C.J. Hedgcock, B.M. Aufiero, A.J. Wilson, M.S. Hafner, G.C. Tsokos, and H.K. Wong. 2007. Induction of the CTLA-4 gene in human lymphocytes is dependent on NFAT binding the proximal promoter. *J. Immunol.* 179:3831–3840. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3831>
- Hamid, O., C. Robert, A. Daud, F.S. Hodi, W.-J. Hwu, R. Kefford, J.D. Wolchok, P. Hersey, R.W. Joseph, J.S. Weber, et al. 2013. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N. Engl. J. Med.* 369:134–144. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1305133>
- Huang, Y., X. Chen, M.M. Dikov, S.V. Novitskiy, C.A. Mosse, L. Yang, and D.P. Carbone. 2007. Distinct roles of VEGFR-1 and VEGFR-2 in the aberrant hematopoiesis associated with elevated levels of VEGF. *Blood.* 110:624–631. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-01-065714>
- Ko, J.S., A.H. Zee, B.I. Rini, J.L. Ireland, P. Elson, P. Cohen, A. Golshayan, P.A. Rayman, L. Wood, J. Garcia, et al. 2009. Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* 15:2148–2157. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1332>
- Le Roy, C., P.-A. Deglesne, N. Chevallier, T. Beitar, V. Eclache, M. Quettier, M. Boubaya, R. Letestu, V. Lévy, F. Ajchenbaum-Cymbalista, and N. Varin-Blank. 2012. The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 120:356–365. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-12-397158>
- Liu, Z.-J., T. Shirakawa, Y. Li, A. Soma, M. Oka, G.P. Dotto, R.M. Fairman, O.C. Velazquez, and M. Herlyn. 2003. Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 23:14–25. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.23.1.14-25.2003>
- Oestreich, K.J., H. Yoon, R. Ahmed, and J.M. Boss. 2008. NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation. *J. Immunol.* 181:4832–4839. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.4832>
- Ozao-Choy, J., G. Ma, J. Kao, G.X. Wang, M. Meseck, M. Sung, M. Schwartz, C.M. Divino, P.-Y. Pan, and S.-H. Chen. 2009. The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res.* 69:2514–2522. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4709>
- Sakuishi, K., L. Apetoh, J.M. Sullivan, B.R. Blazar, V.K. Kuchroo, and A.C. Anderson. 2010. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* 207:2187–2194. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20100643>
- Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth. 2011. Cancer immunotherapy: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 331:1565–1570. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1203486>
- Schweighofer, B., J. Testori, C. Sturtzel, S. Sattler, H. Mayer, O. Wagner, M. Bilban, and E. Hofer. 2009. The VEGF-induced transcriptional response comprises gene clusters at the crossroad of angiogenesis and inflammation. *Thromb. Haemost.* 102:544–554.
- Stockmann, C., A. Doedens, A. Weidemann, N. Zhang, N. Takeda, J.I. Greenberg, D.A. Cheresch, and R.S. Johnson. 2008. Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature.* 456:814–818. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07445>
- Terme, M., S. Pernot, E. Marcheteau, F. Sandoval, N. Benhamouda, O. Colussi, O. Dubreuil, A.F. Carpentier, E. Tartour, and J. Taieb. 2013. VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Res.* 73:539–549. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2325>
- Topalian, S.L., F.S. Hodi, J.R. Brahmer, S.N. Gettinger, D.C. Smith, D.F. McDermott, J.D. Powderly, R.D. Carvajal, J.A. Sosman, M.B. Atkins, et al. 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* 366:2443–2454. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>
- Wherry, E.J. 2011. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12:492–499. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2035>

- Wherry, E.J., S.-J. Ha, S.M. Kaech, W.N. Haining, S. Sarkar, V. Kalia, S. Subramaniam, J.N. Blattman, D.L. Barber, and R. Ahmed. 2007. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*. 27:670–684. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.006>
- Whiteside, T.L., and G. Parmiani. 1994. Tumor-infiltrating lymphocytes: their phenotype, functions and clinical use. *Cancer Immunol. Immunother.* 39:15–21. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01517175>
- Woo, S.-R., M.E. Turnis, M.V. Goldberg, J. Bankoti, M. Selby, C.J. Nirschl, M.L. Bettini, D.M. Gravano, P. Vogel, C.L. Liu, et al. 2012. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res.* 72:917–927. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1620>
- Yamazaki, T., H. Akiba, A. Koyanagi, M. Azuma, H. Yagita, and K. Okumura. 2005. Blockade of B7-H1 on macrophages suppresses CD4+ T cell proliferation by augmenting IFN-gamma-induced nitric oxide production. *J. Immunol.* 175:1586–1592. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1586>
- Ziogas, A.C., N.G. Gavalas, M. Tsiatas, O. Tsitsilonis, E. Politi, E. Terpos, A. Rodolakis, G. Vlahos, N. Thomakos, D. Haidopoulos, et al. 2012. VEGF directly suppresses activation of T cells from ovarian cancer patients and healthy individuals via VEGF receptor Type 2. *Int. J. Cancer.* 130:857–864. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.26094>

Annexe 2 : Palle et al. JFHOD 2018

P.297 - Rôle de l'Hepatocyte Growth Factor sur la modulation des lymphocytes T régulateurs chez les patients atteints d'adénocarcinome gastrique

J. Palle, A. Lapeyre-Prost, S. Pernot, T. Voron, E. Tartour, J. Taïeb, M. Terme

Introduction

La compréhension des mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire représente un enjeu majeur de la recherche actuelle en cancérologie. Il a notamment été montré que les tumeurs étaient capables d'induire la différenciation et la prolifération de lymphocytes T régulateurs (LTregs), cellules immunosuppressives capables d'inhiber les cellules immunitaires effectrices telles que les lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Nécessaires pour lutter contre l'auto-immunité, l'induction des LTregs est en partie dépendante d'un sous type de cellules dendritiques (CD), caractérisées par un phénotype immature dit « tolérogène ». Notre équipe s'est intéressée aux mécanismes qui sous-tendent l'induction de LTregs en situation tumorale.

L'Hepatocyte Growth Factor (HGF) et son récepteur c-met, exprimé à la surface des cellules épithéliales, sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération et la survie. Cette voie de signalisation est hyperactivée dans plusieurs cancers dont les adénocarcinomes (ADK) gastriques. Il a par ailleurs été montré *in vitro* à partir de prélèvements réalisés chez le volontaire sain que l'HGF pouvait avoir un rôle immunomodulateur en induisant des CD immatures capable de stimuler la différenciation de lymphocytes T conventionnels (LTconv) en LTregs. Cependant ceci n'a jamais été évalué en situation tumorale. Le but de ce travail était donc d'étudier le rôle de l'HGF dans la résistance tumorale au système immunitaire chez des patients atteints d'ADK gastrique et plus particulièrement son rôle dans l'induction de LTregs.

Matériels et méthodes

Nous avons constitué une cohorte prospective de 29 patients atteints d'ADK gastrique ou de la jonction oeso-gastrique (JOG), métastatiques ou localisés, suivis dans le service d'oncologie digestive de l'Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP). Nous avons exclu les patients aux antécédents de pathologies auto-immunes ou qui avaient reçu un traitement par thérapie ciblée ou immunothérapie, qui pourraient avoir un impact sur le système immunitaire. Nous avons tout d'abord recherché l'expression de c-met à la surface des cellules mononuclées sanguines

par cytométrie en flux. Par séparation magnétique, nous avons trié les monocytes, cellules précurseur des CD, puis nous les avons mis en culture en présence de GM-CSF et d'IL-4 (condition standard) avec ou sans HGF. Par immunomarquage, nous avons comparé la différenciation et la maturation des cellules obtenues selon les différentes conditions de culture, ainsi que leur production cytokinique par ELISA.

Résultats

Nous avons observé que ni les LTconv ni les LTregs n'exprimaient le récepteur c-met à leur surface (respectivement 0,36 +/- 0,13% et 0,55 +/- 0,2%), ce qui pourrait indiquer que l'HGF n'exerce pas de rôle direct sur les LTreg. En revanche le taux d'expression de c-met à la surface des monocytes des patients de notre cohorte était de 15,95% ± 2,97. L'expression de c-Met était statistiquement supérieure chez les patients ayant une masse tumorale (tumeur localisée et/ou métastatique) par rapport aux patients n'ayant plus de masse tumorale (tumeur localisée opérée) (20,30% ± 3,61 vs 3,06% ± 1,39, p=0,011). Il n'y avait pas de différence d'expression de c-Met selon le type histologique (intestinal ou diffus) ni la localisation tumorale (corps gastrique ou JOG). La culture des monocytes en présence d'HGF induisait leur différenciation en CD exprimant le CD11c et l'HLA-DR ayant un phénotype immature tolérogène avec une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation CD80, CD83 et CD86 et une augmentation de la production d'interleukine 10, cytokine aux propriétés anti-inflammatoires, par rapport aux CD issues de la culture de monocytes sans HGF.

Discussion

Conclusion

Dans ce travail, nous avons montré que, à l'inverse des LTconv et des LTregs, les monocytes des patients atteints d'ADK gastrique expriment le récepteur c-Met. In vitro, en présence d'HGF, ces monocytes peuvent se différencier en CD au phénotype immature et aux propriétés tolérogènes susceptibles d'augmenter la prolifération et/ou la différenciation des LTregs. L'HGF pourrait donc être impliqué dans l'échappement tumoral au système immunitaire.

Remerciements

Soutien financier : Cancéropôle Ile de France et INCa (2017-1-EMERG-74-INSERM 5-1)

Annexe 3 : Hirsch et al. ESMO 2018

L. Hirsch¹, J. Palle¹, A. Lapeyre-Prost¹, S. Pernot¹, T. Voron¹, E. Tartour¹, J. Taieb², M.

Terme¹

Author Affiliations

1 Inserm U970, Paris Cardiovascular Research Center, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75015 - Paris/FR

2 Department Of Gastroenterology And Digestive Oncology, Hopital European George Pompidou, 75015 - Paris/FR

Abstract

Background

Understanding the mechanisms involved in tumor-induced immunosuppression is currently of major interest. Among these immunosuppressive pathways, induction of regulatory T cells (Treg) can inhibit the development of an efficient anti-tumor immune response. Deregulated hepatocyte growth factor (HGF)/c-Met signalling is heavily involved in aggressive cellular invasiveness of human gastric carcinoma. The HGF/c-Met pathway can promote the development of Treg via dendritic cells (DC), but this role has never been reported in human malignancies. We studied the immunomodulatory effects of HGF in gastric carcinoma patients.

Methods

The expression of the HGF receptor c-Met was analysed on peripheral blood mononuclear cells using flow cytometry in gastric cancer patients. After that peripheral blood monocytes from these patients were isolated and cultured with GM-CSF and IL-4 (standard condition to induce DC) with or without HGF for 6 days. Then, cells were matured by LPS for 24h. IL-10 production and phenotype were assessed.

Results

No expression of c-Met could be detected in conventional T lymphocytes and Treg (0.36+/- 0.13 and 0.55+/-0.20 % respectively) confirming that HGF could not directly act on T cells. But monocytes expressed c-Met (15.95+/-2.97%). This expression was higher in patients with a tumor burden (localized or metastatic), than patients with no tumor burden (20.30 +/- 3.61 vs 3.06 +/- 1.39; p=0.011). There was no difference of c-Met expression according to the histology and the tumor location. Treatment of monocytes with HGF in the presence of GM-CSF and IL-4 induced the development of cells expressing the DC markers CD11c and HLA-DR, decreased the expression of CD80, CD83 and CD86 co-stimulatory molecules and

inhibited their maturation induced by LPS. Furthermore, HGF stimulation increased the secretion of the protolerogenic cytokine IL-10.

Conclusions

Monocytes differentiated in the presence of HGF adopt a protolerogenic phenotype and might induce the development of Treg. Thus, HGF could be a novel immune escape mechanism in cancer and could be targeted not only for its direct anti-tumor effect but also for its immunomodulatory properties.

Legal entity responsible for the study

INSERM.

Funding

Cancéropôle Ile-De-France & INCa (2017-1-EMERG-74-INSERM 5-1).

Annexe 4 : Pernot et al. Eur J Cancer 2017



Original Research

Dynamic evaluation of circulating tumour cells in patients with advanced gastric and oesogastric junction adenocarcinoma: Prognostic value and early assessment of therapeutic effects



Simon Pernot ^{a,b,1}, Cecile Badoual ^{a,c,1}, Magali Terme ^a, Florence Castan ^d, Aurelie Cazes ^c, Olivier Bouche ^e, Jaafar Bennouna ^f, Eric Francois ^g, Francois Ghiringhelli ^h, Christelle De La Fouchardiere ⁱ, Emmanuelle Samalin ^j, Jean Baptiste Bachet ^k, Christophe Borg ^l, Michel Ducreux ^m, Elie Marcheteau ^a, Trevor Stanbury ⁿ, Sophie Gourgou ^d, David Malka ^m, Julien Taieb ^{a,b,*}

^a INSERM U970 – PARCC (Paris Cardiovascular Research Center), Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^b Hôpital Européen Georges-Pompidou, APHP, Department of GI Oncology, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^c Hôpital Européen Georges-Pompidou, APHP, Department of Pathology, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^d Biostatistics Unit, CTD INCa, ICM-Montpellier Cancer Institute, Montpellier, France

^e CHU Robert Debré, Reims, France

^f Institut de Cancérologie de l'Ouest – Site René Gauducheau, Saint Herblain, France

^g Centre Antoine-Lacassagne, Nice, France

^h Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France

ⁱ Centre Léon Bérard, Lyon, France

^j CRIC Val d'Aurelle, Montpellier, France

^k Hôpital de la Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France

^l Medical Oncology Unit, CHU Minjoz, Besancon, France

^m Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Département de Médecine Oncologique, Villejuif, F-94805, France

ⁿ UNICANCER, Paris, France

Received 22 February 2017; received in revised form 22 March 2017; accepted 28 March 2017

Available online 26 April 2017

* Corresponding author: HEGP, 20 rue Leblanc, 75015 Paris, France.

E-mail address: jtaieb75@gmail.com (J. Taieb).

¹ S. Pernot and C. Badoual contributed equally to this work.

KEYWORDS

Circulating tumour cells;
Stomach neoplasms;
Prognosis;
Biomarkers;
Clinical trial

Abstract Background: The identification of dynamic biomarkers in advanced gastric and oesogastric junction adenocarcinoma (GOA) could help to tailor strategies for each patient. Enumeration of circulating tumour cells (CTCs) is approved by the US Food and Drug Administration in breast, colon and prostate cancer but is not in advanced GOA. Our study aims to establish the optimal threshold and the clinical significance of CTC count in advanced GOA before and during treatment.

Methods: One hundred six patients with untreated advanced GOA were included in the ancillary study of the PRODIGE 17-ACCORD 20 trial. CTCs were detected in the peripheral blood using the CellSearch system on day 0 (D0) and day 28 (D28). The prognostic value of CTCs at D0 and D28 was analysed by testing several thresholds.

Results: At baseline, median CTC count was 1 (range, 0–415). While CTCs ≥ 1 , 2 or 3 at D0 were all significantly associated with worse overall survival (OS) and progression-free survival (PFS), CTCs ≥ 2 were the optimal threshold, on D0 or D28. CTCs ≥ 2 at D28 were also predictive of disease control. Taking into account both D0 and D28 CTC count defined 3 groups (low/low, high/low and low-high/high) with significantly different PFS ($p = 0.0002$) and OS ($p = 0.003$).

Conclusion: Quantification of CTCs at baseline and during treatment may be a useful prognostic tool in advanced GOA, as it is associated with worse PFS and OS. A threshold ≥ 2 CTCs seems to have the best discriminant value. Change in CTC count between baseline and D28 could help to tailor treatment to each individual patient.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key message

Circulating tumor cells (CTC) count at baseline and day 28 is a strong prognostic factor in patients with advanced gastric and esogastric junction adenocarcinoma. CTC count at day 28 is also predictive of disease control. Therefore, evolution of CTC count between baseline and D28 could help to early adjust treatment.

1. Introduction

Gastric and oesogastric junction adenocarcinoma (GOA) is a major health problem, with 951,000 new cases worldwide in 2012 [1]. The few prognostic factors previously reported relate mostly to the host, as Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (PS), age and sex. Other prognostic factors related to the tumour are still debated, such as the impact of the pathological type and the location of the tumour [2]. The identification of biomarkers before and during the treatment would be of great value, since they could help to tailor treatment regimens and strategies better for each individual patient situation. It could be interesting to assess therapeutic efficacy early, in order to switch to a second-line therapy as soon as possible in patients with disease resistant to first-line treatment. Indeed, a large proportion of patients do not receive more than one line of treatment because of their poor general condition and

rapid tumour progression, despite new second-line therapy such as antiangiogenics [3,4], irinotecan [5] and taxanes [6,7] have demonstrated a survival advantage. On the other hand, some patients may benefit from aggressive approaches such as intraperitoneal treatments or even surgical removal of oligometastatic disease, but we are currently unable to identify them correctly.

Circulating tumour cells (CTCs) could reflect tumour burden and has been proposed as a prognostic factor and a follow-up tool in several cancer types [8–10]. The CellSearch system uses an immunomagnetic method to detect low numbers of cells with high sensitivity and specificity. The Food and Drug Administration (FDA) has approved this technique in metastatic breast, prostate and colorectal cancer patients as an aid to prognosis before and during the treatment [8–10]. The prognostic relevance of CTC detection in gastric cancer patients remains controversial, and there is no consensus regarding the optimal threshold.

To investigate the clinical significance of CTCs in advanced GOA, we performed an evaluation of CTCs in patients with newly diagnosed advanced GOA and treated with chemotherapy based on 5FU plus platinum in the randomised MEGA (Met or EGFR inhibition in Gastroesophageal Adenocarcinoma)/PRODIGE 17 therapeutic trial. The objectives of this translational study were to assess the prognostic value of CTCs at baseline (day 0 [D0]) and day 28 (D28), the optimal threshold and the value of CTC count evolution in assessing the therapeutic effect.

2. Patients and methods

2.1. Patients

Patients with advanced GOA enrolled in the multicentre PRODIGE 17 trial were all offered the chance to participate in this ancillary study. Inclusion criteria and treatment were previously described in the clinical trial report [11]. Briefly, the main inclusion criteria were age >18 years, histologically proven advanced GOA, locally advanced or metastatic disease with at least one measurable lesion according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumours (RECIST) version 1.1 criteria, and no prior treatment for advanced disease. Exclusion criteria included known positive tumour Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) status (immunohistochemistry [IHC]3+ or IHC2+/Fluorescence in situ hybridization (FISH) or chromogenic in situ hybridization (CISH) + organ dysfunction and ECOG PS >1. One hundred sixty-two patients were randomised 1:1:1 to receive Folinic Acid, Fluorouracil and Oxaliplatin (FOLFOX) alone or combined with either panitumumab (monoclonal antibody targeting epidermal growth factor receptor) or rilotumumab (AMG 102, monoclonal antibody targeting c-Met) until disease progression, discontinuation due to toxicity, withdrawal of consent or loss to follow-up. Patients were assessed with computed tomography (CT) scan every 8 weeks according to the RECIST v1.1 criteria. Assessment of CTCs was planned in the initial design of the trial and was part of the full study protocol, which was registered with the US and French National Institutes of Health (NCT01443065, EudraCT no. 2009-012797-12). The full study protocol was approved by the national ethics committee. The results from the therapeutic trial were previously reported [11].

2.2. Methods

Peripheral blood samples of 7.5 ml were collected in CellSave Preservative Tubes (Veridex LLC, Raritan, NJ) just before the administration of the first chemotherapy cycle (D0) and after 4 weeks (D28, just before the third chemotherapy cycle). Samples were set at room temperature in a single platform and processed within 72 h as previously described with the CellSearch system [8–10,12,13]. With this system, CTCs are defined as cytokeratins 8, 18, 19 positive, Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) positive and CD45 negative and are highlighted by DNA staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The operational details and performance data have been described previously [12].

2.3. Statistical evaluation

Receiver operator characteristic (ROC) curve analyses for CTC were performed to identify patients who

experienced progression in 12 months. The accuracy, sensitivity and specificity for CTC were evaluated using the optimal threshold value calculated to maximise Youden's index [14].

The CTC count was compared between baseline characteristics using the Kruskal–Wallis statistical test and at D0 and D28 using the Wilcoxon signed-rank test.

Overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) were estimated by the Kaplan–Meier method. Univariate and multivariate analysis were performed using the Cox proportional hazard model to estimate the hazard ratio (HR) and the 95% confidence interval (CI). Comparisons were performed using the log-rank test. Median follow-up was estimated with the inverse Kaplan–Meier method. For objective response and disease control, the prognostic effect of CTCs was estimated using logistic regression. Objective response, stable disease and disease progression were evaluated according to the RECIST v1.1 (ref) criteria on the CT scan morphological evaluation. Disease control rate (DCR) was defined as the sum of patients having a complete response, a partial response or a stable disease [15].

A p-value less than 0.05 was regarded as significant. All statistical tests were two sided.

The statistical analysis was generated using Stata, version 13 (Texas, USA).

3. Results

3.1. Patient characteristics

Among the 162 patients enrolled in the trial, blood was collected at baseline from 132 of the 162 patients enrolled in the PRODIGE 17 trial and CTC count was done successfully for 106 of them (80%) at day 1 (D1) and for 65 of them at D28 (Supplemental Fig. S1).

The clinicopathological characteristics of the patients are shown in Table 1. None of them correlated with median baseline CTC count except the number of metastatic sites (1 or >1; $p < 0.001$). The median follow-up was 24.9 months, and the median PFS and OS were 5.9 months (95% CI 5.2–7.7) and 12.6 months (95% CI 9–16.6), respectively.

3.2. Distribution of CTC counts at baseline and at D28

At baseline, 66 patients had ≥ 1 CTC detected per 7.5 ml (62%), 49 patients had ≥ 2 CTCs (46%) and 39 patients had ≥ 3 CTCs (38%; Supplemental Fig. S2). The median number of CTCs detected at baseline was 1 (range, 0–415). At D28, the median of CTCs were 0 (range, 0–205). At this time point, ≥ 1 , ≥ 2 or ≥ 3 CTCs were detected in 31%, 18% and 15% of patients, respectively. The number of CTCs decreased significantly from D1 to D28 regardless of the treatment arm ($p < 0.001$).

Table 1
Baseline patient characteristics and CTC count. Correlation between characteristics and CTC count was tested. The CTC count was associated only with the number of metastatic sites.

	N = 106 (%)	Median CTC count at D0 (range)	Association with CTC count (p)
Sex			
Male	70 (66)	1 (0–415)	0.67
Female	36 (34)	1 (0–65)	
ECOG PS			
0	37 (35)	1 (0–415)	0.86
1	68 (65)	1 (0–155)	
Primary			
Oesophagus	21 (20)	1 (0–34)	0.42
Cardia	31 (29)	2 (0–415)	
Stomach	54 (51)	1 (0–73)	
Lauren type			
Diffuse	21 (20)	2 (0–73)	0.83
Intestinal	72 (68)	1 (0–415)	
Mixed	13 (12)	1 (0–26)	
Disease stage			
Locally advanced	3 (3)	1 (0–2)	0.001
1 metastatic site	48 (45)	0 (0–415)	
>1 metastatic site	55 (52)	3 (0–155)	
Arm			
A, mFolfox6	35 (33)	1 (0–99)	0.94
B, mFolfox6 + panitumumab	33 (31)	1 (0–50)	
C, mFolfox6 + rilotumumab	38 (36)	1 (0–415)	

CTC = circulating tumour cell; D0 = day 0; ECOG PS = Eastern Cooperative Oncology Group performance status.

3.3. Determination of an optimal threshold to assess prognosis

Three different cut-offs (≥ 1 , ≥ 2 or ≥ 3 CTCs per 7.5 ml of blood) were tested. The CTC count was significantly associated with a worse prognosis using these three thresholds for both OS and PFS at D0 or at D28 (Table 2).

The threshold of ≥ 2 CTCs at D0 discriminated the most balanced group (54% and 46% of patients).

Table 2
Prognostic value of CTC count, according to thresholds.

CTC	N (%)	Progression-free survival			Overall survival		
		Median (months)	HR (95% CI)	p	Median (months)	HR (95% CI)	p
D0 (n = 106)							
CTC 0	40 (38%)	7.8	1	0.02	17.1	1	0.02
CTC ≥ 1	66 (62%)	5.9	1.67 (1.06–2.61)		11.5	1.80 (1.09–2.95)	
CTC 0–1	57 (54%)	7.6	1	0.03	16.9	1	0.01
CTC ≥ 2	49 (46%)	5.6	1.59 (1.04–2.43)		11.1	1.85 (1.17–2.92)	
CTC 0–2	67 (63%)	7.6	1	0.02	16.9	1	0.01
CTC ≥ 3	39 (37%)	5.3	1.72 (1.11–2.67)		11.0	1.84 (1.16–2.91)	
D28 (n = 65)							
CTC 0	45 (69%)	8.3	1	0.03	17.4	1	0.51
CTC ≥ 1	20 (31%)	5.1	1.90 (1.08–3.36)		11.1	1.24 (0.66–2.35)	
CTC 0–1	53 (82%)	8.3	1	0.0001	17.9	1	0.004
CTC ≥ 2	12 (18%)	2.9	4.79 (2.38–9.67)		5.4	3.13 (1.55–6.33)	
CTC 0–2	55 (85%)	8.3	1	0.001	17.4	1	0.03
CTC ≥ 3	10 (15%)	3.5	3.92 (1.88–8.17)		7.2	2.49 (1.18–5.26)	

CTC = circulating tumour cell; CI = confidence interval; D0 = day 0; D28 = day 28; HR = hazard ratio.

Furthermore, this cut-off was the most significant, with the highest HR and lowest p-value for most of the tested parameters (OS and PFS, D0 or D28), except for PFS at D0, where ≥ 3 CTCs were more significant. We confirmed that this threshold was also the most significant cut-off using the ROC curves, with a Youden index of 0.38. The area under the ROC curve was of 0.7096 (95% CI 0.60–0.82; Supplemental Fig. S3), with a sensitivity of 0.69 and a specificity of 0.68. Therefore, the threshold of ≥ 2 CTCs was chosen for further analyses.

3.4. CTC count and survival

OS and PFS for patients with < 2 CTCs were significantly higher than for patients with ≥ 2 CTCs at baseline or after two cycles of chemotherapy (D28; Fig. 1 and Table 2). Multivariate analysis was performed with adjustment for primary tumour location, pathological type, age, ECOG PS and number of metastases (Supplemental Tables S1 and S2). The multivariate analyses showed that the level of CTCs was the only independent factor for OS or PFS at D0 and for PFS at D28 (a trend was noted for OS [p = 0.07]).

3.5. CTC count and tumour response

At baseline, CTC count was not associated with the objective best response (p = 0.76). In patients with < 2 CTCs at baseline, objective response rate (ORR) was 52% in patients with < 2 CTCs compared to 59% in patients with ≥ 2 CTCs (p = 0.47). DCR was 85% compared to 86% (p = 0.87). However, CTCs at D28 seemed to be better correlated with DCR, ORR was 63% in patients with CTC count < 2 compared to 50% with ≥ 2 CTCs (p = 0.51) and DCR was 96% versus 67% (odds ratio = 12.5, 95% CI 1.96–79.83, p = 0.006).

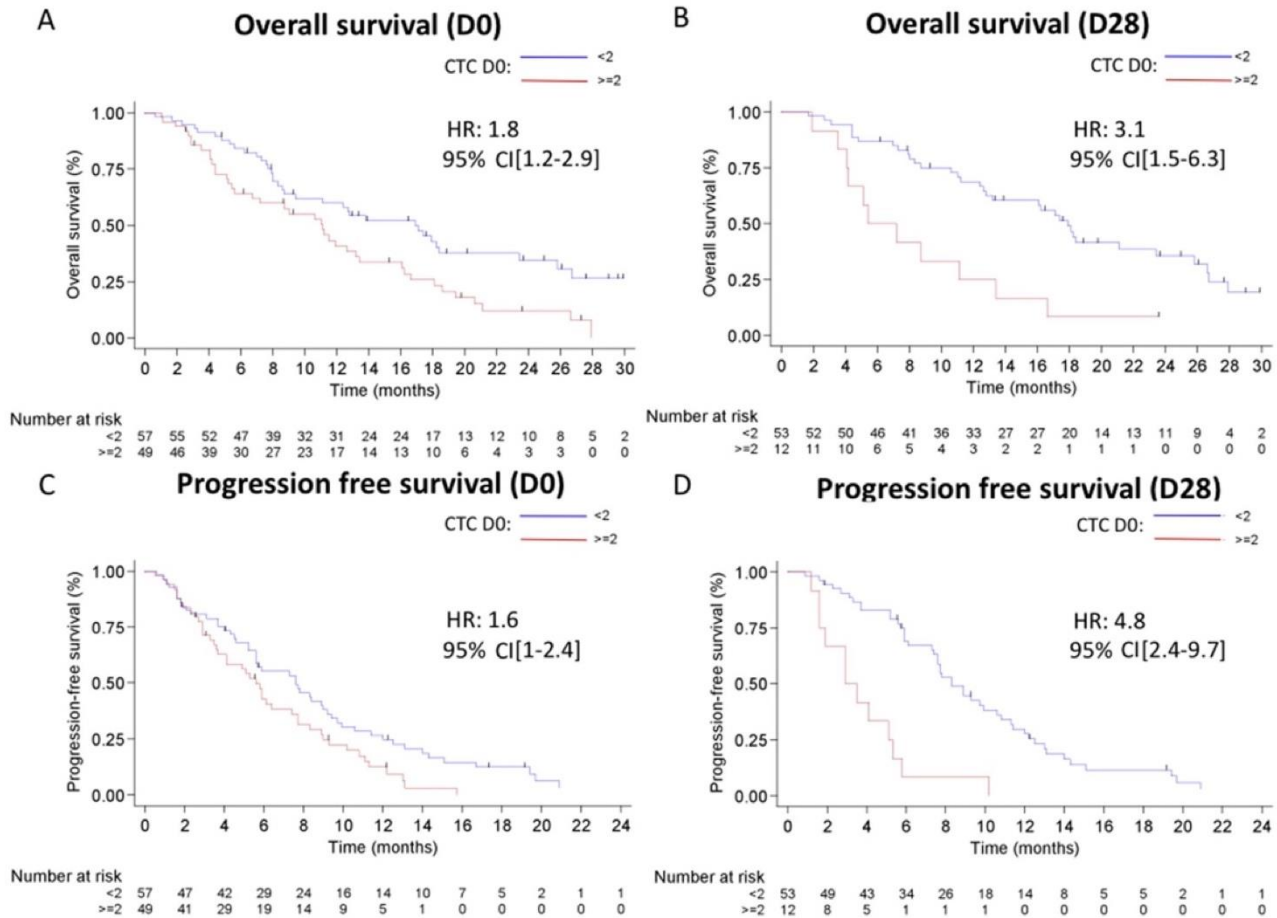


Fig. 1. Kaplan–Meier survival curves according to the CTC count. (A) Overall survival at D0; (B) Overall survival at D28; (C) Progression-free survival at D0 and (D) Progression-free survival at D28.

3.6. Dynamic evaluation of CTCs

We analysed CTC counts at D0 and D28 jointly to distinguish four groups: (1) patients with <2 CTCs at baseline and <2 CTCs at D28 (‘low/low’; n = 36); (2) patients with ≥2 CTCs at baseline and <2 CTCs after two cycles of chemotherapy (‘high/low’; n = 17); (3) patients with <2 CTCs at baseline and ≥2 CTCs at D28 (‘low/high’; n = 1) and (4) patients with ≥2 CTCs at D0 and D28 (‘high/high’; n = 11). As only one patient was in this low/high category, he was grouped with the latter category (low-high/high).

Survival was significantly different between these three groups. Median PFS for patients with low/low, high/low and low-high/high CTCs were, respectively, 8.9 months, 8.3 months and 2.9 months (p = 0.0002; Fig. 2A). The median OS for these three groups was, respectively, 18.4 months, 13.2 months and 5.4 months (p = 0.003; Fig. 2B). OS was higher in patients with low/low CTCs than in those with high/low CTCs (HR 0.5 [0.26–1]) but at the limit of significance due to the low number of patients.

4. Discussion

Our study shows that the CTC count before treatment is a strong prognostic factor in advanced GOA because, whatever the threshold, a high CTC count was associated with worse PFS and OS. After two cycles of chemotherapy, CTCs remained prognostic for both PFS and OS. The threshold ≥2 CTCs was the most discriminant. Moreover, CTCs at D28, but not at baseline, was also associated with DCR according to the RECIST v1.1 criteria.

These results suggest that CTC count may be a valuable prognostic biomarker in advanced GOA and may help to assess treatment efficacy early.

As far as we know, ours is the largest study showing the prognostic value of CTCs in advanced GOA, in terms of both OS and PFS, and to establish a cut-off in a large homogeneous population selected from a prospective randomised clinical trial, strictly monitored.

The first goal of our study was to determine the optimal threshold. The approved cut-off is ≥5 in metastatic breast [10] and prostate [9] cancer and ≥3 in

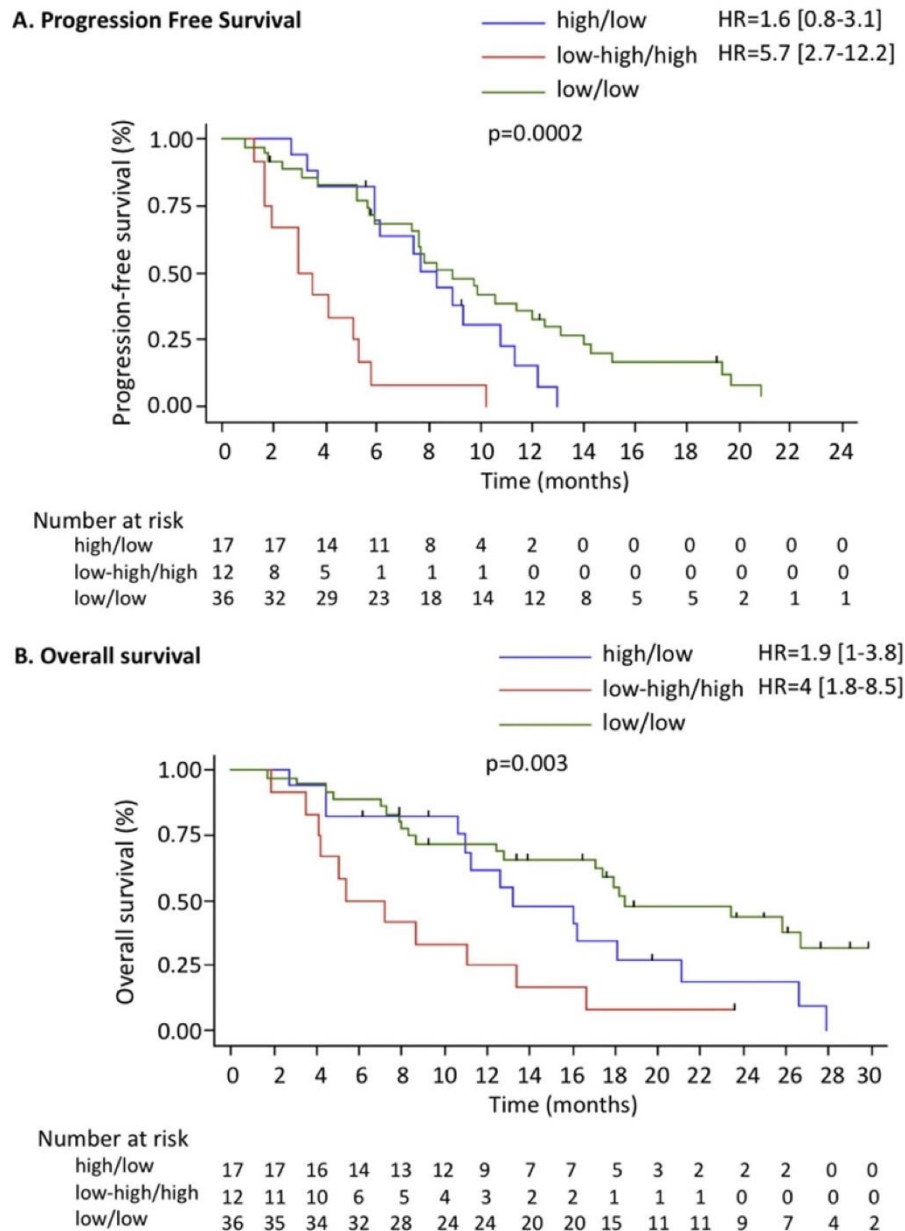


Fig. 2. (A) Progression-free survival and (B) Overall survival according to the changes of CTC, in high/low (CTC ≥ 2 at D0/ < 2 at D28), low-high/high (CTC ≥ 2 at D28) or low/low (CTC < 2 at D1/ < 2 at D28) patients.

metastatic colorectal cancer [8]. Analyses of CTCs using the FDA-approved CellSearch system have been previously reported in advanced GOA in only three Asian studies, with small populations. In these studies, the cut-off varied from one to five CTCs, due to heterogeneity in patients and in methods used to choose the cut-off. Matsusaka *et al.* [16] enrolled 52 patients and chose the cut-off of ≥ 4 CTCs because the median PFS was highest above this level, but this study mixed untreated and previously treated patients. Okabe *et al.* [17] chose arbitrarily a cut-off of ≥ 1 CTC, and 82% of them had no CTCs at baseline because their study mixed metastatic and operable patients. Only one study used ROC

curves to assess the robustness of each threshold studied and determined a threshold of ≥ 3 CTCs [18]. However, in this study, CTC count at baseline failed to predict PFS, probably due to the heterogeneity of patients, including HER2 status, and of treatments received. Finally, most of these previous studies were performed in Asian countries. Results from Asian patients should not be extrapolated to patients in Western countries as there are significant differences between these two populations in epidemiology, aetiology, prognosis and treatment efficacy [19]. As far as we know, only one study has used the CellSearch system to assess CTC count in Western patients with advanced GOA [20].

This study failed to show any significant prognostic value of CTCs due to the low number of patients ($n = 18$).

Dynamic evaluation of CTC count during the course of treatment could help clinicians change the line of treatment appropriately before standard morphological evaluation of target lesions by CT scan. We found that the CTC count at D28 and the discrimination of several groups according to changes in CTC count provide interesting information. Other clinical studies have demonstrated the predictive accuracy of serial CTC monitoring in determining prognosis at any time during the course of the disease in breast, prostate and colorectal cancer [8,9,13]. CTC count is more discriminant at D28 than at baseline, because it takes into account the potential therapeutic effect of administered anti-cancer therapies, reflected in our study by the significant correlation between disease control and CTC count at D28. It has been hypothesised that CTCs, along with prognosis, shift over time, and this can inform future decisions. We can hypothesise that these dynamic information could help to decide therapeutic de-escalation or multimodal therapy (surgery of metastases and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy) in ‘low/low’ patients, or conversely intensification rather than de-escalation in ‘high/low’ patients as OS was still significantly lower for patients in this group than for patients in the ‘low/low’ group. Finally, patients in the ‘high/high’ group seemed to have no treatment benefit and may have benefitted from an early change of treatment without waiting for morphological progression. However, these assumptions should be confirmed in randomised trials.

In our study, 26 blood samples at D0, and additional 41 blood samples at D28 were not analysed. This was mostly related to the delay of transport due to centralisation of blood preparation and analysis in a single centre, while blood samples need to be transported up to 72 h. This could represent a bias in our study.

In conclusion, our results show in a large homogeneous population that a CTC count ≥ 2 was closely associated with a poor outcome and could predict a worse PFS and OS when assessed at both baseline and D28. Interestingly, the combination of the two time points could help to discriminate between prognoses and to assess the therapeutic effect. In this regard, our results could help to improve management of the treatment of advanced GOA patients, according to changes in CTC count. Further studies are now needed to evaluate the practical impact of CTC count on treatment strategy optimisation.

Funding

This work was supported by Amgen, Veridex and Johnson & Johnson.

