



**HAL**  
open science

# Identification de nouvelles cibles potentielles impliquées dans l'immunomodulation tumorale

Nicolas Aubert

► **To cite this version:**

Nicolas Aubert. Identification de nouvelles cibles potentielles impliquées dans l'immunomodulation tumorale. Immunologie. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS499 . tel-04290721

**HAL Id: tel-04290721**

**<https://theses.hal.science/tel-04290721>**

Submitted on 17 Nov 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.

# Sorbonne Université

Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (UMRS SU – Inserm U1135 – CNRS EMR  
8255) / Immunoregulation and Therapy in Autoimmunity and Cancer

## Identification de nouvelles cibles potentielles impliquées dans l'immunomodulation tumorale

Rôle de l'expression tumorale des molécules de co-stimulation HVEM,  
ICOS-L et 4-1BBL sur la réponse immunitaire effectrice et régulatrice :  
mécanismes et implications thérapeutiques

Par Nicolas Aubert

Thèse de Doctorat d'Immunologie

Dirigée par le Dr Gilles Marodon

Présentée et soutenue publiquement le 16 novembre 2022

Devant un jury composé de :

**CREMER Isabelle** (*Professeure d'université, Sorbonne Université, CRC Paris*) : Présidente

**CAUX Christophe** (*Directeur de recherche, Inserm, CRCL Lyon*) : Rapporteur

**MARTINET Ludovic** (*Directeur de recherche, Inserm, CRCT Toulouse*) : Rapporteur

**LABARRIERE Nathalie** (*Directrice de recherche, Inserm, INCIT Nantes*) : Examinatrice

**DIEU-NOSJEAN Marie Caroline** (*Directrice de recherche, Inserm, CIMI Paris*) : Examinatrice

**MARODON Gilles** (*Chargé de recherche, Inserm, CIMI Paris*) : Directeur de thèse

# Table des matières

Liste des abréviations .....	4
Introduction .....	6
I) Cancers, oncogenèse et immunité .....	7
a) Les cancers .....	7
1) Epidémiologie .....	7
2) Caractéristiques du cancer.....	7
b) La réponse immunitaire antitumorale.....	12
1) Concept d'immunosurveillance.....	12
2) De l'immunosurveillance à l'apparition du cancer : les 3E .....	13
Elimination .....	14
Equilibre .....	16
Evasion .....	16
3) Impact de la réponse immunitaire sur le pronostic.....	21
II) Thérapies du cancer et modulation de la réponse immunitaire antitumorale.....	24
a) Les stratégies « conventionnelles » .....	25
1) La chirurgie .....	25
2) La radiothérapie.....	25
3) La chimiothérapie.....	25
b) Les immunothérapies .....	27
1) Historique .....	27
2) Les cytokines.....	28
3) Les virus oncolytiques.....	29
4) La vaccination antitumorale .....	29
5) Les thérapies par transfert adoptif de lymphocytes T (ACT).....	30
6) Les anticorps monoclonaux.....	33
Généralités.....	33
Anticorps à action primaire sur le développement tumoral .....	36
Les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (« immune checkpoint blockade ») .....	37
Anticorps agonistes des cellules effectrices cytotoxiques.....	46
Modulation des cellules régulatrices pour stimuler la réponse antitumorale .....	46
III) Principes expérimentaux et objectifs du projet .....	50
a) La souris humanisée comme modèle d'étude de l'immunité antitumorale.....	50

b) Hypothèses de travail .....	53
Ciblage d’HVEM pour l’immunothérapie du cancer .....	54
Rôle de ligands tumoraux dans la modulation de la réponse antitumorale .....	54
Résultats .....	55
I) Etude d’un anticorps monoclonal ciblant HVEM dans un modèle de cancer de la prostate en souris humanisée (Article publié) .....	56
II) Etude de l’impact de l’expression par la tumeur de ligands de molécules exprimées par les Treg sur la réponse immunitaire antitumorale .....	79
a) Rôle d’ICOS-L exprimé par la tumeur dans un modèle de souris humanisée (Article en préparation) .....	79
b) Rôle de 4-1BB-L exprimé par la tumeur dans un modèle murin (Résultats préliminaires) .....	92
Discussion & Perspectives .....	96
Conclusion.....	105
Bibliographie.....	107
Annexes.....	157
Liste des figures .....	164
Liste des tables .....	165