Conflict of interest statement

Dr. Pernot reports grants from Amgen, non-financial support from Veridex, non-financial support from Johnson & Johnson, during the conduct of the study; personal fees and non-financial support from Amgen, non-financial support from Merck, personal fees and non-financial support from Sanofi, personal fees from BTG, outside the submitted work; Dr. Ducreux reports personal fees from Amgen, grants and personal fees from Merck, personal fees from Sanofi, grants and personal fees from Roche, personal fees from Novartis, personal fees from Bayer, personal fees from Sirtex, personal fees from Lilly, personal fees from Servier, personal fees from Terumo, grants from Pfizer, outside the submitted work; Dr. de la Fouchardiere reports personal fees and non-financial support from Lilly, outside the submitted work; Dr. Bennouna reports personal fees from Boehringer Ingelheim, personal fees from Roche, personal fees from Astrazeneca, personal fees from MSD, personal fees from BMS, outside the submitted work; Dr. Ghiringhelli reports personal fees from Amgen, outside the submitted work; Dr. Bouche reports personal fees from Roche, personal fees from Merck, personal fees from Novartis, personal fees from Lilly, personal fees from Boehringer, outside the submitted work; Dr. Terme reports personal fees from Roche, outside the submitted work; Dr. Bachet reports personal fees from Amgen, personal fees from Merck, personal fees from Roche, personal fees from Sanofi, personal fees from Bayer, personal fees from Cellgene, personal fees from Lilly, outside the submitted work; Dr. Borg reports personal fees from Roche, personal fees from Bayer, personal fees from Lilly, outside the submitted work; Dr. Taieb reports personal fees and non-financial support from Amgen, personal fees and non-financial support from Merck, personal fees and non-financial support from Roche, personal fees from Sanofi, personal fees from Lilly, personal fees from BTG, personal fees from Sirtex, outside the submitted work. All remaining authors have declared no conflicts of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2017.03.036>.

References

- [1] Yang D, Hendifar A, Lenz C, Togawa K, Lenz F, Lurje G, et al. Survival of metastatic gastric cancer: significance of age, sex and race/ethnicity. *J Gastrointest Oncol* 2011;2:77–84. <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2010.025>.
- [2] Pernot S, Voron T, Perkins G, Lagorce-Pages C, Berger A, Taieb J. Signet-ring cell carcinoma of the stomach: impact on prognosis and specific therapeutic challenge. *World J Gastroenterol* 2015;21:11428–38. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i40.11428>.
- [3] Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, Dumitru F, Passalacqua R, Goswami C, et al. Ramucirumab monotherapy for previously

- treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl* 2014; 383:31–9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61719-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61719-5).
- [4] Wilke H, Muro K, Van Cutsem E, Oh S-C, Bodoky G, Shimada Y, et al. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15: 1224–35. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70420-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70420-6).
- [5] Guimbaud R, Louvet C, Ries P, Ychou M, Maillard E, André T, et al. Prospective, randomized, multicenter, phase III study of fluorouracil, leucovorin, and irinotecan versus epirubicin, cisplatin, and capecitabine in advanced gastric adenocarcinoma: a French intergroup (Fédération Francophone de Cancérologie Digestive, Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer, and Groupe Coopérateur Multidisciplinaire en Oncologie) study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2014;32:3520–6. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2013.54.1011>.
- [6] Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C, et al. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2006;24:4991–7. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2006.06.8429>.
- [7] Van Cutsem E, Boni C, Tabernero J, Massuti B, Middleton G, Dane F, et al. Docetaxel plus oxaliplatin with or without fluorouracil or capecitabine in metastatic or locally recurrent gastric cancer: a randomized phase II study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO* 2015;26:149–56. <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdl496>.
- [8] Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Savidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2008;26:3213–21. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2007.15.8923>.
- [9] de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2008;14:6302–9. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0872>.
- [10] Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2006;12:4218–24. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2821>.
- [11] Malka D, Castan F, Francois E, Bouche O, Bennouna J, Ghiringhelli F, et al. FOLFOX alone or combined to rilotumumab or panitumumab as first-line treatment in patients (pts) with advanced gastroesophageal adenocarcinoma (AGEA): an open-label, randomized phase II trial (PRODIGE 17 ACCORD 20 MEGA). *J Clin Oncol* 2015;33.
- [12] Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2004;10:6897–904. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0378>.
- [13] Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2005;23:1420–30. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2005.08.140>.
- [14] Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950;3: 32–5.
- [15] Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European organization for research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:205–16.
- [16] Matsusaka S, Chin K, Ogura M, Suenaga M, Shinozaki E, Mishima Y, et al. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *Cancer Sci* 2010;101:1067–71. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01492.x>.
- [17] Okabe H, Tsunoda S, Hosogi H, Hisamori S, Tanaka E, Tanaka S, et al. Circulating tumor cells as an independent predictor of survival in advanced gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2015;22:3954–61. <http://dx.doi.org/10.1245/s10434-015-4483-6>.
- [18] Li Y, Gong J, Zhang Q, Lu Z, Gao J, Li Y, et al. Dynamic monitoring of circulating tumour cells to evaluate therapeutic efficacy in advanced gastric cancer. *Br J Cancer* 2016;114:138–45. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2015.417>.
- [19] Kim Y-W, Joo J, Yoon HM, Eom BW, Ryu KW, Choi IJ, et al. Different survival outcomes after curative R0-resection for Eastern Asian and European gastric cancer. *Med Baltim* 2016;95. <http://dx.doi.org/10.1097/MD.0000000000004261>.
- [20] Scalfani F, Smyth E, Cunningham D, Chau I, Turner A, Watkins D. A pilot study assessing the incidence and clinical significance of circulating tumor cells in esophagogastric cancers. *Clin Colorectal Cancer* 2014;13:94–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2013.11.003>.

Annexe 5 : Pointet et al. JFHOD 2015

P200 - Impact du blocage de la voie VEGF-A/VEGFR par les anti-angiogéniques sur les cellules myéloïdes suppressives dans le cancer colorectal

Pointet Anne-Laure, Terme Magali, Marcheteau Elie, Colussi Oriane, Pernot Simon, Voron Thibault, Tartour Eric, Taieb Julien

Introduction

Le concept de l'immunosurveillance anti-tumorale a établi que le système immunitaire joue un rôle important dans le contrôle des tumeurs, qui réagissent en induisant des cellules immunorégulatrices telles que les cellules myéloïdes suppressives (MDSC). Les MDSC sont des progéniteurs myéloïdes précoces, divisés en deux sous-populations : les MDSC granulocytiques (G-MDSC) et monocytiques (M-MDSC) aux mécanismes d'action distincts, mais aboutissant à l'inhibition des réponses immunitaires. Le VEGF-A produit par le microenvironnement tumoral possède des propriétés pro-angiogéniques et immunosuppressives. Différents agents anti-angiogéniques (AA) ciblent le VEGF-A et d'autres molécules impliquées dans l'angiogénèse. De récents travaux ont montré que les AA possèdent également des propriétés immunomodulatrices leur permettant notamment de diminuer les MDSC. Cependant, ces mécanismes d'action sont actuellement mal compris. Nous avons donc cherché à comprendre le fonctionnement des AA sur les MDSC, et plus précisément, l'impact du blocage spécifique de la voie VEGF-A /VEGFR par les AA sur les différentes sous-populations de MDSC dans le cancer colorectal.

Matériels et Méthodes

Des souris porteuses de tumeurs colorectales (modèle CT26) ont été traitées par un anti-VEGF-A, inhibant spécifiquement la liaison du VEGF-A au VEGFR1 et 2, ou par sunitinib, inhibiteur de tyrosine kinase multi-cible (inhibant VEGFR1-2-3, PDGFR-a/b, c-kit, Flt3), pendant 2 semaines. Les souris ont été sacrifiées, leurs rates et tumeurs prélevées et analysées en cytométrie en flux (immunomarquage CD11b, Gr1, Ly6C). L'expression des récepteurs au VEGF-A (VEGFR1 et VEGFR2) a également été analysée.

Résultats

Dans le modèle de cancer colorectal CT26, nous observons une augmentation des deux sous-populations de MDSC par rapport aux souris sans tumeurs. D'autre part, les pourcentages de MDSC totales spléniques ou intra-tumorales augmentent proportionnellement à la taille tumorale. Il est intéressant de noter que les M-MDSC sont par contre significativement plus fréquentes dans les tumeurs de petite taille (<150mm²), alors que les G-MDSC prévalent dans les tumeurs évoluées. Afin de comprendre ce phénomène, nous avons exprimé le pourcentage de M-MDSC en fonction du pourcentage de G-MDSC, et avons mis en évidence une corrélation inverse : les M-MDSC diminuent quand le pourcentage de G-MDSC augmente. Nous avons ensuite analysé l'impact des AA sur ces cellules. Alors que le sunitinib diminue le pourcentage de MDSC totales spléniques et tumorales significativement, l'anti-VEGF-A entraîne une diminution des MDSC totales intra-tumorales et spléniques qui n'est pas significative. L'étude des 2 sous-populations a permis de montrer que l'anti-VEGF-A diminuait les M-MDSC spléniques et intra-tumorales, sans moduler les G-MDSC. Ce résultat suggère un rôle du VEGF-A dans l'accumulation des MDSC monocytiques mais pas granulocytiques. L'analyse des VEGFR1 et 2 à la surface des MDSC spléniques et intra-tumorales, a révélé que ces deux sous-types de MDSC exprimaient ces 2 récepteurs. On observe également que les M-MDSC expriment significativement plus le VEGFR1 que les G-MDSC dans les tumeurs.

Conclusion

Ces résultats sont les premiers à suggérer que le blocage de la voie VEGF-A peut moduler les M-MDSC et non pas les G-MDSC. On pourrait envisager que le VEGF soit responsable en partie de l'accumulation des M-MDSC, et qu'un autre facteur de croissance de celle des G-MDSC. Ce travail permet de mieux comprendre l'impact des anti-VEGF sur les MDSC et pourra donner lieu ensuite à des recherches complémentaires pouvant permettre d'optimiser ces traitements anti-cancéreux ainsi qu'une association potentielle à des stratégies d'immunothérapie (immunomodulateurs, vaccination) dans le cancer colorectal.

Bibliographie

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 7 janv 2000;100(1):57-70.
2. Pham SM, Keenan RJ, Rao AS, Fontes PA, Kormos RL, Abu-Elmagd K, et al. Perioperative donor bone marrow infusion augments chimerism in heart and lung transplant recipients. *Ann Thorac Surg*. oct 1995;60(4):1015-20.
3. Frisch M, Biggar RJ, Engels EA, Goedert JJ, AIDS-Cancer Match Registry Study Group. Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. *JAMA*. 4 avr 2001;285(13):1736-45.
4. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 26 avr 2001;410(6832):1107-11.
5. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. nov 2002;3(11):991-8.
6. Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer*. 15 août 1975;16(2):230-9.
7. Schleinitz N, Hamidou M, Vély F, Paul P, Figarella-Branger D, Kaplanski G, et al. [NK cells: new insights on physiology and clinical implication in diseases]. *Rev Med Interne*. juin 2006;27(6):465-72.
8. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the « missing self »: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. juill 1990;11(7):237-44.
9. Eagle RA, Trowsdale J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol*. sept 2007;7(9):737-44.
10. Terme M, Fridman WH, Tartour E. NK cells from pleural effusions are potent antitumor effector cells. *Eur J Immunol*. févr 2013;43(2):331-4.
11. Kim S, Iizuka K, Aguila HL, Weissman IL, Yokoyama WM. In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 14 mars 2000;97(6):2731-6.
12. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. nov 2002;2(11):850-61.
13. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*. 25 nov 2000;356(9244):1795-9.
14. Malmberg K-J, Bryceson YT, Carlsten M, Andersson S, Björklund A, Björkström NK, et al. NK cell-mediated targeting of human cancer and possibilities for new means of immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. oct 2008;57(10):1541-52.
15. Carbone E, Neri P, Mesuraca M, Fulciniti MT, Otsuki T, Pende D, et al. HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood*. 1 janv 2005;105(1):251-8.
16. Talerico R, Todaro M, Di Franco S, Maccalli C, Garofalo C, Sottile R, et al. Human NK cells selective targeting of colon cancer-initiating cells: a role for natural cytotoxicity receptors and MHC class I molecules. *J Immunol*. 1 mars 2013;190(5):2381-90.
17. Diefenbach A, Raulet DH. Innate immune recognition by stimulatory immunoreceptors. *Curr Opin Immunol*. févr 2003;15(1):37-44.
18. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. oct 2010;11(10):889-96.

19. Edin S, Wikberg ML, Rutegård J, Oldenborg P-A, Palmqvist R. Phenotypic skewing of macrophages in vitro by secreted factors from colorectal cancer cells. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e74982.
20. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*. 28 nov 1997;278(5343):1626-9.
21. Benlagha K, Kyin T, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science*. 19 avr 2002;296(5567):553-5.
22. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science*. 12 mai 1995;268(5212):863-5.
23. Coquet JM, Kyparissoudis K, Pellicci DG, Besra G, Berzins SP, Smyth MJ, et al. IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production. *J Immunol*. 1 mars 2007;178(5):2827-34.
24. Coquet JM, Chakravarti S, Kyparissoudis K, McNab FW, Pitt LA, McKenzie BS, et al. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci USA*. 12 août 2008;105(32):11287-92.
25. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Sato H, et al. Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 12 mai 1998;95(10):5690-3.
26. Nieda M, Nicol A, Koezuka Y, Kikuchi A, Lapteva N, Tanaka Y, et al. TRAIL expression by activated human CD4(+)V alpha 24NKT cells induces in vitro and in vivo apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood*. 1 avr 2001;97(7):2067-74.
27. Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, et al. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science*. 28 nov 1997;278(5343):1623-6.
28. Smyth MJ, Godfrey DI. NKT cells and tumor immunity--a double-edged sword. *Nat Immunol*. déc 2000;1(6):459-60.
29. Godfrey DI, Pellicci DG, Smyth MJ. Immunology. The elusive NKT cell antigen--is the search over? *Science*. 3 déc 2004;306(5702):1687-9.
30. Terabe M, Swann J, Ambrosino E, Sinha P, Takaku S, Hayakawa Y, et al. A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. *J Exp Med*. 19 déc 2005;202(12):1627-33.
31. Dhodapkar MV, Kumar V. Type II NKT Cells and Their Emerging Role in Health and Disease. *J Immunol*. 01 2017;198(3):1015-21.
32. Robertson FC, Berzofsky JA, Terabe M. NKT cell networks in the regulation of tumor immunity. *Front Immunol*. 2014;5:543.
33. Bonneville M, Fournié J-J. Sensing cell stress and transformation through Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of the isoprenoid pathway metabolites. *Microbes Infect*. mars 2005;7(3):503-9.
34. Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, Bennouna J, Mosnier J-F, Scotet E, et al. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol*. 15 oct 2005;175(8):5481-8.
35. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1 mai 1973;137(5):1142-62.
36. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 19 mars 1998;392(6673):245-52.
37. Taieb J, Chaput N, Ménard C, Apetoh L, Ullrich E, Bonmort M, et al. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med*. févr 2006;12(2):214-9.
38. Li Y, Xu D-F, Jiang D, Zhao J, Ge J-F, Zheng S-Y. Significance of Fas and FasL protein expression in cardiac carcinoma and local lymph node tissues. *Int J Clin Exp Pathol*.

2015;8(9):11915-20.

39. Ghadially H, Ross X-L, Kerst C, Dong J, Reske-Kunz AB, Ross R. Differential regulation of CCL22 gene expression in murine dendritic cells and B cells. *J Immunol.* 1 mai 2005;174(9):5620-9.
40. Nelson BH. CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol.* 1 nov 2010;185(9):4977-82.
41. Shen M, Sun Q, Wang J, Pan W, Ren X. Positive and negative functions of B lymphocytes in tumors. *Oncotarget.* 15 juin 2016;7(34):55828-39.
42. Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, et al. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science.* 8 juin 2001;292(5523):1907-10.
43. Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* août 2005;54(8):721-8.
44. Kim H-J, Cantor H. CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful. *Cancer Immunol Res.* févr 2014;2(2):91-8.
45. Bourgeois C, Tanchot C. Mini-review CD4 T cells are required for CD8 T cell memory generation. *Eur J Immunol.* déc 2003;33(12):3225-31.
46. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 15 2012;12(4):298-306.
47. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 29 sept 2006;313(5795):1960-4.
48. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.* 16 janv 2003;348(3):203-13.
49. Hoepner S, Loh JMS, Riccadonna C, Derouazi M, Maroun CY, Dietrich P-Y, et al. Synergy between CD8 T cells and Th1 or Th2 polarised CD4 T cells for adoptive immunotherapy of brain tumours. *PLoS ONE.* 2013;8(5):e63933.
50. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Conrad DH, Clark-Lewis I, Finkelman FD, Plaut M, et al. IL-3 promotes production of IL-4 by splenic non-B, non-T cells in response to Fc receptor cross-linkage. *J Immunol.* 15 oct 1990;145(8):2500-6.
51. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol.* 1 déc 1990;145(11):3796-806.
52. Lorvik KB, Hammarström C, Fauskanger M, Haabeth OAW, Zangani M, Haraldsen G, et al. Adoptive Transfer of Tumor-Specific Th2 Cells Eradicates Tumors by Triggering an In Situ Inflammatory Immune Response. *Cancer Res.* 01 2016;76(23):6864-76.
53. Kennedy R, Celis E. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev.* avr 2008;222:129-44.
54. Kitajima M, Ito T, Tumes DJ, Endo Y, Onodera A, Hashimoto K, et al. Memory type 2 helper T cells induce long-lasting antitumor immunity by activating natural killer cells. *Cancer Res.* 15 juill 2011;71(14):4790-8.
55. Liu J-Q, Li X-Y, Yu H-Q, Yang G, Liu Z-Q, Geng X-R, et al. Tumor-specific Th2 responses inhibit growth of CT26 colon-cancer cells in mice via converting intratumor regulatory T cells to Th9 cells. *Sci Rep.* 2 juin 2015;5:10665.
56. Schreck S, Friebel D, Buettner M, Distel L, Grabenbauer G, Young LS, et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol.* mars 2009;27(1):31-9.
57. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 15 févr 2011;71(4):1263-71.

58. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev.* août 2003;8(3):223-46.
59. Kusuda T, Shigemasa K, Arihiro K, Fujii T, Nagai N, Ohama K. Relative expression levels of Th1 and Th2 cytokine mRNA are independent prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Oncol Rep.* juin 2005;13(6):1153-8.
60. Ubukata H, Motohashi G, Tabuchi T, Nagata H, Konishi S, Tabuchi T. Evaluations of interferon- γ /interleukin-4 ratio and neutrophil/lymphocyte ratio as prognostic indicators in gastric cancer patients. *J Surg Oncol.* 1 déc 2010;102(7):742-7.
61. Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell.* 12 oct 2012;151(2):289-303.
62. Yosef N, Shalek AK, Gaublomme JT, Jin H, Lee Y, Awasthi A, et al. Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature.* 25 avr 2013;496(7446):461-8.
63. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 11 mai 2006;441(7090):235-8.
64. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* févr 2006;24(2):179-89.
65. Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol.* juin 2008;9(6):650-7.
66. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature.* 17 juill 2008;454(7202):350-2.
67. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature.* 19 juin 2008;453(7198):1051-7.
68. Asadzadeh Z, Mohammadi H, Safarzadeh E, Hemmatzadeh M, Mahdian-Shakib A, Jadidi-Niaragh F, et al. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cell Immunol.* déc 2017;322:15-25.
69. Qian X, Chen H, Wu X, Hu L, Huang Q, Jin Y. Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis. *Cytokine.* janv 2017;89:34-44.
70. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:323-70.
71. Garrido F, Aptsiauri N, Doorduijn EM, Garcia Lora AM, van Hall T. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* avr 2016;39:44-51.
72. Han LY, Fletcher MS, Urbauer DL, Mueller P, Landen CN, Kamat AA, et al. HLA class I antigen processing machinery component expression and intratumoral T-Cell infiltrate as independent prognostic markers in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1 juin 2008;14(11):3372-9.
73. Watson NFS, Ramage JM, Madjd Z, Spendlove I, Ellis IO, Scholefield JH, et al. Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int J Cancer.* 1 janv 2006;118(1):6-10.
74. Kloor M, Michel S, von Knebel Doeberitz M. Immune evasion of microsatellite unstable colorectal cancers. *Int J Cancer.* 1 sept 2010;127(5):1001-10.
75. Hicklin DJ, Wang Z, Arienti F, Rivoltini L, Parmiani G, Ferrone S. beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J Clin Invest.* 15 juin 1998;101(12):2720-9.

76. del Campo AB, KYTE JA, Carretero J, Zinchenko S, Méndez R, González-Aseguinolaza G, et al. Immune escape of cancer cells with beta2-microglobulin loss over the course of metastatic melanoma. *Int J Cancer*. 1 janv 2014;134(1):102-13.
77. Geertsens R, Böni R, Blasczyk R, Romero P, Betts D, Rimoldi D, et al. Loss of single HLA class I allospecificities in melanoma cells due to selective genomic abbreviations. *Int J Cancer*. 1 mai 2002;99(1):82-7.
78. McGranahan N, Rosenthal R, Hiley CT, Rowan AJ, Watkins TBK, Wilson GA, et al. Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. *Cell*. 30 nov 2017;171(6):1259-1271.e11.
79. Setiadi AF, Omilusik K, David MD, Seipp RP, Hartikainen J, Gopaul R, et al. Epigenetic enhancement of antigen processing and presentation promotes immune recognition of tumors. *Cancer Res*. 1 déc 2008;68(23):9601-7.
80. Ramsuran V, Kulkarni S, O'huigin C, Yuki Y, Augusto DG, Gao X, et al. Epigenetic regulation of differential HLA-A allelic expression levels. *Hum Mol Genet*. 1 août 2015;24(15):4268-75.
81. Khan ANH, Gregorie CJ, Tomasi TB. Histone deacetylase inhibitors induce TAP, LMP, Tapasin genes and MHC class I antigen presentation by melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother*. mai 2008;57(5):647-54.
82. Friedrich M, Jasinski-Bergner S, Lazaridou M-F, Subbarayan K, Massa C, Tretbar S, et al. Tumor-induced escape mechanisms and their association with resistance to checkpoint inhibitor therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 3 août 2019;
83. Vlková V, Štěpánek I, Hrušková V, Šenigl F, Mayerová V, Šrámek M, et al. Epigenetic regulations in the IFN γ signalling pathway: IFN γ -mediated MHC class I upregulation on tumour cells is associated with DNA demethylation of antigen-presenting machinery genes. *Oncotarget*. 30 août 2014;5(16):6923-35.
84. Driessens G, Kline J, Gajewski TF. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol Rev*. mai 2009;229(1):126-44.
85. Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY. The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today*. oct 1997;18(10):493-7.
86. Zahavi DJ, Weiner LM. Tumor mechanisms of resistance to immune attack. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2019;164:61-100.
87. Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*. 7 nov 1969;166(3906):753-5.
88. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. mai 1970;18(5):723-37.
89. Mordes JP, Gallina DL, Handler ES, Greiner DL, Nakamura N, Pelletier A, et al. Transfusions enriched for W3/25+ helper/inducer T lymphocytes prevent spontaneous diabetes in the BB/W rat. *Diabetologia*. janv 1987;30(1):22-6.
90. Boitard C, Yasunami R, Dardenne M, Bach JF. T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice. *Journal of Experimental Medicine*. 1 mai 1989;169(5):1669-80.
91. Sakaguchi N, Miyai K, Sakaguchi S. Ionizing radiation and autoimmunity. Induction of autoimmune disease in mice by high dose fractionated total lymphoid irradiation and its prevention by inoculating normal T cells. *The Journal of Immunology*. 1 mars 1994;152(5):2586-95.
92. Fowell D, Mason D. Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *Journal of Experimental Medicine*. 1 mars 1993;177(3):627-36.
93. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence

- of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *Journal of Experimental Medicine*. 1 août 1996;184(2):387-96.
94. Olivares-Villagómez D, Wang Y, Lafaille JJ. Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 16 nov 1998;188(10):1883-94.
 95. Van de Keere F, Tonegawa S. CD4(+) T cells prevent spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med*. 16 nov 1998;188(10):1875-82.
 96. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1 août 1995;155(3):1151-64.
 97. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. janv 2001;27(1):68-73.
 98. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. janv 2001;27(1):20-1.
 99. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. juill 2010;10(7):490-500.
 100. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol*. avr 2007;19(4):345-54.
 101. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood*. 15 oct 2007;110(8):2983-90.
 102. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity*. 22 mai 2009;30(5):626-35.
 103. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol*. 1 avr 2010;184(7):3433-41.
 104. Mohr A, Malhotra R, Mayer G, Gorochoy G, Miyara M. Human FOXP3+ T regulatory cell heterogeneity. *Clin Transl Immunology*. 2018;7(1):e1005.
 105. Tuovinen H, Pekkarinen PT, Rossi LH, Mattila I, Arstila TP. The FOXP3+ subset of human CD4+CD8+ thymocytes is immature and subject to intrathymic selection. *Immunol Cell Biol*. sept 2008;86(6):523-9.
 106. Picca CC, Larkin J, Boesteanu A, Lerman MA, Rankin AL, Caton AJ. Role of TCR specificity in CD4+ CD25+ regulatory T-cell selection. *Immunol Rev*. août 2006;212:74-85.
 107. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 30 mai 2008;133(5):775-87.
 108. Malek TR, Yu A, Zhu L, Matsutani T, Adeegbe D, Bayer AL. IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. *J Clin Immunol*. nov 2008;28(6):635-9.
 109. Lio C-WJ, Hsieh C-S. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity*. janv 2008;28(1):100-11.
 110. Watanabe N, Hanabuchi S, Soumelis V, Yuan W, Ho S, de Waal Malefyt R, et al. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat Immunol*. avr 2004;5(4):426-34.
 111. Watanabe N, Wang Y-H, Lee HK, Ito T, Wang Y-H, Cao W, et al. Hassall's

- corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature*. 25 août 2005;436(7054):1181-5.
112. Liu Y-J, Soumelis V, Watanabe N, Ito T, Wang Y-H, Malefyt R de W, et al. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:193-219.
113. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K, Li L, Marinos N, et al. Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine*. 15 déc 2003;198(12):1875-86.
114. Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, Lafaille JJ. Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Control of Allergic Inflammation. *Immunity*. 18 juill 2008;29(1):114-26.
115. Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio C-W, Santacruz N, et al. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*. oct 2011;478(7368):250-4.
116. Hadis U, Wahl B, Schulz O, Hardtke-Wolenski M, Schippers A, Wagner N, et al. Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3+ Regulatory T Cells in the Lamina Propria. *Immunity*. 25 févr 2011;34(2):237-46.
117. Josefowicz SZ, Niec RE, Kim HY, Treuting P, Chinen T, Zheng Y, et al. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature*. févr 2012;482(7385):395-9.
118. Samstein RM, Josefowicz SZ, Arvey A, Treuting PM, Rudensky AY. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell*. 6 juill 2012;150(1):29-38.
119. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*. déc 2005;6(12):1219-27.
120. Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med*. 17 mai 2004;199(10):1401-8.
121. Siewert C, Lauer U, Cording S, Bopp T, Schmitt E, Hamann A, et al. Experience-driven development: effector/memory-like alphaE+Foxp3+ regulatory T cells originate from both naive T cells and naturally occurring naive-like regulatory T cells. *J Immunol*. 1 janv 2008;180(1):146-55.
122. Selvaraj RK, Geiger TL. A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. *J Immunol*. 15 juill 2007;179(2):11 p following 1390.
123. Zheng SG. The Critical Role of TGF-beta1 in the Development of Induced Foxp3+ Regulatory T Cells. *Int J Clin Exp Med*. 2008;1(3):192-202.
124. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 4 avr 2005;201(7):1061-7.
125. Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T, Inoue N, Morita R, Ichiyama K, et al. Smad2 and Smad3 Are Redundantly Essential for the TGF- β -Mediated Regulation of Regulatory T Plasticity and Th1 Development. *The Journal of Immunology*. 15 juill 2010;185(2):842-55.
126. Tamiya T, Ichiyama K, Kotani H, Fukaya T, Sekiya T, Shichita T, et al. Smad2/3 and IRF4 Play a Cooperative Role in IL-9-Producing T Cell Induction. *The Journal of Immunology*. 1 sept 2013;191(5):2360-71.
127. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce *Foxp3* expression through its enhancer. *Nature Immunology*. févr 2008;9(2):194-202.
128. Xu L, Kitani A, Stuelten C, McGrady G, Fuss I, Strober W. Positive and negative

- transcriptional regulation of the *Foxp3* gene is mediated by access and binding of the Smad3 protein to enhancer I. *Immunity*. 24 sept 2010;33(3):313-25.
129. Schlenner SM, Weigmann B, Ruan Q, Chen Y, Boehmer H von. Smad3 binding to the *foxp3* enhancer is dispensable for the development of regulatory T cells with the exception of the gut. *Journal of Experimental Medicine*. 27 août 2012;209(9):1529-35.
130. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. Role of conserved non-coding DNA elements in the *Foxp3* gene in regulatory T-cell fate. *Nature*. févr 2010;463(7282):808-12.
131. Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*. 13 juill 2007;317(5835):256-60.
132. Coombes JL, Siddiqui KRR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun C-M, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces *Foxp3*+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*. 6 août 2007;204(8):1757-64.
133. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson A-KL, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:99-146.
134. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 22 nov 2007;450(7169):566-9.
135. Roncarolo MG, Gregori S, Bacchetta R, Battaglia M, Gagliani N. The Biology of T Regulatory Type 1 Cells and Their Therapeutic Application in Immune-Mediated Diseases. *Immunity*. 18 déc 2018;49(6):1004-19.
136. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over *Foxp3*+ regulatory T cell function. *Science*. 10 oct 2008;322(5899):271-5.
137. Akkaya B, Oya Y, Akkaya M, Souza JA, Holstein AH, Kamenyeva O, et al. T regulatory cells mediate specific suppression by depleting peptide-MHC class II from dendritic cells. *Nat Immunol*. févr 2019;20(2):218-31.
138. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*. 29 avr 2011;332(6029):600-3.
139. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. oct 2004;21(4):589-601.
140. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnicka-Worms DR, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. oct 2007;27(4):635-46.
141. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol*. sept 2004;34(9):2480-8.
142. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. déc 2007;8(12):1353-62.
143. Oberle N, Eberhardt N, Falk CS, Krammer PH, Suri-Payer E. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol*. 15 sept 2007;179(6):3578-87.
144. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. juin 2013;19(6):355-67.
145. Shevach EM. *Foxp3*+ T Regulatory Cells: Still Many Unanswered Questions-A

- Perspective After 20 Years of Study. *Front Immunol.* 2018;9:1048.
146. Mason GM, Lowe K, Melchiotti R, Ellis R, de Rinaldis E, Peakman M, et al. Phenotypic Complexity of the Human Regulatory T Cell Compartment Revealed by Mass Cytometry. *J Immunol.* 1 sept 2015;195(5):2030-7.
147. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 19 juin 2009;30(6):899-911.
148. Seddiki N, Santner-Nanan B, Tangye SG, Alexander SI, Solomon M, Lee S, et al. Persistence of naive CD45RA⁺ regulatory T cells in adult life. *Blood.* 1 avr 2006;107(7):2830-8.
149. Valmori D, Merlo A, Souleimanian NE, Hesdorffer CS, Ayyoub M. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *J Clin Invest.* juill 2005;115(7):1953-62.
150. Fritzsching B, Oberle N, Pauly E, Geffers R, Buer J, Poschl J, et al. Naive regulatory T cells: a novel subpopulation defined by resistance toward CD95L-mediated cell death. *Blood.* 15 nov 2006;108(10):3371-8.
151. Fisson S, Darrasse-Jèze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, et al. Continuous activation of autoreactive CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med.* 1 sept 2003;198(5):737-46.
152. Vukmanovic-Stejic M, Zhang Y, Cook JE, Fletcher JM, McQuaid A, Masters JE, et al. Human CD4⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest.* sept 2006;116(9):2423-33.
153. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med.* 4 juin 2001;193(11):1295-302.
154. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med.* 4 juin 2001;193(11):1303-10.
155. Fritzsching B, Oberle N, Eberhardt N, Quick S, Haas J, Wildemann B, et al. In contrast to effector T cells, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J Immunol.* 1 juill 2005;175(1):32-6.
156. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol.* 15 avr 2006;176(8):4622-31.
157. Ito T, Hanabuchi S, Wang Y-H, Park WR, Arima K, Bover L, et al. Two functional subsets of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity.* juin 2008;28(6):870-80.
158. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, et al. CD4⁺ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science.* 13 nov 2009;326(5955):986-91.
159. Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol.* juin 2009;10(6):595-602.
160. Littringer K, Moresi C, Rakebrandt N, Zhou X, Schorer M, Dolowschiak T, et al. Common Features of Regulatory T Cell Specialization During Th1 Responses. *Front Immunol.* 2018;9:1344.
161. Zheng Y, Chaudhry A, Kas A, deRoos P, Kim JM, Chu T-T, et al. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature.* 19 mars 2009;458(7236):351-6.
162. Duhén T, Duhén R, Lanzavecchia A, Sallusto F, Campbell DJ. Functionally distinct subsets of human FOXP3⁺ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. *Blood.* 10 mai 2012;119(19):4430-40.

163. Levine AG, Mendoza A, Hemmers S, Moltedo B, Niec RE, Schizas M, et al. Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. *Nature*. 15 2017;546(7658):421-5.
164. Hall AO, Beiting DP, Tato C, John B, Oldenhove G, Lombana CG, et al. The Cytokines Interleukin 27 and Interferon- γ Promote Distinct Treg Cell Populations Required to Limit Infection-Induced Pathology. *Immunity*. 21 sept 2012;37(3):511-23.
165. Wing JB, Tanaka A, Sakaguchi S. Human FOXP3+ Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer. *Immunity*. 19 2019;50(2):302-16.
166. Halim L, Romano M, McGregor R, Correa I, Pavlidis P, Grageda N, et al. An Atlas of Human Regulatory T Helper-like Cells Reveals Features of Th2-like Tregs that Support a Tumorigenic Environment. *Cell Rep*. 18 2017;20(3):757-70.
167. Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, Yang L, Kuchroo VK, Baecher-Allan C, et al. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood*. 30 avr 2009;113(18):4240-9.
168. Cretny E, Xin A, Shi W, Minnich M, Masson F, Miasari M, et al. The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat Immunol*. avr 2011;12(4):304-11.
169. Wohlfert EA, Grainger JR, Bouladoux N, Konkel JE, Oldenhove G, Ribeiro CH, et al. GATA3 controls Foxp3+ regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J Clin Invest*. nov 2011;121(11):4503-15.
170. Wing JB, Sakaguchi S. Multiple treg suppressive modules and their adaptability. *Front Immunol*. 2012;3:178.
171. Yu F, Sharma S, Edwards J, Feigenbaum L, Zhu J. Dynamic expression of transcription factors T-bet and GATA-3 by regulatory T cells maintains immunotolerance. *Nat Immunol*. févr 2015;16(2):197-206.
172. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res*. févr 2003;9(2):606-12.
173. Whiteside TL. The role of regulatory T cells in cancer immunology. *Immunotargets Ther*. 2015;4:159-71.
174. Gao Q, Qiu S-J, Fan J, Zhou J, Wang X-Y, Xiao Y-S, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol*. 20 juin 2007;25(18):2586-93.
175. Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, Conlon D, Joshi M-B, Harpole DH, et al. Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer*. 15 déc 2006;107(12):2866-72.
176. Perrone G, Ruffini PA, Catalano V, Spino C, Santini D, Muretto P, et al. Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur J Cancer*. sept 2008;44(13):1875-82.
177. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res*. 15 sept 2006;12(18):5423-34.
178. Ha T-Y. The Role of Regulatory T Cells in Cancer. *Immune Netw*. déc 2009;9(6):209-35.
179. Gallimore A, Quezada SA, Roychoudhuri R. Regulatory T cells in cancer: where are we now? *Immunology*. 2019;157(3):187-9.
180. Stockis J, Roychoudhuri R, Halim TYF. Regulation of regulatory T cells in cancer. *Immunology*. juill 2019;157(3):219-31.
181. Valzasina B, Piconese S, Guiducci C, Colombo MP. Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation

- independent. *Cancer Res.* 15 avr 2006;66(8):4488-95.
182. Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol.* 1 mars 2007;178(5):2883-92.
183. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med.* 3 oct 2005;202(7):919-29.
184. Huang B, Pan P-Y, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 15 janv 2006;66(2):1123-31.
185. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* sept 2004;10(9):942-9.
186. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* 1 mars 2009;69(5):2000-9.
187. Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer.* 15 mai 2008;122(10):2286-93.
188. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang L-P, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature.* 13 juill 2011;475(7355):226-30.
189. Delacher M, Imbusch CD, Weichenhan D, Breiling A, Hotz-Wagenblatt A, Träger U, et al. Genome-wide DNA-methylation landscape defines specialization of regulatory T cells in tissues. *Nat Immunol.* oct 2017;18(10):1160-72.
190. Martin-Orozco N, Li Y, Wang Y, Liu S, Hwu P, Liu Y-J, et al. Melanoma cells express ICOS ligand to promote the activation and expansion of T-regulatory cells. *Cancer Res.* 1 déc 2010;70(23):9581-90.
191. Strauss L, Bergmann C, Szczepanski MJ, Lang S, Kirkwood JM, Whiteside TL. Expression of ICOS on human melanoma-infiltrating CD4+CD25highFoxp3+ T regulatory cells: implications and impact on tumor-mediated immune suppression. *J Immunol.* 1 mars 2008;180(5):2967-80.
192. Herman AE, Freeman GJ, Mathis D, Benoist C. CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J Exp Med.* 7 juin 2004;199(11):1479-89.
193. Burmeister Y, Lischke T, Dahler AC, Mages HW, Lam K-P, Coyle AJ, et al. ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol.* 15 janv 2008;180(2):774-82.
194. Vasanthakumar A, Liao Y, Teh P, Pascutti MF, Oja AE, Garnham AL, et al. The TNF Receptor Superfamily-NF-κB Axis Is Critical to Maintain Effector Regulatory T Cells in Lymphoid and Non-lymphoid Tissues. *Cell Rep.* 19 sept 2017;20(12):2906-20.
195. Ni XY, Sui HX, Liu Y, Ke SZ, Wang YN, Gao FG. TGF-β of lung cancer microenvironment upregulates B7H1 and GITRL expression in dendritic cells and is associated with regulatory T cell generation. *Oncol Rep.* août 2012;28(2):615-21.
196. Meinicke H, Bremser A, Brack M, Schrenk K, Pircher H, Izcue A. KLRG1 impairs regulatory T-cell competitive fitness in the gut. *Immunology.* 2017;152(1):65-73.
197. Meinicke H, Bremser A, Brack M, Akeus P, Pearson C, Bullers S, et al. Tumour-associated changes in intestinal epithelial cells cause local accumulation of KLRG1+ GATA3+ regulatory T cells in mice. *Immunology.* 2017;152(1):74-88.

198. Frey DM, Droezer RA, Viehl CT, Zlobec I, Lugli A, Zingg U, et al. High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 1 juin 2010;126(11):2635-43.
199. Ladoire S, Martin F, Ghiringhelli F. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 1 juill 2011;60(7):909-18.
200. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. mars 2009;9(3):162-74.
201. Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol*. 2018;19(2):108-19.
202. Ribechini E, Hutchinson JA, Hergovits S, Heuer M, Lucas J, Schleicher U, et al. Novel GM-CSF signals via IFN- γ R/IRF-1 and AKT/mTOR license monocytes for suppressor function. *Blood Adv*. 13 juin 2017;1(14):947-60.
203. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, Ochoa JB, et al. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med*. 3 oct 2005;202(7):931-9.
204. Mao Y, Poschke I, Wennerberg E, Pico de Coaña Y, Egyhazi Brage S, Schultz I, et al. Melanoma-educated CD14+ cells acquire a myeloid-derived suppressor cell phenotype through COX-2-dependent mechanisms. *Cancer Res*. 1 juill 2013;73(13):3877-87.
205. Khaled YS, Ammori BJ, Elkord E. Myeloid-derived suppressor cells in cancer: recent progress and prospects. *Immunol Cell Biol*. sept 2013;91(8):493-502.
206. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med*. juill 2007;13(7):828-35.
207. Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, et al. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J Exp Med*. 26 sept 2011;208(10):1949-62.
208. Lu T, Ramakrishnan R, Altiok S, Youn J-I, Cheng P, Celis E, et al. Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. *J Clin Invest*. oct 2011;121(10):4015-29.
209. Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V, et al. Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. *J Immunol*. 15 déc 2012;189(12):5602-11.
210. Dolcetti L, Peranzoni E, Ugel S, Marigo I, Fernandez Gomez A, Mesa C, et al. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur J Immunol*. janv 2010;40(1):22-35.
211. Movahedi K, Guillems M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*. 15 avr 2008;111(8):4233-44.
212. Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(1):3-8.
213. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. 22 mars 2012;12(4):253-68.
214. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. janv 2009;58(1):49-59.
215. Sun H-L, Zhou X, Xue Y-F, Wang K, Shen Y-F, Mao J-J, et al. Increased frequency and clinical significance of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol*. 7 juill 2012;18(25):3303-9.