## Liste des abréviations

ADCC	<i>Antibody dependant cell cytotoxicity</i> – Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
ADCP	<i>Antibody dependent cell phagocytosis</i> – Phagocytose dépendante des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine biphosphate
AMP	Adénosine monophosphate
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BTLA	<i>B and T lymphocyte attenuator</i>
CAF	<i>Cancer-associated fibroblast</i> – Fibroblastes associés aux tumeurs
CAR-T	<i>Chimeric antigen receptor T-cells</i> – Lymphocytes T avec un TCR chimérique
CDC	<i>Complement dependent cytotoxicity</i> – Cytotoxicité dépendant du complément
CDR	<i>Complementarity-determining region</i> – Régions déterminant la complémentarité
NK	<i>natural killer</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4</i>
DAMP	Damage associated molecular pattern molecules
DC	<i>Dendritic cell</i> – Cellules dendritiques
EGF	Epidermal growth factor – Facteur de croissance épidermique
EMT	Epithelial–mesenchymal transition – Transition épithélio-mésenchymateuse
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> – Agence du médicament et de l'alimentation
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> – Facteur de croissance fibroblastique
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> – Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages
M-MDSC	<i>Monocytic-Myeloid-derived suppressive cells</i> – Cellule myéloïde suppressive monocytique
GvHD	<i>Graft versus Host Diseases</i> – Maladie du greffon contre l'hôte
HVEM	<i>Herpes virus entry mediator</i> – Médiateur de l'entrée du virus Herpès
ICOS	<i>Inducible T-cell co-stimulator</i> – Co-stimulateur inductible des lymphocytes T

IDO	Indoléamine 2,3-dioxygénase
IFN	Interféron
IL-	Interleukine
KO	<i>Knock-out</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressive cell</i> – Cellule myéloïde suppressive
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> – Cellules mononucléées isolées du sang périphérique
PD-(L)1	<i>Programmed cell Death 1 (ligand)</i>
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde
PMN-MDSC	<i>Polymorphonuclear Myeloid-derived suppressive cell</i> – Cellule myéloïde suppressive polymorphonucléaire
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> – Espèces réactives de l'oxygène
shRNA	<i>short hairpin RNA</i> – Petit ARN en épingle à cheveux
siRNA	<i>small interfering RNA</i> – Petit ARN interférant
TAA	<i>Tumor-associated antigen</i> – Antigène associé aux tumeurs
TAM	<i>Tumor-associated macrophage</i> – Macrophage associé à la tumeur
Tconv	Lymphocytes T conventionnels
TGF	<i>Tumor growth factor</i> – Facteur de croissance tumorale
TIL	<i>Tumor infiltrating lymphocyte</i> – Lymphocytes infiltrant la tumeur
TLR	<i>Toll-like receptor</i> – Récepteurs " <i>toll-like</i> "
TLS	<i>Tertiary lymphoid structures</i> – Structures lymphoïdes tertiaires
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> – Facteur de nécrose tumorale
TNFR	<i>TNF receptor</i> – Récepteur de la superfamille du TNF
Treg	Lymphocytes T régulateur
VEGF	<i>Vascular endothelium growth factor</i> – Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WT	<i>Wild-type</i> – sauvage