216. Zhang B, Wang Z, Wu L, Zhang M, Li W, Ding J, et al. Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in patients with colorectal carcinoma. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e57114.
217. Angell TE, Lechner MG, Smith AM, Martin SE, Groshen SG, Maceri DR, et al. Circulating Myeloid-Derived Suppressor Cells Predict Differentiated Thyroid Cancer Diagnosis and Extent. *Thyroid*. mars 2016;26(3):381-9.
218. Huang A, Zhang B, Wang B, Zhang F, Fan K-X, Guo Y-J. Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. sept 2013;62(9):1439-51.
219. Yang G, Shen W, Zhang Y, Liu M, Zhang L, Liu Q, et al. Accumulation of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) induced by low levels of IL-6 correlates with poor prognosis in bladder cancer. *Oncotarget*. 13 juin 2017;8(24):38378-88.
220. Jordan KR, Amaria RN, Ramirez O, Callihan EB, Gao D, Borakove M, et al. Myeloid-derived suppressor cells are associated with disease progression and decreased overall survival in advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother*. nov 2013;62(11):1711-22.
221. Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, et al. Increase in CD14+HLA-DR -/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis. *Cancer Immunol Immunother*. août 2013;62(8):1421-30.
222. Zhang S, Ma X, Zhu C, Liu L, Wang G, Yuan X. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Patients with Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2016;11(10):e0164514.
223. Tada K, Kitano S, Shoji H, Nishimura T, Shimada Y, Nagashima K, et al. Pretreatment Immune Status Correlates with Progression-Free Survival in Chemotherapy-Treated Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(7):592-9.
224. Limagne E, Euvrard R, Thibaudin M, Rébé C, Derangère V, Chevriaux A, et al. Accumulation of MDSC and Th17 Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Predicts the Efficacy of a FOLFOX-Bevacizumab Drug Treatment Regimen. *Cancer Res*. 15 2016;76(18):5241-52.
225. Li X, Xing Y-F, Lei A-H, Xiao Q, Lin Z-H, Hong Y-F, et al. Neutrophil count is associated with myeloid derived suppressor cell level and presents prognostic value of for hepatocellular carcinoma patients. *Oncotarget*. 11 avr 2017;8(15):24380-8.
226. de Coaña YP, Wolodarski M, Poschke I, Yoshimoto Y, Yang Y, Nyström M, et al. Ipilimumab treatment decreases monocytic MDSCs and increases CD8 effector memory T cells in long-term survivors with advanced melanoma. *Oncotarget*. 28 mars 2017;8(13):21539-53.
227. Sade-Feldman M, Kanterman J, Klieger Y, Ish-Shalom E, Olga M, Saragovi A, et al. Clinical Significance of Circulating CD33+CD11b+HLA-DR- Myeloid Cells in Patients with Stage IV Melanoma Treated with Ipilimumab. *Clin Cancer Res*. 1 déc 2016;22(23):5661-72.
228. Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Geukes Foppen M, Yuan J, Postow MA, Wong P, et al. Baseline Peripheral Blood Biomarkers Associated with Clinical Outcome of Advanced Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. *Clin Cancer Res*. 15 2016;22(12):2908-18.
229. Weber J, Gibney G, Kudchadkar R, Yu B, Cheng P, Martinez AJ, et al. Phase I/II Study of Metastatic Melanoma Patients Treated with Nivolumab Who Had Progressed after Ipilimumab. *Cancer Immunol Res*. avr 2016;4(4):345-53.
230. Davis RJ, Moore EC, Clavijo PE, Friedman J, Cash H, Chen Z, et al. Anti-PD-L1 Efficacy Can Be Enhanced by Inhibition of Myeloid-Derived Suppressor Cells with a Selective Inhibitor of PI3K δ/γ . *Cancer Res*. 15 2017;77(10):2607-19.
231. Lu X, Horner JW, Paul E, Shang X, Troncoso P, Deng P, et al. Effective combinatorial

- immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *Nature*. 30 2017;543(7647):728-32.
232. Highfill SL, Cui Y, Giles AJ, Smith JP, Zhang H, Morse E, et al. Disruption of CXCR2-mediated MDSC tumor trafficking enhances anti-PD1 efficacy. *Sci Transl Med*. 21 mai 2014;6(237):237ra67.
233. Guan H, Wan Y, Lan J, Wang Q, Wang Z, Li Y, et al. PD-L1 is a critical mediator of regulatory B cells and T cells in invasive breast cancer. *Sci Rep*. 20 2016;6:35651.
234. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 21 avr 2015;42(4):607-12.
235. van der Merwe PA, Bodian DL, Daenke S, Linsley P, Davis SJ. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med*. 3 févr 1997;185(3):393-403.
236. Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJC, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B, et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity*. août 2002;17(2):201-10.
237. Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev*. mai 2009;229(1):12-26.
238. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*. juin 2006;118(2):240-9.
239. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. août 2002;8(8):793-800.
240. Parsa AT, Waldron JS, Panner A, Crane CA, Parney IF, Barry JJ, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med*. janv 2007;13(1):84-8.
241. Marzec M, Zhang Q, Goradia A, Raghunath PN, Liu X, Paessler M, et al. Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc Natl Acad Sci USA*. 30 déc 2008;105(52):20852-7.
242. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*. 28 mars 2012;4(127):127ra37.
243. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. août 2015;15(8):486-99.
244. Labrijn AF, Janmaat ML, Reichert JM, Parren PW. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nat Rev Drug Discov*. août 2019;18(8):585-608.
245. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 1 juill 2011;17(13):4550-7.
246. Arienti F, Belli F, Rivoltini L, Gambacorti-Passerini C, Furlan L, Mascheroni L, et al. Adoptive immunotherapy of advanced melanoma patients with interleukin-2 (IL-2) and tumor-infiltrating lymphocytes selected in vitro with low doses of IL-2. *Cancer Immunol Immunother*. mai 1993;36(5):315-22.
247. Walsh Z, Yang Y, Kohler ME. Immunobiology of chimeric antigen receptor T cells and novel designs. *Immunol Rev*. juill 2019;290(1):100-13.
248. Elahi R, Khosh E, Tahmasebi S, Esmaeilzadeh A. Immune Cell Hacking: Challenges and Clinical Approaches to Create Smarter Generations of Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Front Immunol*. 2018;9:1717.
249. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 29 juill

2010;363(5):411-22.

250. Barni S, Lissoni P, Ardizzola A, Vigoré L, Vezzo R, Rescaldani R, et al. Immunotherapy with low-dose subcutaneous interleukin-2 plus beta-interferon as a second-line therapy for metastatic colorectal carcinoma. *Tumori*. 31 oct 1993;79(5):343-6.
251. Piga A, Cascinu S, Latini L, Marcellini M, Bavosi M, Acito L, et al. A phase II randomised trial of 5-fluorouracil with or without interferon alpha-2a in advanced colorectal cancer. *Br J Cancer*. sept 1996;74(6):971-4.
252. Harris JE, Ryan L, Hoover HC, Stuart RK, Oken MM, Benson AB, et al. Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283. *J Clin Oncol*. janv 2000;18(1):148-57.
253. Brivio F, Fumagalli L, Lissoni P, Nardone A, Nespoli L, Fattori L, et al. Pre-operative immunoprophylaxis with interleukin-2 may improve prognosis in radical surgery for colorectal cancer stage B-C. *Anticancer Res*. févr 2006;26(1B):599-603.
254. Cheever MA. Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. *Immunol Rev*. avr 2008;222:357-68.
255. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 22 mars 2012;12(4):252-64.
256. Ganesh K, Stadler ZK, Cercek A, Mendelsohn RB, Shia J, Segal NH, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(6):361-75.
257. Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol*. avr 1999;9(2):67-81.
258. Keogh E, Fikes J, Southwood S, Celis E, Chesnut R, Sette A. Identification of new epitopes from four different tumor-associated antigens: recognition of naturally processed epitopes correlates with HLA-A*0201-binding affinity. *J Immunol*. 15 juill 2001;167(2):787-96.
259. Fauquembergue E, Toutirais O, Tougeron D, Drouet A, Le Gallo M, Desille M, et al. HLA-A*0201-restricted CEA-derived peptide CAP1 is not a suitable target for T-cell-based immunotherapy. *J Immunother*. mai 2010;33(4):402-13.
260. Nagorsen D, Keilholz U, Rivoltini L, Schmittel A, Letsch A, Asemissen AM, et al. Natural T-cell response against MHC class I epitopes of epithelial cell adhesion molecule, her-2/neu, and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer. *Cancer Res*. 1 sept 2000;60(17):4850-4.
261. Smyrk TC, Watson P, Kaul K, Lynch HT. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer*. 15 juin 2001;91(12):2417-22.
262. Michael-Robinson JM, Biemer-Hüttmann A, Purdie DM, Walsh MD, Simms LA, Biden KG, et al. Tumour infiltrating lymphocytes and apoptosis are independent features in colorectal cancer stratified according to microsatellite instability status. *Gut*. mars 2001;48(3):360-6.
263. Benatti P, Gafà R, Barana D, Marino M, Scarselli A, Pedroni M, et al. Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res*. 1 déc 2005;11(23):8332-40.
264. Duval A, Hamelin R. [Replication error repair, microsatellites, and cancer]. *Med Sci (Paris)*. janv 2003;19(1):55-62.
265. Saeterdal I, Gjertsen MK, Straten P, Eriksen JA, Gaudernack G. A TGF betaRII frameshift-mutation-derived CTL epitope recognised by HLA-A2-restricted CD8+ T cells. *Cancer Immunol Immunother*. nov 2001;50(9):469-76.
266. Ripberger E, Linnebacher M, Schwitalle Y, Gebert J, von Knebel Doeberitz M.

- Identification of an HLA-A0201-restricted CTL epitope generated by a tumor-specific frameshift mutation in a coding microsatellite of the OGT gene. *J Clin Immunol.* sept 2003;23(5):415-23.
267. Garbe Y, Maletzki C, Linnebacher M. An MSI tumor specific frameshift mutation in a coding microsatellite of MSH3 encodes for HLA-A0201-restricted CD8+ cytotoxic T cell epitopes. *PLoS ONE.* 2011;6(11):e26517.
268. Tougeron D, Fauquemberg E, Rouquette A, Le Pessot F, Sesboüé R, Laurent M, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancers with microsatellite instability are correlated with the number and spectrum of frameshift mutations. *Mod Pathol.* sept 2009;22(9):1186-95.
269. Maby P, Tougeron D, Hamieh M, Mlecnik B, Kora H, Bindea G, et al. Correlation between Density of CD8+ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy. *Cancer Res.* 1 sept 2015;75(17):3446-55.
270. Cabrera CM, Jiménez P, Cabrera T, Esparza C, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens.* mars 2003;61(3):211-9.
271. Sinicrope FA, Rego RL, Ansell SM, Knutson KL, Foster NR, Sargent DJ. Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma. *Gastroenterology.* oct 2009;137(4):1270-9.
272. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 18 juill 2012;487(7407):330-7.
273. Yaeger R, Chatila WK, Lipsyc MD, Hechtman JF, Cercek A, Sanchez-Vega F, et al. Clinical Sequencing Defines the Genomic Landscape of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Cell.* 08 2018;33(1):125-136.e3.
274. Domingo E, Freeman-Mills L, Rayner E, Glaire M, Briggs S, Vermeulen L, et al. Somatic POLE proofreading domain mutation, immune response, and prognosis in colorectal cancer: a retrospective, pooled biomarker study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology.* 1 nov 2016;1(3):207-16.
275. Rayner E, van Gool IC, Palles C, Kearsley SE, Bosse T, Tomlinson I, et al. A panoply of errors: polymerase proofreading domain mutations in cancer. *Nat Rev Cancer.* févr 2016;16(2):71-81.
276. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 22 déc 2005;353(25):2654-66.
277. Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 10 déc 2009;27(35):5944-51.
278. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol.* 20 févr 2011;29(6):610-8.
279. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Maby P, Angelova M, Tougeron D, et al. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity.* 15 mars 2016;44(3):698-711.
280. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou F-S, Bifulco C, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet.* 26 2018;391(10135):2128-39.
281. Mlecnik B, Van den Eynde M, Bindea G, Church SE, Vasaturo A, Fredriksen T, et al. Comprehensive Intrametastatic Immune Quantification and Major Impact of Immunoscore on

- Survival. *J Natl Cancer Inst.* 01 2018;110(1).
282. Boissière-Michot F, Lazennec G, Frugier H, Jarlier M, Roca L, Duffour J, et al. Characterization of an adaptive immune response in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Oncoimmunology.* 2014;3:e29256.
283. Ling A, Lundberg IV, Eklöf V, Wikberg ML, Öberg Å, Edin S, et al. The infiltration, and prognostic importance, of Th1 lymphocytes vary in molecular subgroups of colorectal cancer. *J Pathol Clin Res.* janv 2016;2(1):21-31.
284. Ott E, Bilonda L, Dansette D, Deleine C, Duchalais E, Podevin J, et al. The density of Tbet+ tumor-infiltrating T lymphocytes reflects an effective and druggable preexisting adaptive antitumor immune response in colorectal cancer, irrespective of the microsatellite status. *Oncoimmunology.* 2019;8(4):e1562834.
285. Desbois M, Rusakiewicz S, Locher C, Zitvogel L, Chaput N. Natural killer cells in non-hematopoietic malignancies. *Front Immunol [Internet].* 24 déc 2012 [cité 7 août 2019];3. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3529393/>
286. Coppola A, Arriga R, Lauro D, del Principe MI, Buccisano F, Maurillo L, et al. NK Cell Inflammation in the Clinical Outcome of Colorectal Carcinoma. *Front Med (Lausanne) [Internet].* 26 mai 2015 [cité 7 août 2019];2. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4469113/>
287. Sconocchia G, Eppenberger S, Spagnoli GC, Tornillo L, Droeser R, Caratelli S, et al. NK cells and T cells cooperate during the clinical course of colorectal cancer. *Oncoimmunology.* 2014;3(8):e952197.
288. Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 10 janv 2009;27(2):186-92.
289. Correale P, Rotundo M, Vecchio MD, Remondo C, Migali C, Ginanneschi C, et al. Regulatory (FoxP3+) T-cell Tumor Infiltration Is a Favorable Prognostic Factor in Advanced Colon Cancer Patients Undergoing Chemo or Chemoimmunotherapy. *Journal of Immunotherapy.* mai 2010;33(4):435-41.
290. Suzuki H, Chikazawa N, Tasaka T, Wada J, Yamasaki A, Kitaura Y, et al. Intratumoral CD8+ T/FOXP3+ cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 1 mai 2010;59(5):653-61.
291. Saito T, Nishikawa H, Wada H, Nagano Y, Sugiyama D, Atarashi K, et al. Two FOXP3(+)/CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat Med.* 2016;22(6):679-84.
292. Hirt C, Eppenberger-Castori S, Sconocchia G, Iezzi G, Tornillo L, Terracciano L, et al. Colorectal carcinoma infiltration by myeloperoxidase-expressing neutrophil granulocytes is associated with favorable prognosis. *Oncoimmunology.* 1 oct 2013;2(10):e25990.
293. Sconocchia G, Zlobec I, Lugli A, Calabrese D, Iezzi G, Karamitopoulou E, et al. Tumor infiltration by FcγRIII (CD16)+ myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma. *Int J Cancer.* 1 juin 2011;128(11):2663-72.
294. Forssell J, Oberg A, Henriksson ML, Stenling R, Jung A, Palmqvist R. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin Cancer Res.* 1 mars 2007;13(5):1472-9.
295. Wargo JA, Reddy SM, Reuben A, Sharma P. Monitoring immune responses in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol.* 2016;41:23-31.
296. Gutkin DW, Shurin MR. Clinical evaluation of systemic and local immune responses in cancer: time for integration. *Cancer Immunol Immunother.* janv 2014;63(1):45-57.
297. Stroncek DF, Butterfield LH, Cannarile MA, Dhodapkar MV, Greten TF, Grivel JC, et al. Systematic evaluation of immune regulation and modulation. *J Immunother Cancer.* 2017;5:21.

298. Choi J, Maeng HG, Lee SJ, Kim YJ, Kim DW, Lee HN, et al. Diagnostic value of peripheral blood immune profiling in colorectal cancer. *Ann Surg Treat Res.* juin 2018;94(6):312-21.
299. Hagland HR, Lea D, Watson MM, Søreide K. Correlation of Blood T-Cells to Intratumoural Density and Location of CD3+ and CD8+ T-Cells in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2017;37(2):675-83.
300. Mahalingam J, Lin C-Y, Chiang J-M, Su P-J, Chu Y-Y, Lai H-Y, et al. CD4⁺ T cells expressing latency-associated peptide and Foxp3 are an activated subgroup of regulatory T cells enriched in patients with colorectal cancer. *PLoS ONE.* 2014;9(9):e108554.
301. Krijgsman D, de Vries NL, Skovbo A, Andersen MN, Swets M, Bastiaannet E, et al. Characterization of circulating T-, NK-, and NKT cell subsets in patients with colorectal cancer: the peripheral blood immune cell profile. *Cancer Immunol Immunother.* juin 2019;68(6):1011-24.
302. Bencsikova B, Budinska E, Selingerova I, Pilatova K, Fedorova L, Greplova K, et al. Circulating T cell subsets are associated with clinical outcome of anti-VEGF-based 1st-line treatment of metastatic colorectal cancer patients: a prospective study with focus on primary tumor sidedness. *BMC Cancer [Internet].* 15 juill 2019 [cité 8 oct 2019];19. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6631500/>
303. Qiu H, Xiao-Jun W, Zhi-Wei Z, Gong C, Guo-Qiang W, Li-Yi Z, et al. The prognostic significance of peripheral T-lymphocyte subsets and natural killer cells in patients with colorectal cancer. *Hepatogastroenterology.* oct 2009;56(94-95):1310-5.
304. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 28 juin 2012;366(26):2443-54.
305. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med.* 25 juin 2015;372(26):2509-20.
306. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science.* 28 2017;357(6349):409-13.
307. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz H-J, Morse MA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2017;18(9):1182-91.
308. Gurjao C, Liu D, Hofree M, AlDubayan SH, Wakiro I, Su M-J, et al. Intrinsic Resistance to Immune Checkpoint Blockade in a Mismatch Repair-Deficient Colorectal Cancer. *Cancer Immunol Res.* août 2019;7(8):1230-6.
309. Grasso CS, Giannakis M, Wells DK, Hamada T, Mu XJ, Quist M, et al. Genetic Mechanisms of Immune Evasion in Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* 2018;8(6):730-49.
310. Sveen A, Johannessen B, Tengs T, Danielsen SA, Eilertsen IA, Lind GE, et al. Multilevel genomics of colorectal cancers with microsatellite instability-clinical impact of JAK1 mutations and consensus molecular subtype 1. *Genome Med.* 24 2017;9(1):46.
311. Spranger S, Gajewski TF. Impact of oncogenic pathways on evasion of antitumour immune responses. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(3):139-47.
312. Eng C, Kim TW, Bendell J, Argilés G, Tebbutt NC, Bartolomeo MD, et al. Atezolizumab with or without cobimetinib versus regorafenib in previously treated metastatic colorectal cancer (IMblaze370): a multicentre, open-label, phase 3, randomised, controlled trial. *The Lancet Oncology.* 1 juin 2019;20(6):849-61.
313. Grothey A, Tabernero J, Arnold D, De Gramont A, Ducreux MP, O'Dwyer PJ, et al. LBA19Fluoropyrimidine (FP) + bevacizumab (BEV) + atezolizumab vs FP/BEV in BRAFwt

- metastatic colorectal cancer (mCRC): Findings from Cohort 2 of MODUL – a multicentre, randomized trial of biomarker-driven maintenance treatment following first-line induction therapy. *Ann Oncol* [Internet]. 1 oct 2018 [cité 8 août 2019];29(suppl_8). Disponible sur: http://academic.oup.com/annonc/article/29/suppl_8/mdy424.020/5141615
314. Parkhurst MR, Yang JC, Langan RC, Dudley ME, Nathan D-AN, Feldman SA, et al. T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol Ther*. mars 2011;19(3):620-6.
315. Katz SC, Burga RA, McCormack E, Wang LJ, Mooring W, Point GR, et al. Phase I Hepatic Immunotherapy for Metastases Study of Intra-Arterial Chimeric Antigen Receptor-Modified T-cell Therapy for CEA+ Liver Metastases. *Clin Cancer Res*. 15 juill 2015;21(14):3149-59.
316. Zhang C, Wang Z, Yang Z, Wang M, Li S, Li Y, et al. Phase I Escalating-Dose Trial of CAR-T Therapy Targeting CEA+ Metastatic Colorectal Cancers. *Mol Ther*. 03 2017;25(5):1248-58.
317. Tran E, Robbins PF, Lu Y-C, Prickett TD, Gartner JJ, Jia L, et al. T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer. *N Engl J Med*. 8 déc 2016;375(23):2255-62.
318. Correale P, Tagliaferri P, Fioravanti A, Del Vecchio MT, Remondo C, Montagnani F, et al. Immunity feedback and clinical outcome in colon cancer patients undergoing chemoimmunotherapy with gemcitabine + FOLFOX followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and aldesleukin (GOLFIG-1 Trial). *Clin Cancer Res*. 1 juill 2008;14(13):4192-9.
319. Pernot S, Terme M, Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Tartour E, et al. Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives. *World J Gastroenterol*. 14 avr 2014;20(14):3738-50.
320. Tintelnot J, Stein A. Immunotherapy in colorectal cancer: Available clinical evidence, challenges and novel approaches. *World Journal of Gastroenterology*. 7 août 2019;25(29):3920-8.
321. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 11 sept 2014;513(7517):202-9.
322. Chiaravalli AM, Feltri M, Bertolini V, Bagnoli E, Furlan D, Cerutti R, et al. Intratumour T cells, their activation status and survival in gastric carcinomas characterised for microsatellite instability and Epstein-Barr virus infection. *Virchows Arch*. mars 2006;448(3):344-53.
323. Grogg KL, Lohse CM, Pankratz VS, Halling KC, Smyrk TC. Lymphocyte-rich gastric cancer: associations with Epstein-Barr virus, microsatellite instability, histology, and survival. *Mod Pathol*. juill 2003;16(7):641-51.
324. Kang BW, Seo AN, Yoon S, Bae HI, Jeon SW, Kwon OK, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer. *Ann Oncol*. mars 2016;27(3):494-501.
325. Oki E, Kakeji Y, Zhao Y, Yoshida R, Ando K, Masuda T, et al. Chemosensitivity and survival in gastric cancer patients with microsatellite instability. *Ann Surg Oncol*. sept 2009;16(9):2510-5.
326. Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer*. 15 juill 2000;87(2):200-3.
327. Fleisher AS, Esteller M, Tamura G, Rashid A, Stine OC, Yin J, et al. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia. *Oncogene*. 18 janv 2001;20(3):329-35.
328. Yuza K, Nagahashi M, Watanabe S, Takabe K, Wakai T. Hypermutation and microsatellite instability in gastrointestinal cancers. *Oncotarget*. 19 déc

2017;8(67):112103-15.

329. Polom K, Marano L, Marrelli D, De Luca R, Roviello G, Savelli V, et al. Meta-analysis of microsatellite instability in relation to clinicopathological characteristics and overall survival in gastric cancer. *Br J Surg*. 2018;105(3):159-67.
330. Kang BW, Kim JG, Lee IH, Bae HI, Seo AN. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes for gastric cancer in the era of immunology. *World J Gastrointest Oncol*. 15 juill 2017;9(7):293-9.
331. Kim JH, Park HE, Cho N-Y, Lee HS, Kang GH. Characterisation of PD-L1-positive subsets of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Br J Cancer*. 09 2016;115(4):490-6.
332. Valentini AM, Di Pinto F, Coletta S, Guerra V, Armentano R, Caruso ML. Tumor microenvironment immune types in gastric cancer are associated with mismatch repair however, not HER2 status. *Oncol Lett*. août 2019;18(2):1775-85.
333. Murphy G, Pfeiffer R, Camargo MC, Rabkin CS. Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location. *Gastroenterology*. sept 2009;137(3):824-33.
334. Camargo MC, Kim W-H, Chiaravalli AM, Kim K-M, Corvalan AH, Matsuo K, et al. Improved survival of gastric cancer with tumour Epstein-Barr virus positivity: an international pooled analysis. *Gut*. févr 2014;63(2):236-43.
335. Chang M-S, Uozaki H, Chong J-M, Ushiku T, Sakuma K, Ishikawa S, et al. CpG island methylation status in gastric carcinoma with and without infection of Epstein-Barr virus. *Clin Cancer Res*. 15 mai 2006;12(10):2995-3002.
336. Okada T, Nakamura M, Nishikawa J, Sakai K, Zhang Y, Saito M, et al. Identification of genes specifically methylated in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. *Cancer Sci*. oct 2013;104(10):1309-14.
337. Ma J, Li J, Hao Y, Nie Y, Li Z, Qian M, et al. Differentiated tumor immune microenvironment of Epstein-Barr virus-associated and negative gastric cancer: implication in prognosis and immunotherapy. *Oncotarget*. 15 sept 2017;8(40):67094-103.
338. Zhang L, Qiu M, Jin Y, Ji J, Li B, Wang X, et al. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression on gastric cancer and its relationship with clinicopathologic factors. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11084-91.
339. Lauren P. THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. AN ATTEMPT AT A HISTO-CLINICAL CLASSIFICATION. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31-49.
340. Pernot S, Voron T, Perkins G, Lagorce-Pages C, Berger A, Taieb J. Signet-ring cell carcinoma of the stomach: Impact on prognosis and specific therapeutic challenge. *World J Gastroenterol*. 28 oct 2015;21(40):11428-38.
341. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst*. 2 févr 2000;92(3):205-16.
342. Li Z, Lai Y, Sun L, Zhang X, Liu R, Feng G, et al. PD-L1 expression is associated with massive lymphocyte infiltration and histology in gastric cancer. *Hum Pathol*. 2016;55:182-9.
343. Xing X, Guo J, Wen X, Ding G, Li B, Dong B, et al. Analysis of PD1, PDL1, PDL2 expression and T cells infiltration in 1014 gastric cancer patients. *Oncoimmunology*. 2018;7(3):e1356144.
344. Lee HE, Chae SW, Lee YJ, Kim MA, Lee HS, Lee BL, et al. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Br J Cancer*. 18 nov 2008;99(10):1704-11.

345. Arigami T, Uenosono Y, Ishigami S, Matsushita D, Hirahara T, Yanagita S, et al. Decreased density of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes during gastric cancer progression. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014;29(7):1435-41.
346. Gulubova M, Manolova I, Kyurkchiev D, Julianov A, Altunkova I. Decrease in intrahepatic CD56+ lymphocytes in gastric and colorectal cancer patients with liver metastases. *APMIS.* déc 2009;117(12):870-9.
347. Lazăr DC, Avram MF, Romoșan I, Cornianu M, Tăban S, Goldiș A. Prognostic significance of tumor immune microenvironment and immunotherapy: Novel insights and future perspectives in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 28 août 2018;24(32):3583-616.
348. Kang Y-K, Boku N, Satoh T, Ryu M-H, Chao Y, Kato K, et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2 déc 2017;390(10111):2461-71.
349. Fuchs CS, Doi T, Jang RW, Muro K, Satoh T, Machado M, et al. Safety and Efficacy of Pembrolizumab Monotherapy in Patients With Previously Treated Advanced Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer: Phase 2 Clinical KEYNOTE-059 Trial. *JAMA Oncol.* 10 mai 2018;4(5):e180013.
350. Bang Y-J, Kang Y-K, Catenacci DV, Muro K, Fuchs CS, Geva R, et al. Pembrolizumab alone or in combination with chemotherapy as first-line therapy for patients with advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma: results from the phase II nonrandomized KEYNOTE-059 study. *Gastric Cancer.* 2019;22(4):828-37.
351. Shitara K, Özgüroğlu M, Bang Y-J, Di Bartolomeo M, Mandalà M, Ryu M-H, et al. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 14 juill 2018;392(10142):123-33.
352. Bang Y-J, Ruiz EY, Van Cutsem E, Lee K-W, Wyrwicz L, Schenker M, et al. Phase III, randomised trial of avelumab versus physician's choice of chemotherapy as third-line treatment of patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer: primary analysis of JAVELIN Gastric 300. *Ann Oncol.* 01 2018;29(10):2052-60.
353. Janjigian YY, Bendell J, Calvo E, Kim JW, Ascierto PA, Sharma P, et al. CheckMate-032 Study: Efficacy and Safety of Nivolumab and Nivolumab Plus Ipilimumab in Patients With Metastatic Esophagogastric Cancer. *J Clin Oncol.* 1 oct 2018;36(28):2836-44.
354. Kim ST, Cristescu R, Bass AJ, Kim K-M, Odegaard JI, Kim K, et al. Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer. *Nat Med.* sept 2018;24(9):1449-58.
355. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* juin 2003;9(6):669-76.
356. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* févr 1997;18(1):4-25.
357. Pepper MS, Vassalli JD, Orci L, Montesano R. Proteolytic balance and capillary morphogenesis in vitro. *EXS.* 1992;61:137-45.
358. Nicosia RF, Lin YJ, Hazelton D, Qian X. Endogenous regulation of angiogenesis in the rat aorta model. Role of vascular endothelial growth factor. *Am J Pathol.* nov 1997;151(5):1379-86.
359. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 16 déc 1991;181(2):902-6.
360. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol.* déc 1992;153(3):557-62.

361. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* mai 1995;146(5):1029-39.
362. Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci.* juin 1995;108 (Pt 6):2369-79.
363. Cao Y, E G, Wang E, Pal K, Dutta SK, Bar-Sagi D, et al. VEGF exerts an angiogenesis-independent function in cancer cells to promote their malignant progression. *Cancer Res.* 15 août 2012;72(16):3912-8.
364. Hamerlik P, Lathia JD, Rasmussen R, Wu Q, Bartkova J, Lee M, et al. Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. *J Exp Med.* 12 mars 2012;209(3):507-20.
365. Samuel S, Fan F, Dang LH, Xia L, Gaur P, Ellis LM. Intracrine vascular endothelial growth factor signaling in survival and chemoresistance of human colorectal cancer cells. *Oncogene.* 10 mars 2011;30(10):1205-12.
366. Kondo S, Asano M, Matsuo K, Ohmori I, Suzuki H. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients. *Biochim Biophys Acta.* 31 mars 1994;1221(2):211-4.
367. Berger DP, Herbstritt L, Dengler WA, Marmé D, Mertelsmann R, Fiebig HH. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human tumor models of different histologies. *Ann Oncol.* oct 1995;6(8):817-25.
368. Lange T, Guttman-Raviv N, Baruch L, Machluf M, Neufeld G. VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. *J Biol Chem.* 9 mai 2003;278(19):17164-9.
369. Woolard J, Wang W-Y, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, et al. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res.* 1 nov 2004;64(21):7822-35.
370. Cébe Suarez S, Pieren M, Cariolato L, Arn S, Hoffmann U, Bogucki A, et al. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci.* sept 2006;63(17):2067-77.
371. Freeman MR, Schneck FX, Gagnon ML, Corless C, Soker S, Niknejad K, et al. Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res.* 15 sept 1995;55(18):4140-5.
372. Melter M, Reinders ME, Sho M, Pal S, Geehan C, Denton MD, et al. Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood.* 1 déc 2000;96(12):3801-8.
373. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem.* 25 déc 1992;267(36):26031-7.
374. Plouët J, Moro F, Bertagnolli S, Coldeboeuf N, Mazarguil H, Clamens S, et al. Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J Biol Chem.* 16 mai 1997;272(20):13390-6.
375. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell.* déc 1993;4(12):1317-26.
376. Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, Kuniyasu H, Eve BY, Hicklin DJ, et al. Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res.* févr 1999;5(2):257-65.

377. Rak J, Mitsuhashi Y, Sheehan C, Tamir A, Vioria-Petit A, Filmus J, et al. Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res.* 15 janv 2000;60(2):490-8.
378. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci.* sept 2005;109(3):227-41.
379. Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem.* 13 mars 1998;273(11):6417-23.
380. Onesto C, Berra E, Grépin R, Pagès G. Poly(A)-binding protein-interacting protein 2, a strong regulator of vascular endothelial growth factor mRNA. *J Biol Chem.* 13 août 2004;279(33):34217-26.
381. Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell.* 24 août 2007;130(4):691-703.
382. Fuh G, Garcia KC, de Vos AM. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J Biol Chem.* 1 sept 2000;275(35):26690-5.
383. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* 20 mars 1998;92(6):735-45.
384. Whitaker GB, Limberg BJ, Rosenbaum JS. Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF(121). *J Biol Chem.* 6 juill 2001;276(27):25520-31.
385. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, et al. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood.* 1 févr 2001;97(3):785-91.
386. Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med.* août 2002;8(8):841-9.
387. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 6 juill 1995;376(6535):66-70.
388. Kanno S, Oda N, Abe M, Terai Y, Ito M, Shitara K, et al. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene.* 20 avr 2000;19(17):2138-46.
389. Katoh O, Tauchi H, Kawaiishi K, Kimura A, Satow Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res.* 1 déc 1995;55(23):5687-92.
390. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med.* 2 déc 2002;196(11):1497-506.
391. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 6 juill 1995;376(6535):62-6.
392. Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, et al. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 15 mars 2001;20(6):1223-31.
393. Chen L, Hamrah P, Cursiefen C, Zhang Q, Pytowski B, Streilein JW, et al. Vascular

- endothelial growth factor receptor-3 mediates induction of corneal alloimmunity. *Nat Med.* août 2004;10(8):813-5.
394. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol, Cell Physiol.* juin 2001;280(6):C1358-1366.
395. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 4 avr 1996;380(6573):435-9.
396. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature.* 4 avr 1996;380(6573):439-42.
397. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.* juin 1999;5(6):623-8.
398. Fraser HM, Dickson SE, Lunn SF, Wulff C, Morris KD, Carroll VA, et al. Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology.* mars 2000;141(3):995-1000.
399. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med.* déc 2005;9(4):777-94.
400. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med.* 1 févr 1971;133(2):275-88.
401. Fondevila C, Metges JP, Fuster J, Grau JJ, Palacín A, Castells A, et al. p53 and VEGF expression are independent predictors of tumour recurrence and survival following curative resection of gastric cancer. *Br J Cancer.* 12 janv 2004;90(1):206-15.
402. Mineo TC, Ambrogi V, Baldi A, Rabitti C, Bollero P, Vincenzi B, et al. Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol.* juin 2004;57(6):591-7.
403. Tseng P-L, Tai M-H, Huang C-C, Wang C-C, Lin J-W, Hung C-H, et al. Overexpression of VEGF is associated with positive p53 immunostaining in hepatocellular carcinoma (HCC) and adverse outcome of HCC patients. *J Surg Oncol.* 1 oct 2008;98(5):349-57.
404. Yang W, Ahn H, Hinrichs M, Torry RJ, Torry DS. Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *J Reprod Immunol.* oct 2003;60(1):53-60.
405. Cao Y, Ji WR, Qi P, Rosin A, Cao Y. Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun.* 27 juin 1997;235(3):493-8.
406. Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(10):611-25.
407. Mamluk R, Gechtman Z, Kutcher ME, Gasiunas N, Gallagher J, Klagsbrun M. Neuropilin-1 binds vascular endothelial growth factor 165, placenta growth factor-2, and heparin via its b1b2 domain. *J Biol Chem.* 5 juill 2002;277(27):24818-25.
408. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* mai 2001;7(5):575-83.
409. Dewerchin M, Carmeliet P. Placental growth factor in cancer. *Expert Opin Ther Targets.* nov 2014;18(11):1339-54.
410. Adini A, Kornaga T, Firoozbakht F, Benjamin LE. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res.* 15 mai 2002;62(10):2749-52.

411. Eriksson A, Cao R, Pawliuk R, Berg SM, Tsang M, Zhou D, et al. Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer Cell*. févr 2002;1(1):99-108.
412. Xu L, Cochran DM, Tong RT, Winkler F, Kashiwagi S, Jain RK, et al. Placenta growth factor overexpression inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis by depleting vascular endothelial growth factor homodimers in orthotopic mouse models. *Cancer Res*. 15 avr 2006;66(8):3971-7.
413. Apicella I, Cicatiello V, Acampora D, Tarallo V, De Falco S. Full Functional Knockout of Placental Growth Factor by Knockin with an Inactive Variant Able to Heterodimerize with VEGF-A. *Cell Rep*. 19 juin 2018;23(12):3635-46.
414. Schomber T, Kopfstein L, Djonov V, Albrecht I, Baeriswyl V, Strittmatter K, et al. Placental growth factor-1 attenuates vascular endothelial growth factor-A-dependent tumor angiogenesis during beta cell carcinogenesis. *Cancer Res*. 15 nov 2007;67(22):10840-8.
415. Cao Y. Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands. *Sci Signal*. 24 févr 2009;2(59):re1.
416. Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, et al. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell*. 2 nov 2007;131(3):463-75.
417. Chiron M, Bagley RG, Pollard J, Mankoo PK, Henry C, Vincent L, et al. Differential antitumor activity of aflibercept and bevacizumab in patient-derived xenograft models of colorectal cancer. *Mol Cancer Ther*. juin 2014;13(6):1636-44.
418. Gerald D, Chintharlapalli S, Augustin HG, Benjamin LE. Angiopoietin-2: an attractive target for improved antiangiogenic tumor therapy. *Cancer Res*. 15 mars 2013;73(6):1649-57.
419. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mars 2009;10(3):165-77.
420. Cañadas I, Taus Á, Villanueva X, Arpí O, Pijuan L, Rodríguez Y, et al. Angiopoietin-2 is a negative prognostic marker in small cell lung cancer. *Lung Cancer*. nov 2015;90(2):302-6.
421. Murakami M, Simons M. Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Curr Opin Hematol*. mai 2008;15(3):215-20.
422. Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Vajkoczy P, Menger MD. Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. *Hum Reprod*. janv 2006;21(1):262-8.
423. von Tell D, Armulik A, Betsholtz C. Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res*. 10 mars 2006;312(5):623-9.
424. Rosen EM, Lamszus K, Laterra J, Polverini PJ, Rubin JS, Goldberg ID. HGF/SF in angiogenesis. *Ciba Found Symp*. 1997;212:215-26; discussion 227-229.
425. Wojta J, Kaun C, Breuss JM, Koshelnick Y, Beckmann R, Hattey E, et al. Hepatocyte growth factor increases expression of vascular endothelial growth factor and plasminogen activator inhibitor-1 in human keratinocytes and the vascular endothelial growth factor receptor flk-1 in human endothelial cells. *Lab Invest*. avr 1999;79(4):427-38.
426. Dong G, Chen Z, Li ZY, Yeh NT, Bancroft CC, Van Waes C. Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 1 août 2001;61(15):5911-8.
427. Xin X, Yang S, Ingle G, Zlot C, Rangell L, Kowalski J, et al. Hepatocyte growth factor enhances vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Am J Pathol*. mars 2001;158(3):1111-20.