---

## **Introduction**

---

## I) Cancers, oncogenèse et immunité

### a) Les cancers

#### 1) *Epidémiologie*

Les cancers sont un enjeu majeur en santé publique. En effet, avec plus de 19 millions de nouveaux cas par an et 10 millions de décès, les cancers représentent l'une des 2 premières causes de décès prématurés (avant 69 ans) dans le monde, en particulier dans les pays développés. En France, on estime à près de 400 000, le nombre de nouveaux cancers diagnostiqués et à près de 160 000, le nombre de décès. En termes d'incidence, les cancers les plus fréquents sont les cancers du sein, de la prostate, du poumon et colorectaux<sup>1</sup>. Concernant la survie à 5 ans, bien qu'en progression, celle-ci reste très variable d'une localisation de cancer à une autre. En effet, en France, elle varie d'une dizaine de pourcent pour le cancer du pancréas à plus de 90% pour le cancer de prostate ou le mélanome<sup>2</sup>.

Certains facteurs de risques associés au mode de vie ou à l'environnement ont été identifiés tels que la consommation d'alcool, le tabagisme, le surpoids/obésité ou encore l'exposition aux ultraviolets<sup>3</sup>.

#### 2) *Caractéristiques du cancer*

Derrière le terme « cancer » se cache un ensemble de pathologies très hétérogènes tant du point de vue de l'étiologie que de la biologie, de la prise en charge et de la survie. Néanmoins, derrière cette apparente diversité, on peut définir un certain nombre de caractéristiques communes à toutes ces pathologies. Ces « Hallmarks of cancer » ont été proposés par Hanahan & Weinberg en 2000 puis revu en 2011 et 2022 afin d'intégrer les découvertes faites au cours des 20 dernières années, portant leur nombre à quatorze (Figure1)<sup>4-6</sup>. Parmi ces quatorze caractéristiques, quatre sont définies comme des « enabling characteristics » (inflammation, instabilité génomique/mutations, reprogrammation épigénétique et microbiome), c'est-à-dire que ces caractéristiques permettent l'acquisition par la cellule tumorale des dix autres.

- **Autosuffisance en signaux pro-prolifératifs**

Cette autosuffisance peut passer par un apport continu en facteurs de croissance (sécrétés par la tumeur elle-même ou par les cellules stromales de son microenvironnement<sup>7</sup>) ou par une activation constitutive de certaines voies de signalisation telle que la voie des MAP kinases via une mutation de la sérine/thréonine kinase de B-Raf<sup>8</sup>.

- **Perte de la sensibilité aux signaux antiprolifératifs**

Dans une cellule normale, plusieurs systèmes existent afin de réguler la prolifération cellulaire. Ceux-ci peuvent dépendre de l'action de gènes suppresseurs de tumeurs, parmi lesquels on retrouve TP53 ou RB, qui vont pouvoir bloquer la prolifération cellulaire ou induire l'apoptose<sup>9</sup>. Un autre mécanisme limitant la prolifération cellulaire au sein d'un tissu est l'inhibition de contact. Plusieurs protéines ont été décrites comme étant impliquées dans cette inhibition parmi lesquelles la protéine Merlin qui favorise le couplage de molécules d'adhésion avec des récepteurs tyrosine kinase transmembranaires tout en limitant leur capacité à émettre des signaux mitogéniques<sup>10,11</sup> ou encore la protéine LKB1 qui contrebalance les effets du proto-oncogène Myc<sup>12</sup>. Dans le cas d'un cancer, la présence de mutations dans les gènes clés de ces mécanismes a pour conséquence de permettre une prolifération non contrôlée des cellules tumorales.

- **Immortalité répllicative**

Une des limites à la prolifération infinie des cellules est la longueur des télomères, en effet, ceux-ci se raccourcissent à chaque division et sont essentiels pour maintenir la stabilité du génome. Pour compenser ce mécanisme, la majorité des tumeurs expriment des télomérases qui vont leur permettre de stabiliser la longueur de leurs télomères et ainsi, de pouvoir proliférer sur le long terme<sup>13,14</sup>.