428. Sengupta S, Gherardi E, Sellers LA, Wood JM, Sasisekharan R, Fan T-PD. Hepatocyte growth factor/scatter factor can induce angiogenesis independently of vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1 janv 2003;23(1):69-75.
429. Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, et al. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol.* nov 1992;119(3):629-41.
430. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* juin 2003;3(6):401-10.
431. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 19 mai 2011;473(7347):298-307.
432. Gabrilovich DI, Ishida T, Nadaf S, Ohm JE, Carbone DP. Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clin Cancer Res.* oct 1999;5(10):2963-70.
433. Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res.* mai 2000;6(5):1755-66.
434. Osada T, Chong G, Tansik R, Hong T, Spector N, Kumar R, et al. The effect of anti-VEGF therapy on immature myeloid cell and dendritic cells in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* août 2008;57(8):1115-24.
435. Dikov MM, Ohm JE, Ray N, Tchekneva EE, Burlison J, Moghanaki D, et al. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J Immunol.* 1 janv 2005;174(1):215-22.
436. Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood.* 1 déc 1998;92(11):4150-66.
437. Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP, et al. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol.* 1 févr 1998;160(3):1224-32.
438. Mimura K, Kono K, Takahashi A, Kawaguchi Y, Fujii H. Vascular endothelial growth factor inhibits the function of human mature dendritic cells mediated by VEGF receptor-2. *Cancer Immunol Immunother.* juin 2007;56(6):761-70.
439. Huang Y, Chen X, Dikov MM, Novitskiy SV, Mosse CA, Yang L, et al. Distinct roles of VEGFR-1 and VEGFR-2 in the aberrant hematopoiesis associated with elevated levels of VEGF. *Blood.* 15 juill 2007;110(2):624-31.
440. Nakamura I, Shibata M, Gonda K, Yazawa T, Shimura T, Anazawa T, et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor are increased and correlate with malnutrition, immunosuppression involving MDSCs and systemic inflammation in patients with cancer of the digestive system. *Oncol Lett.* mai 2013;5(5):1682-6.
441. Linde N, Lederle W, Depner S, van Rooijen N, Gutschalk CM, Mueller MM. Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and alternative activation of macrophages. *J Pathol.* mai 2012;227(1):17-28.
442. Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol.* oct 2000;192(2):150-8.
443. Wada J, Suzuki H, Fuchino R, Yamasaki A, Nagai S, Yanai K, et al. The contribution of vascular endothelial growth factor to the induction of regulatory T-cells in malignant effusions. *Anticancer Res.* mars 2009;29(3):881-8.
444. Serafini P, Mgebrouff S, Noonan K, Borrello I. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res.* 1

juill 2008;68(13):5439-49.

445. Ren L, Yu Y, Wang L, Zhu Z, Lu R, Yao Z. Hypoxia-induced CCL28 promotes recruitment of regulatory T cells and tumor growth in liver cancer. *Oncotarget*. 15 nov 2016;7(46):75763-73.
446. Suzuki H, Onishi H, Wada J, Yamasaki A, Tanaka H, Nakano K, et al. VEGFR2 is selectively expressed by FOXP3high CD4+ Treg. *Eur J Immunol*. janv 2010;40(1):197-203.
447. Hansen W. Neuropilin 1 guides regulatory T cells into VEGF-producing melanoma. *Oncoimmunology*. 1 févr 2013;2(2):e23039.
448. Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, Kisseleva E, Parman KS, Nadaf S, et al. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood*. 15 juin 2003;101(12):4878-86.
449. Ohm JE, Carbone DP. VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. *Immunol Res*. 2001;23(2-3):263-72.
450. Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Pernot S, Nizard M, Pointet A-L, et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J Exp Med*. 9 févr 2015;212(2):139-48.
451. De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M, et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell*. sept 2005;8(3):211-26.
452. Coffelt SB, Tal AO, Scholz A, De Palma M, Patel S, Urbich C, et al. Angiopoietin-2 regulates gene expression in TIE2-expressing monocytes and augments their inherent proangiogenic functions. *Cancer Res*. 1 juill 2010;70(13):5270-80.
453. Coffelt SB, Chen Y-Y, Muthana M, Welford AF, Tal AO, Scholz A, et al. Angiopoietin 2 stimulates TIE2-expressing monocytes to suppress T cell activation and to promote regulatory T cell expansion. *J Immunol*. 1 avr 2011;186(7):4183-90.
454. Muramatsu M, Yamamoto S, Osawa T, Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling promotes mobilization of macrophage lineage cells from bone marrow and stimulates solid tumor growth. *Cancer Res*. 15 oct 2010;70(20):8211-21.
455. Rolny C, Mazzone M, Tugues S, Laoui D, Johansson I, Coulon C, et al. HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. *Cancer Cell*. 18 janv 2011;19(1):31-44.
456. Qian B-Z, Zhang H, Li J, He T, Yeo E-J, Soong DYH, et al. FLT1 signaling in metastasis-associated macrophages activates an inflammatory signature that promotes breast cancer metastasis. *J Exp Med*. 24 août 2015;212(9):1433-48.
457. Incio J, Tam J, Rahbari NN, Suboj P, McManus DT, Chin SM, et al. PlGF/VEGFR-1 Signaling Promotes Macrophage Polarization and Accelerated Tumor Progression in Obesity. *Clin Cancer Res*. 15 2016;22(12):2993-3004.
458. Lin Y-L, Liang Y-C, Chiang B-L. Placental growth factor down-regulates type 1 T helper immune response by modulating the function of dendritic cells. *J Leukoc Biol*. déc 2007;82(6):1473-80.
459. Shin J-Y, Yoon I-H, Lim J-H, Shin J-S, Nam H-Y, Kim Y-H, et al. CD4+VEGFR1(HIGH) T cell as a novel Treg subset regulates inflammatory bowel disease in lymphopenic mice. *Cell Mol Immunol*. sept 2015;12(5):592-603.
460. Han S, Feng S, Ren M, Ma E, Wang X, Xu L, et al. Glioma cell-derived placental growth factor induces regulatory B cells. *Int J Biochem Cell Biol*. déc 2014;57:63-8.
461. Albonici L, Giganti MG, Modesti A, Manzari V, Bei R. Multifaceted Role of the Placental Growth Factor (PlGF) in the Antitumor Immune Response and Cancer Progression. *Int J Mol Sci [Internet]*. 18 juin 2019 [cité 3 août 2019];20(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627047/>

462. Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med.* déc 1999;5(12):1359-64.
463. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature.* 29 avr 1993;362(6423):841-4.
464. Millauer B, Longhi MP, Plate KH, Shawver LK, Risau W, Ullrich A, et al. Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo. *Cancer Res.* 1 avr 1996;56(7):1615-20.
465. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 15 oct 1997;57(20):4593-9.
466. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine.* 3 juin 2004;350(23):2335-42.
467. Chow LQM, Eckhardt SG. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol.* 1 mars 2007;25(7):884-96.
468. Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, et al. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet.* 14 oct 2006;368(9544):1329-38.
469. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 5 nov 2015;373(19):1803-13.
470. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* oct 2006;5(10):835-44.
471. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, et al. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine.* 24 juill 2008;359(4):378-90.
472. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 11 janv 2007;356(2):125-34.
473. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 27 déc 2007;357(26):2666-76.
474. Herbst RS, Ansari R, Bustin F, Flynn P, Hart L, Otterson GA, et al. Efficacy of bevacizumab plus erlotinib versus erlotinib alone in advanced non-small-cell lung cancer after failure of standard first-line chemotherapy (BeTa): a double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 28 mai 2011;377(9780):1846-54.
475. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 14 déc 2006;355(24):2542-50.
476. Ishigami SI, Arii S, Furutani M, Niwano M, Harada T, Mizumoto M, et al. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer.* nov 1998;78(10):1379-84.
477. Heinemann V, Weikersthal LF von, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran S-E, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* 1 sept 2014;15(10):1065-75.
478. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology.* 2005;69 Suppl 3:4-10.

479. Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology*. 2005;69 Suppl 3:11-6.
480. Takahashi Y, Tucker SL, Kitadai Y, Koura AN, Bucana CD, Cleary KR, et al. Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Arch Surg*. mai 1997;132(5):541-6.
481. Tokunaga T, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Sadahiro S, Kijima H, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *Br J Cancer*. mars 1998;77(6):998-1002.
482. Choi HJ, Hyun MS, Jung GJ, Kim SS, Hong SH. Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in colorectal carcinoma with special reference to mode of metastasis and recurrence. *Oncology*. déc 1998;55(6):575-81.
483. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest*. avr 1995;95(4):1789-97.
484. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figier A, Wong R, et al. Bevacizumab in Combination With Oxaliplatin-Based Chemotherapy As First-Line Therapy in Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Phase III Study. *JCO*. 20 avr 2008;26(12):2013-9.
485. Passardi A, Nanni O, Tassinari D, Turci D, Cavanna L, Fontana A, et al. Effectiveness of bevacizumab added to standard chemotherapy in metastatic colorectal cancer: final results for first-line treatment from the ITACa randomized clinical trial. *Ann Oncol*. 1 juin 2015;26(6):1201-7.
486. Cunningham D, Lang I, Marcuello E, Lorusso V, Ocvirk J, Shin DB, et al. Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 1 oct 2013;14(11):1077-85.
487. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in Combination With Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin (FOLFOX4) for Previously Treated Metastatic Colorectal Cancer: Results From the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *JCO*. 20 avr 2007;25(12):1539-44.
488. Bennouna J, Borg C, Delord J-P, Hussein F, Trillet-Lenoir V, Faroux R, et al. Bevacizumab combined with chemotherapy in the second-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the phase II BEVACOLOR study. *Clin Colorectal Cancer*. mars 2012;11(1):38-44.
489. Bennouna J, Sastre J, Arnold D, Österlund P, Greil R, Cutsem EV, et al. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 1 janv 2013;14(1):29-37.
490. Tabernero J, Yoshino T, Cohn AL, Obermannova R, Bodoky G, Garcia-Carbonero R, et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol*. mai 2015;16(5):499-508.
491. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausová J, Macarulla T, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol*. 1 oct 2012;30(28):3499-506.
492. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausová J, Macarulla T, et al. Addition of Aflibercept to Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Improves Survival in a Phase III Randomized Trial in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Previously Treated With an Oxaliplatin-Based Regimen. *JCO*. 1 oct 2012;30(28):3499-506.
493. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, et al.

Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 26 janv 2013;381(9863):303-12.

494. Ohtsu A, Shah MA, Van Cutsem E, Rha SY, Sawaki A, Park SR, et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *J Clin Oncol*. 20 oct 2011;29(30):3968-76.

495. Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, Dumitru F, Passalacqua R, Goswami C, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 4 janv 2014;383(9911):31-9.

496. Wilke H, Muro K, Van Cutsem E, Oh S-C, Bodoky G, Shimada Y, et al. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. oct 2014;15(11):1224-35.

497. Catenacci DVT, Tebbutt NC, Davidenko I, Murad AM, Al-Batran S-E, Ilson DH, et al. Rilotumumab plus epirubicin, cisplatin, and capecitabine as first-line therapy in advanced MET-positive gastric or gastro-oesophageal junction cancer (RILOMET-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(11):1467-82.

498. Shah MA, Bang Y-J, Lordick F, Alsina M, Chen M, Hack SP, et al. Effect of Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin With or Without Onartuzumab in HER2-Negative, MET-Positive Gastroesophageal Adenocarcinoma: The METGastric Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 1 mai 2017;3(5):620-7.

499. Yoon HH, Bendell JC, Braiteh FS, Firdaus I, Philip PA, Cohn AL, et al. Ramucirumab combined with FOLFOX as front-line therapy for advanced esophageal, gastroesophageal junction, or gastric adenocarcinoma: a randomized, double-blind, multicenter Phase II trial. *Ann Oncol*. 2016;27(12):2196-203.

500. Malka D, François E, Penault-Llorca F, Castan F, Bouché O, Bennouna J, et al. FOLFOX alone or combined with rilotumumab or panitumumab as first-line treatment for patients with advanced gastroesophageal adenocarcinoma (PRODIGE 17-ACCORD 20-MEGA): a randomised, open-label, three-arm phase II trial. *Eur J Cancer*. juill 2019;115:97-106.

501. Alfaro C, Suarez N, Gonzalez A, Solano S, Erro L, Dubrot J, et al. Influence of bevacizumab, sunitinib and sorafenib as single agents or in combination on the inhibitory effects of VEGF on human dendritic cell differentiation from monocytes. *Br J Cancer*. 7 avr 2009;100(7):1111-9.

502. Xin H, Zhang C, Herrmann A, Du Y, Figlin R, Yu H. Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res*. 15 mars 2009;69(6):2506-13.

503. Draghiciu O, Nijman HW, Hoogeboom BN, Meijerhof T, Daemen T. Sunitinib depletes myeloid-derived suppressor cells and synergizes with a cancer vaccine to enhance antigen-specific immune responses and tumor eradication. *Oncoimmunology*. mars 2015;4(3):e989764.

504. Ozao-Choy J, Ma G, Kao J, Wang GX, Meseck M, Sung M, et al. The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res*. 15 mars 2009;69(6):2514-22.

505. Ko JS, Rayman P, Ireland J, Swaidani S, Li G, Bunting KD, et al. Direct and differential suppression of myeloid-derived suppressor cell subsets by sunitinib is compartmentally constrained. *Cancer Res*. 1 mai 2010;70(9):3526-36.

506. Cao M, Xu Y, Youn J, Cabrera R, Zhang X, Gabrilovich D, et al. Kinase inhibitor Sorafenib modulates immunosuppressive cell populations in a murine liver cancer model. *Lab Invest.* avr 2011;91(4):598-608.
507. Kusmartsev S, Su Z, Heiser A, Dannull J, Eruslanov E, Kübler H, et al. Reversal of myeloid cell-mediated immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 15 déc 2008;14(24):8270-8.
508. Kujawski M, Zhang C, Herrmann A, Reckamp K, Scuto A, Jensen M, et al. Targeting STAT3 in adoptively transferred T cells promotes their in vivo expansion and antitumor effects. *Cancer Res.* 1 déc 2010;70(23):9599-610.
509. Chen M-L, Yan B-S, Lu W-C, Chen M-H, Yu S-L, Yang P-C, et al. Sorafenib relieves cell-intrinsic and cell-extrinsic inhibitions of effector T cells in tumor microenvironment to augment antitumor immunity. *Int J Cancer.* 15 janv 2014;134(2):319-31.
510. Shrimali RK, Yu Z, Theoret MR, Chinnasamy D, Restifo NP, Rosenberg SA. Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res.* 1 août 2010;70(15):6171-80.
511. Manning EA, Ullman JGM, Leatherman JM, Asquith JM, Hansen TR, Armstrong TD, et al. A vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitor enhances antitumor immunity through an immune-based mechanism. *Clin Cancer Res.* 1 juill 2007;13(13):3951-9.
512. Dirx AEM, oude Egbrink MGA, Castermans K, van der Schaft DWJ, Thijssen VLJL, Dings RPM, et al. Anti-angiogenesis therapy can overcome endothelial cell anergy and promote leukocyte-endothelium interactions and infiltration in tumors. *FASEB J.* avr 2006;20(6):621-30.
513. Zhao W, Gu YH, Song R, Qu BQ, Xu Q. Sorafenib inhibits activation of human peripheral blood T cells by targeting LCK phosphorylation. *Leukemia.* juin 2008;22(6):1226-33.
514. Ko JS, Zea AH, Rini BI, Ireland JL, Elson P, Cohen P, et al. Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res.* 15 mars 2009;15(6):2148-57.
515. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, et al. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res.* 15 févr 2009;69(4):1553-60.
516. Busse A, Asemisen AM, Nonnenmacher A, Braun F, Ochsenreither S, Stather D, et al. Immunomodulatory effects of sorafenib on peripheral immune effector cells in metastatic renal cell carcinoma. *Eur J Cancer.* mars 2011;47(5):690-6.
517. Desai IME, Jacobs JHFM, Hulsbergen-vandeKaa CA, Oyen WJG, Mulders PFA, van der Graaf WTA, et al. Sorafenib reduces the percentage of tumour infiltrating regulatory T cells in renal cell carcinoma patients. *Int J Cancer.* 15 juill 2011;129(2):507-12.
518. Nagai H, Mukozu T, Matsui D, Kanekawa T, Kanayama M, Wakui N, et al. Sorafenib prevents escape from host immunity in liver cirrhosis patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:607851.
519. Molhoek KR, McSkimming CC, Olson WC, Brautigian DL, Slingluff CL. Apoptosis of CD4(+)CD25(high) T cells in response to Sirolimus requires activation of T cell receptor and is modulated by IL-2. *Cancer Immunol Immunother.* juin 2009;58(6):867-76.
520. Finke JH, Rini B, Ireland J, Rayman P, Richmond A, Golshayan A, et al. Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res.* 15 oct 2008;14(20):6674-82.
521. Adotevi O, Pere H, Ravel P, Haicheur N, Badoual C, Merillon N, et al. A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. *J Immunother.* déc 2010;33(9):991-8.
522. Manzoni M, Rovati B, Ronzoni M, Loupakis F, Mariucci S, Ricci V, et al.

Immunological Effects of Bevacizumab-Based Treatment in Metastatic Colorectal Cancer. *OCL*. 2010;79(3-4):187-96.

523. Tsavaris N, Voutsas IF, Kosmas C, Gritzapis AD, Baxevanis CN. Combined treatment with bevacizumab and standard chemotherapy restores abnormal immune parameters in advanced colorectal cancer patients. *Invest New Drugs*. févr 2012;30(1):395-402.

524. Huang K-W, Wu H-L, Lin H-L, Liang P-C, Chen P-J, Chen S-H, et al. Combining antiangiogenic therapy with immunotherapy exerts better therapeutical effects on large tumors in a woodchuck hepatoma model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 17 août 2010;107(33):14769-74.

525. Huang Y, Yuan J, Righi E, Kamoun WS, Ancukiewicz M, Nezivar J, et al. Vascular normalizing doses of antiangiogenic treatment reprogram the immunosuppressive tumor microenvironment and enhance immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 23 oct 2012;109(43):17561-6.

526. Huang X, Wong MK, Yi H, Watkins S, Laird AD, Wolf SF, et al. Combined therapy of local and metastatic 4T1 breast tumor in mice using SU6668, an inhibitor of angiogenic receptor tyrosine kinases, and the immunostimulator B7.2-IgG fusion protein. *Cancer Res*. 15 oct 2002;62(20):5727-35.

527. Farsaci B, Higgins JP, Hodge JW. Consequence of dose scheduling of sunitinib on host immune response elements and vaccine combination therapy. *Int J Cancer*. 15 avr 2012;130(8):1948-59.

528. Foy KC, Miller MJ, Moldovan N, Carson WE, Kaumaya PTP. Combined vaccination with HER-2 peptide followed by therapy with VEGF peptide mimics exerts effective anti-tumor and anti-angiogenic effects in vitro and in vivo. *Oncoimmunology*. 1 oct 2012;1(7):1048-60.

529. Fukumura D, Kloepper J, Amoozgar Z, Duda DG, Jain RK. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(5):325-40.

530. Li B, Lalani AS, Harding TC, Luan B, Koprivnikar K, Huan Tu G, et al. Vascular endothelial growth factor blockade reduces intratumoral regulatory T cells and enhances the efficacy of a GM-CSF-secreting cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 15 nov 2006;12(22):6808-16.

531. Jaini R, Rayman P, Cohen PA, Finke JH, Tuohy VK. Combination of sunitinib with anti-tumor vaccination inhibits T cell priming and requires careful scheduling to achieve productive immunotherapy. *Int J Cancer*. 1 avr 2014;134(7):1695-705.

532. Bose A, Taylor JL, Alber S, Watkins SC, Garcia JA, Rini BI, et al. Sunitinib facilitates the activation and recruitment of therapeutic anti-tumor immunity in concert with specific vaccination. *Int J Cancer*. 1 nov 2011;129(9):2158-70.

533. Wang W, Ma Y, Li J, Shi H-S, Wang L-Q, Guo F-C, et al. Specificity redirection by CAR with human VEGFR-1 affinity endows T lymphocytes with tumor-killing ability and anti-angiogenic potency. *Gene Ther*. oct 2013;20(10):970-8.

534. Schmittnaegel M, Rigamonti N, Kadioglu E, Cassarà A, Wyser Rmili C, Kiialainen A, et al. Dual angiopoietin-2 and VEGFA inhibition elicits antitumor immunity that is enhanced by PD-1 checkpoint blockade. *Sci Transl Med*. 12 2017;9(385).

535. Yasuda S, Sho M, Yamato I, Yoshiji H, Wakatsuki K, Nishiwada S, et al. Simultaneous blockade of programmed death 1 and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) induces synergistic anti-tumour effect in vivo. *Clin Exp Immunol*. juin 2013;172(3):500-6.

536. Allen E, Jabouille A, Rivera LB, Lodewijckx I, Missiaen R, Steri V, et al. Combined antiangiogenic and anti-PD-L1 therapy stimulates tumor immunity through HEV formation. *Sci Transl Med*. 12 2017;9(385).