- **Echappement au système immunitaire**

L'échappement à la réponse immunitaire antitumorale est un élément majeur de la progression tumorale. Plusieurs mécanismes sont mis en place par la tumeur pour inhiber cette réponse. Ces mécanismes incluent le détournement des cellules régulatrices, la perte de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou encore l'expression de ligands de molécules de co-inhibition.

Ces aspects seront plus amplement détaillés dans la partie suivante.

- **Environnement inflammatoire**

L'environnement inflammatoire au sein de la tumeur favorise l'oncogénèse via plusieurs mécanismes :

- Promotion de la prolifération et de la survie

Lors de la réponse inflammatoire, de nombreuses cytokines sont sécrétées dans l'environnement parmi lesquelles l'IL-1, le TNF $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-33 ou l'IL-22<sup>15</sup>. La présence de ces cytokines peut aboutir à l'activation de diverses voies de signalisation au sein des cellules tumorales ayant pour finalités la favorisation du développement tumoral, mais aussi la stimulation des cellules immunitaires *in situ* aboutissant à une boucle de régulation positive. Parmi ces voies de signalisation, on peut citer les voies impliquant STAT3, NF $\kappa$ B ou AP1<sup>16</sup>, dont l'activation aboutit à l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire. Par exemple, l'activation de STAT3 par l'IL-6, produite par les cellules myéloïdes, a été montrée comme étant cruciale pour le développement précoce de tumeurs colorectales associées à la colite<sup>17,18</sup>.

- Déstabilisation génomique

L'inflammation a aussi pour conséquence d'augmenter l'instabilité génomique notamment via la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages tissulaires<sup>19</sup>. De plus, certaines cytokines, comme le TNF, l'IL-1 $\beta$  ou le TGF- $\beta$ , peuvent induire une activation ectopique de désaminases pouvant aboutir à des mutations dans certains gènes cruciaux pour l'oncogenèse<sup>20-22</sup>.

- Induction de l'invasion et de métastases

Enfin, l'inflammation favorise la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) via, entre autre, la répression de la cadhérine E et l'augmentation de la synthèse et de l'activité de métalloprotéinases de la matrice<sup>23,24</sup>. Couplée à la promotion de la néoangiogénèse, l'EMT favorise l'apparition de métastases.

- **Promotion de l'angiogénèse**

Tout comme les tissus sains, les tumeurs ont besoin d'apports réguliers en nutriments et en oxygène, ainsi que de la possibilité d'éliminer leurs déchets métaboliques et le CO<sub>2</sub>. Cet apport est assuré par la formation de nouveaux vaisseaux suite à la sécrétion du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et d'autres facteurs de croissance proangiogéniques directement par les cellules tumorales dans un premier temps, puis par les cellules du stroma<sup>25</sup>. De plus, des formes latentes du VEGF peuvent être séquestrées dans la matrice extracellulaire et être libérées sous l'action de métalloprotéinases dont MMP-9<sup>26</sup>. Cependant, ces nouveaux réseaux vasculaires sont sous-optimaux avec des embranchements anarchiques, des diamètres non homogènes ou encore des microhémorragies<sup>27</sup>.

- **Capacité d'invasion et de métastases**

Etroitement lié à l'EMT, la capacité des cellules tumorales à envahir les tissus distants (=métastases) est un phénomène complexe impliquant de nombreux prérequis tels qu'une perte d'adhésion, l'augmentation de la motilité et de l'invasion, la protéolyse, la résistance à l'apoptose et le ciblage d'organes spécifiques<sup>28</sup>.

- **Instabilité génomique et mutations**

L'acquisition de la plupart des caractéristiques des cellules tumorales dépend en grande partie de l'accumulation d'altérations du génome. Ces altérations peuvent être de trois types : l'instabilité chromosomique (défaut de structure ou de nombre), l'instabilité des microsatellites (nombre de répétitions dans les séquences microsatellite) et l'instabilité génomique correspondant à l'accumulation de mutations ponctuelles<sup>29</sup>. Cette instabilité peut aboutir à la surexpression de gènes dits proto-oncogènes, incluant SRC, KRAS ou MYC. Au contraire, elle peut aussi conduire à la perte de fonction des protéines codées par des gènes suppresseurs de tumeur comme TP53, CDKN2A ou RB1.

- **Résistance aux mécanismes de mort cellulaire programmée**

Un facteur majeur de résistance à l'apoptose des cellules tumorales est la présence fréquente de mutations dans le gène TP53, codant pour la protéine p53, chargée d'assurer l'intégrité de l'ADN<sup>30</sup>. En outre, d'autres mécanismes associant la surexpression de molécules anti-apoptotiques ou de signaux de survie, une moindre expression de molécules pro-apoptique ou le court-circuitage des voies extrinsèques de l'apoptose sont aussi fréquemment retrouvés. Néanmoins, la nécrose reste un processus important dans le développement tumoral. En effet, contrairement à l'apoptose, la mort cellulaire par nécrose conduit au relargage par les cellules de signaux pro-inflammatoires dans le microenvironnement adjacent, pouvant ainsi favoriser le recrutement de cellules immunitaires inflammatoires et donc, l'inflammation locale<sup>31</sup>. De plus, les cellules nécrotiques peuvent aussi libérer des molécules bioactives, telles que l'IL-1 $\alpha$ , qui peuvent directement promouvoir la prolifération des cellules tumorales viables<sup>32</sup>.

- **Dérégulation du métabolisme**

D'un point de vue métabolique, les cellules tumorales favorisent la glycolyse, et ce, même en condition aérobie, malgré un rendement moindre comparé à la phosphorylation oxydative (« effet Warburg »<sup>33</sup>). Cette capacité est rendue possible par une forte surexpression des transporteurs du glucose GLUT. Cette glycolyse accrue fournie aux cellules tumorales des

métabolites intermédiaires nécessaires pour la synthèse d'acides nucléiques, de protéines et de lipides<sup>34</sup>.

- **Plasticité cellulaire**

Les cellules tumorales sont capables d'altérer leur processus de différenciation ou de revenir à un état « progenitor-like » leur permettant de maintenir leurs capacités prolifératives et d'acquérir des traits d'autres tissus, une résistance à certains traitements ou d'accroître leur potentiel métastatique<sup>35</sup>.

- **Reprogrammation épigénétique**

Au-delà des altérations du génome tumoral, des altérations épigénétiques telles que l'hyperméthylation<sup>36</sup>, la modification des histones<sup>37</sup>, l'accessibilité de la chromatine<sup>38</sup> ou encore des modifications des ARNm permettent aux cellules tumorales de s'adapter à leur environnement en facilitant ou, au contraire, en entravant, la transcription de certains gènes.

- **Polymorphisme du microbiome**

L'importance du microbiome dans le développement de nombreuses pathologies a été mise en évidence au cours des dernières années<sup>39</sup>. Dans le cadre du cancer, des microbiomes protecteurs ou, au contraire, augmentant le risque de développer certains cancers, en favorisant certaines caractéristiques tumorales, ont pu être identifiés<sup>40</sup>. Par ailleurs, la composition du microbiote tumoral peut aussi être corrélée avec certains sous-types tumoraux<sup>41</sup> ou la réponse aux immunothérapies<sup>42,43</sup>.

- **Présence de cellules sénescents**

La sénescence cellulaire est généralement associée à un arrêt irréversible de la prolifération cellulaire. Par ailleurs, ce programme est aussi associé avec un sécrétome varié, pouvant inclure des cytokines, des chimiokines ou des protéases selon le type cellulaire. Ce sécrétome peut avoir un effet pro- ou anti-tumorigénique en agissant sur la réponse immunitaire locale, la prolifération des cellules tumorales ou encore l'apparition de métastases<sup>44</sup>.