537. Wu FTH, Man S, Xu P, Chow A, Paez-Ribes M, Lee CR, et al. Efficacy of

- Cotargeting Angiopoietin-2 and the VEGF Pathway in the Adjuvant Postsurgical Setting for Early Breast, Colorectal, and Renal Cancers. *Cancer Res.* 01 2016;76(23):6988-7000.
538. Hodi FS, Lawrence D, Lezcano C, Wu X, Zhou J, Sasada T, et al. Bevacizumab plus ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *Cancer Immunol Res.* juill 2014;2(7):632-42.
539. McDermott DF, Huseni MA, Atkins MB, Motzer RJ, Rini BI, Escudier B, et al. Clinical activity and molecular correlates of response to atezolizumab alone or in combination with bevacizumab versus sunitinib in renal cell carcinoma. *Nat Med.* 2018;24(6):749-57.
540. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med.* 14 juin 2018;378(24):2288-301.
541. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 21 2019;380(12):1116-27.
542. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, et al. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 21 2019;380(12):1103-15.
543. Amin A, Plimack ER, Ernstoff MS, Lewis LD, Bauer TM, McDermott DF, et al. Safety and efficacy of nivolumab in combination with sunitinib or pazopanib in advanced or metastatic renal cell carcinoma: the CheckMate 016 study. *J Immunother Cancer.* 22 2018;6(1):109.
544. Xu J, Zhang Y, Jia R, Yue C, Chang L, Liu R, et al. Anti-PD-1 Antibody SHR-1210 Combined with Apatinib for Advanced Hepatocellular Carcinoma, Gastric, or Esophagogastric Junction Cancer: An Open-label, Dose Escalation and Expansion Study. *Clin Cancer Res.* 15 janv 2019;25(2):515-23.
545. Ikeda M, Sung MW, Kudo M, Kobayashi M, Baron AD, Finn RS, et al. A phase 1b trial of lenvatinib (LEN) plus pembrolizumab (PEM) in patients (pts) with unresectable hepatocellular carcinoma (uHCC). *JCO.* 20 mai 2018;36(15_suppl):4076-4076.
546. Schmoll H-J, Arnold D, de Gramont A, Ducreux M, Grothey A, O'Dwyer PJ, et al. MODUL-a multicenter randomized clinical trial of biomarker-driven maintenance therapy following first-line standard induction treatment of metastatic colorectal cancer: an adaptable signal-seeking approach. *J Cancer Res Clin Oncol.* juin 2018;144(6):1197-204.
547. Kopetz S, Hoff PM, Morris JS, Wolff RA, Eng C, Glover KY, et al. Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J Clin Oncol.* 20 janv 2010;28(3):453-9.
548. Terme M, Pernot S, Marcheteau E, Sandoval F, Benhamouda N, Colussi O, et al. VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Res.* 15 janv 2013;73(2):539-49.
549. Pernot S, Badoual C, Terme M, Castan F, Cazes A, Bouche O, et al. Dynamic evaluation of circulating tumour cells in patients with advanced gastric and oesogastric junction adenocarcinoma: Prognostic value and early assessment of therapeutic effects. *Eur J Cancer.* 2017;79:15-22.
550. Lee JS, Won HS, Sun DS, Hong JH, Ko YH. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 10 août 2018 [cité 7 oct 2019];97(32). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6133557/>
551. Yeh C-C, Shih L-J, Chang J-L, Tsuei Y-W, Wu C-C, Hsiao C-W, et al. Synchronous vascular endothelial growth factor protein profiles in both tissue and serum identify metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Sci Rep.* 12 mars 2019;9(1):4228.
552. Kong JC, Guerra GR, Pham T, Mitchell C, Lynch AC, Warriar SK, et al. Prognostic

- Impact of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Primary and Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diseases of the Colon & Rectum*. avr 2019;62(4):498.
553. Halama N, Michel S, Kloor M, Zoernig I, Benner A, Spille A, et al. Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. *Cancer Res*. 1 sept 2011;71(17):5670-7.
554. Remark R, Alifano M, Cremer I, Lupo A, Dieu-Nosjean M-C, Riquet M, et al. Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. *Clin Cancer Res*. 1 août 2013;19(15):4079-91.
555. Nakagawa K, Tanaka K, Homma Y, Nojiri K, Kumamoto T, Takeda K, et al. Low infiltration of peritumoral regulatory T cells predicts worse outcome following resection of colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol*. janv 2015;22(1):180-6.
556. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer*. 1 févr 2000;88(3):577-83.
557. Rosso D, Rigueiro MP, Kassab P, Ilias EJ, Castro OAP, Novo NF, et al. [Correlation of natural killer cells with the prognosis of gastric adenocarcinoma]. *Arq Bras Cir Dig*. juin 2012;25(2):114-7.
558. Suzuki H, Onishi H, Morisaki T, Tanaka M, Katano M. Intratumoral FOXP3+VEGFR2+ regulatory T cells are predictive markers for recurrence and survival in patients with colorectal cancer. *Clin Immunol*. janv 2013;146(1):26-33.
559. Enamorado M, Iborra S, Priego E, Cueto FJ, Quintana JA, Martínez-Cano S, et al. Enhanced anti-tumour immunity requires the interplay between resident and circulating memory CD8+ T cells. *Nat Commun*. 17 2017;8:16073.
560. Roselli M, Formica V, Cereda V, Jochems C, Richards J, Grenga I, et al. The association of clinical outcome and peripheral T-cell subsets in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line FOLFIRI plus bevacizumab therapy. *Oncoimmunology*. juill 2016;5(7):e1188243.
561. Ye L, Zhang F, Li H, Yang L, Lv T, Gu W, et al. Circulating Tumor Cells Were Associated with the Number of T Lymphocyte Subsets and NK Cells in Peripheral Blood in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Dis Markers* [Internet]. 2017 [cité 8 oct 2019];2017. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5757144/>
562. Mego M, Gao H, Cohen EN, Anfossi S, Giordano A, Sanda T, et al. Circulating Tumor Cells (CTC) Are Associated with Defects in Adaptive Immunity in Patients with Inflammatory Breast Cancer. *J Cancer*. 2016;7(9):1095-104.
563. Xue D, Xia T, Wang J, Chong M, Wang S, Zhang C. Role of regulatory T cells and CD8+ T lymphocytes in the dissemination of circulating tumor cells in primary invasive breast cancer. *Oncol Lett*. sept 2018;16(3):3045-53.
564. Leone K, Poggiana C, Zamarchi R. The Interplay between Circulating Tumor Cells and the Immune System: From Immune Escape to Cancer Immunotherapy. *Diagnostics* (Basel). 30 août 2018;8(3).
565. Hindryckx P, Waeytens A, Laukens D, Peeters H, Van Huysse J, Ferdinande L, et al. Absence of placental growth factor blocks dextran sodium sulfate-induced colonic mucosal angiogenesis, increases mucosal hypoxia and aggravates acute colonic injury. *Lab Invest*. avr 2010;90(4):566-76.
566. Badalamenti G, Fanale D, Incorvaia L, Barraco N, Listì A, Maragliano R, et al. Role of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with solid tumors: Can a drop dig a stone? *Cell Immunol*. sept 2019;343:103753.
567. Saleh R, Elkord E. Treg-mediated acquired resistance to immune checkpoint inhibitors. *Cancer Letters*. 10 août 2019;457:168-79.

568. Malka D, Castan F, Francois E, Bouche O, Bennouna J, Ghiringhelli F, et al. FOLFOX alone or combined to rilotumumab or panitumumab as first-line treatment in patients (pts) with advanced gastroesophageal adenocarcinoma (AGEA): An open-label, randomized phase II trial (PRODIGE 17 ACCORD 20 MEGA). JCO. 20 mai 2015;33(15_suppl):4013-4013.

Table des matières

REMERCIEMENTS	4
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	6
SOMMAIRE	7
INTRODUCTION.....	9
CHAPITRE 1 : IMMUNITE ET CANCER	9
1- LE CONCEPT D'IMMUNOSURVEILLANCE	9
2- LES PRINCIPAUX ACTEURS DE LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE	10
2.1- Les cellules Natural Killer	10
2.2- Les macrophages.....	11
2.3- Les lymphocytes non conventionnels	12
3- LES ACTEURS DE LA REPONSE IMMUNITAIRE ACQUISE	13
3.1- Les cellules dendritiques.....	13
3.2- Les lymphocytes B.....	14
3.3- Les lymphocytes T CD4 ⁺	14
3.3.1 Généralités sur les LT CD4 ⁺	14
3.3.2-La polarisation des LT CD4 ⁺	15
LT CD4 ⁺ Th1	15
Les LT CD4 ⁺ Th2	15
Les LT CD4 ⁺ Th17	16
3.4- Les lymphocytes T CD8 ⁺ ou LT cytotoxiques (CTL)	17
3.5- Les antigènes associés aux tumeurs (Tumor associated antigens, TAA)	18
4- MECANISMES D'ÉCHAPPEMENT IMMUNITAIRE	18
4.1-Mécanismes intrinsèques à la cellule tumorale.....	18
4.1.1 Régulation négative de l'expression du CMH de classe I.....	18
Altérations structurelles du CMH I	19
Régulation épigénétique du CMH I	19
Impact de la perte d'expression du CMH I	19
Impact pronostic	19
Impact thérapeutique	20
4.1.2 Autres mécanismes d'échappement intrinsèques à la cellule tumorale	20
4.2 - Les mécanismes extrinsèques à la cellule tumorale.....	21
4.2.1 - Les Lymphocytes T régulateurs.....	21
4.2.1.1- Ontogénie des Treg	23

Développement des Treg thymiques dans le thymus	23
Induction de Treg en périphérie	24
4.2.1.2- Fonctions suppressives des Treg	25
4.2.1.3- Les sous populations de Treg	27
Les Treg Naïfs	28
Les Treg effecteurs	28
La polarisation des Treg	29
Les Treg Th-1 like	30
Les Treg Th2-like	30
Les Treg Th-17-like et Th-22 like	31
Spécificités fonctionnelles des différentes sous-population	31
Plasticité des différentes sous-population	32
4.2.1.4- Treg et cancer	32
Origine des Treg intratumoraux	33
Régulation des Treg dans le cancer	34
Rôle pronostic des Treg dans le cancer	36
4.2.2- Myeloid-derived suppressor cells (MDSC)	36
4.2.2.1- Induction des MDSC	37
4.2.2.2- Caractérisation phénotypique des MDSC	38
4.2.2.3- Fonctions immunosuppressives des MDSC	38
4.2.2.4- Rôle des MDSC dans le cancer	39
4.2.3- Autres cellules régulatrices	39
4.2.4- Régulation positive des molécules co-inhibitrices et épuisement des LT	39
Les récepteurs co-inhibiteurs	40
Expression des ligands des récepteurs co-inhibiteurs	40
L'épuisement des cellules T	40
5- LES BASES DE L'IMMUNOTHERAPIE ANTICANCEREUSE	42
5.1 - Immunothérapie passive	42
5.1.1 Les anticorps monoclonaux	42
5.1.2 L'immunothérapie cellulaire	43
5.2- Immunothérapie active	44
5.2.1 L'immunothérapie active spécifique : les vaccins	44
5.2.2 L'immunothérapie non spécifique	44
Les immunomodulateurs	44
Les inhibiteurs de checkpoint immunitaires	44
CHAPITRE 2 : IMMUNITE ET CANCERS DIGESTIFS	46
1- SPECIFICITE DE L'IMMUNITE DANS LE CANCER COLORECTAL	46
1.1- Les TAA dans le cancer colorectal	46

L'instabilité microsatellite dans le CCR est associée à des TAA immunogéniques	46
Les mutations POLE sont associées à des TAA immunogéniques	48
1.2- Rôle pronostic des cellules immunitaires dans le CCR	48
Lymphocytes infiltrant la tumeur CD8 ⁺ et CD45RO ⁺	48
Autres cellules immunitaires infiltrantes.....	49
Utilisation des cellules circulantes comme marqueur pronostic	50
2- PRINCIPAUX RESULTATS DE L'IMMUNOTHERAPIE DANS LE CANCER COLORECTAL.....	51
2.1- Inhibiteurs des Checkpoint Immunitaires dans les CCR MSI/dMMR	51
2.2- Inhibiteurs des Checkpoint immunitaires dans les CCR MSS/pMMR.....	52
2.3- Autres stratégies d'immunothérapie dans les CCR	53
4- SPECIFICITE DE L'IMMUNITE DANS LE CANCER GASTRIQUE	54
4.1- Classification moléculaire et sous-types immunogènes	54
Les cancers gastriques MSI/dMMR	55
Les cancers gastriques EBV	55
4.2- Classification histologique et immunité.....	56
4.3- Infiltrat immunitaire et pronostic dans le CG	57
5- PRINCIPAUX RESULTATS DE L'IMMUNOTHERAPIE DANS LE CANCER GASTRIQUE.....	58
Anti-PD1/Anti-PD-L1	58
Combinaison anti-PD1/anti-CTLA-4	59
MSI/dMMR et EBV sont prédictifs d'efficacité des ICI	59
CHAPITRE 3 : ANGIOGENESE ET IMMUNITE	60
1- L'ANGIOGENESE.....	60
1.1-Angiogenèse physiologique et angiogenèse tumorale	60
1.2 - Axe VEGF-A/ VEGFR	62
La famille du VEGF	62
Le VEGF-A	62
Les isoformes du VEGF-A et leurs particularités	63
Production de VEGF-A	63
Les récepteurs du VEGF (VEGFR)	64
Rôles physiologiques du VEGFA	65
Rôles pathologiques du VEGF-A.....	65
1.3-Les axes alternatifs de l'angiogenèse.....	66
PlGF/VEGFR-1	66
Angiopoïétine 1 et 2	68
Le Fibroblast Growth Factor	68
Platelet Derivative Growth Factor.....	68
Hepatocyte Growth Factor	69
1.4-Synthèse : Le processus d'angiogenèse tumorale	69

2-EFFETS IMMUNITAIRES DES FACTEURS DE L'ANGIOGENESE.....	71
2.1-Effet du VEGF sur le microenvironnement tumoral.....	71
Inhibition de la maturation des cellules dendritiques.....	71
Accumulation de MDSC	72
Développement de macrophages induits par la tumeur	72
Accumulation de Treg.....	72
Inhibition des Cellules T effectrices.....	73
2.2-Effets immunitaires des autres facteurs pro-angiogéniques.....	73
Angiopoietine 2 et immunité.....	73
Effet du PlGF sur l'immunité anti-tumorale	73
3 -LES ANTI-ANGIOGENIQUES DANS LES CANCERS DIGESTIFS	75
3.1- Les traitements anti-angiogéniques : généralités	75
3.2- Anti-angiogéniques et cancer colorectal.....	77
3.3-Anti-angiogéniques et cancers gastriques	78
4- EFFETS IMMUNOMODULATEURS DES ANTI-ANGIOGENIQUES DANS LES MODELES PRECLINIQUES.....	79
4.1- Maturation des cellules dendritiques.....	79
4.2- Diminution des MDSC	79
4.3- Diminution des Treg	79
4.4- Cellules T effectrices	80
5- EFFETS IMMUNOMODULATEURS DES ANTI-ANGIOGENIQUES CHEZ L'HOMME.....	81
5.1- Maturation des DC	81
5.2- Diminution des MDSC	81
5.3- Diminution des Treg	81
5.4- Cellules T effectrices et réponses effectrices.....	82
6-COMBINAISON IMMUNOTHERAPIES/ANTI-ANGIOGENIQUES.....	83
6.1- Données précliniques	83
Anti-angiogéniques et vaccins	83
Anti-angiogéniques et thérapie cellulaire.....	83
Anti-angiogéniques et inhibiteur des checkpoint immunitaires.....	84
6.2- Données cliniques	86
Combinaison anti-CTLA-4 et anti-angiogéniques	86
Combinaison PD-1/PD-L1 et anti-angiogénique	86
Cancers non colorectaux	86
Cancers colorectaux MSS/pMMR	87
<u>OBJECTIFS DE LA THESE</u>	89
<u>RESULTATS.....</u>	91

PARTIE I : MECANISMES REGULATEURS INDUITS PAR LE VEGF ET LES ANTI-VEGF DANS LE CANCER COLORECTAL	91
I.1 Mécanisme de régulation directe des Treg par la voie VEGF-A/VEGFR-2 et les anti-VEGF-A	91
Article 1	91
I.2 Étude de la modulation des Treg et en particulier des Treg Th1-like par l'aflibercept ciblant le VEGF-A mais aussi le PlGF.	106
PARTIE II : ÉTUDE DE L'IMPACT CLINIQUE DE L'INFILTRAT IMMUNITAIRE ET DES CELLULES IMMUNITAIRES CIRCULANTES DANS LE CANCER GASTRIQUE AVANCE.	120
Article 2: Infiltrating and peripheral immune cell analysis in advanced gastric cancer according to the Lauren classification and its prognostic significance ..	120
Supplemental material.....	133
<u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>	145
1. La valeur pronostique des cellules immunitaires infiltrantes est-elle reproductible ?	145
LT CD8 infiltrants ⁺	145
Les NK infiltrant la tumeur	146
Les Treg intratumoraux	147
2. Les cellules immunitaires circulantes ont-elles un impact clinique différent de celui des cellules immunitaires infiltrant la tumeur ?	148
3. Quel est l'impact des effets immunomodulateurs des anti-angiogéniques sur la réponse anti-tumorale ?	149
Les Treg modulés par l'axe VEGF-A/VEGFR2 ont-ils un phénotype et une fonction spécifique ?	150
Quel est l'impact de la modulation des Treg sur la réponse effectrice, et en particulier la réponse Th1 ?	151
La baisse des Treg elle prédictive de l'efficacité ou de la toxicité des anti-angiogéniques (bevacizumab ou aflibercept)?	151
4. D'autres voies de l'angiogenèse peuvent-elles participer à la modulation des Treg	153
Le PlGF peut-il moduler l'effet de la voie VEGF-A/VEGFR sur les Treg	153
La voie HGF/c-Met peut-elle moduler les Treg, et par quel mécanisme	154
5. Nos résultats peuvent-ils permettre une meilleure sélection des patients candidats à l'immunothérapie dans le CCR et le CG.....	155
6. Nos résultats peuvent-ils fournir des pistes d'optimisation des stratégies d'immunothérapies.....	156
Intégration de cet effet dans des combinaisons AA + immunothérapie : un challenge non résolu dans le CCR pMMR.....	156
Au-delà des combinaisons AA/ICI, d'autres stratégies doivent être explorées dans les tumeurs ignorées par le système immunitaire.....	157
<u>CONCLUSION GENERALE.....</u>	158

<u>ANNEXES</u>	<u>160</u>
Annexe 1 : Voron et al. J Exp Med 2015	160
Annexe 2 : Palle et al. JFHOD 2018	171
Annexe 3 : Hirsch et al. ESMO 2018.....	173
Annexe 4 : Pernot et al. Eur J Cancer 2017	175
Annexe 5 : Pointet et al. JFHOD 2015.....	184
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>186</u>
<u>TABLE DES MATIERES</u>	<u>221</u>
<u>TABLE DES ILLUSTRATIONS</u>	<u>227</u>

Table des illustrations

Figure 1. Effets pro et anti-tumoraux des Th17	17
Figure 2 : Fonctions suppressives des Treg	27
Figure 3. Différentiation des Treg.....	29
Figure 5 : Origine des Treg intratumoraux.....	34
Figure 6 : régulation des Treg dans les cancers	35
Figure 7 : Induction et fonctions des MDSC.....	37
Figure 8: Principaux mécanismes d'échappement immunitaires.....	41
Figure 9 : Mécanismes d'actions des inhibiteurs de checkpoint immunitaires.....	45
Figure 10 : Microenvironnement tumoral dans les tumeurs MSI/dMMR et MSS/pMMR.....	48
Figure 12 : Balance entre facteurs pro- et anti-angiogéniques dans le cancer	61
Figure 13 : Interactions entre PlGF/VEGFR-1 et VEGF-A/VEGFR-2	67
Figure 14: le processus d'angiogenèse.....	71
<i>Figure 15 : effets immunologiques du PlGF</i>	<i>75</i>
Figure 16 : Effets immunomodulateurs du VEGF-A	82
Figure 17 : L'aflibercept diminue les Treg	111
Figure 18 : Les Treg effecteurs et Th1-like sont augmentés dans le CCR chez la souris.....	112
Figure 20 : Les Treg effecteurs et Th1-like sont augmentés dans les PBMC de patients atteints de CCRm.....	117
Figure 21 : Les Treg effecteurs et le ratio Th1-like/Th1 est diminué sous aflibercept dans les PBMC de patients atteints de CCRm	118