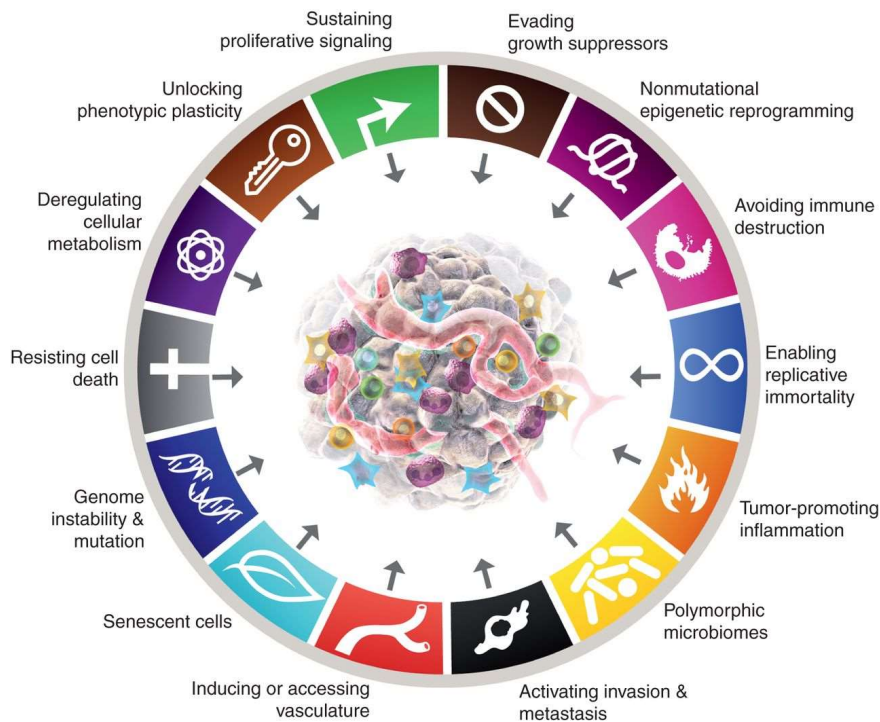


Figure 1 : Les caractéristiques communes des cancers (d'après Hanahan, *Cancer Discovery*, 2022)<sup>4</sup>

## b) La réponse immunitaire antitumorale

### 1) Concept d'immunosurveillance

La destruction de la tumeur par le système immunitaire suppose, au préalable, l'existence d'une capacité de reconnaissance des cellules tumorales par celles du système immunitaire. Cette hypothèse a été avancée par P. Ehrlich dès 1909<sup>45</sup>. Cependant, l'existence d'antigènes spécifiques associés aux tumeurs (TAA) n'a pu être démontrée que bien plus tard par Foley chez la souris en 1953, puis par van der Bruggen *et al.* chez l'homme en 1991<sup>46,47</sup>.

La démonstration de l'existence de ces antigènes spécifiques de la tumeur a conduit Burnet et Thomas à initier le concept d'immuno-surveillance, selon lequel, le système immunitaire agirait telle une sentinelle et éliminerait continuellement les cellules anormales<sup>48</sup>. Cette hypothèse a été appuyée par de nombreux travaux ultérieurs, dans des modèles murins, montrant l'importance du système immunitaire dans le rejet tumoral aussi bien sur le plan moléculaire que cellulaire<sup>49,50</sup>. Par ailleurs, des observations chez l'Homme vont dans ce sens. En effet, l'incidence des cancers est augmentée chez les patients immunodéprimés (suite à un traitement par immunosuppresseur dans le cadre d'une greffe) ou immunodéficients (suite à une infection virale type VIH)<sup>51,52</sup>.

## 2) De l'immunosurveillance à l'apparition du cancer : les 3E

Sur la base du principe d'immunosurveillance, le développement de cancer chez un individu immunocompétent est contre-intuitif. L'existence de cette possibilité suggère que la tumeur est capable d'échapper à cette surveillance continue. Pour expliquer ce phénomène, un modèle en trois phases a été proposé par Dunn *et al.* : « the three Es of cancer immunoediting » (Figure 2)<sup>53</sup>.

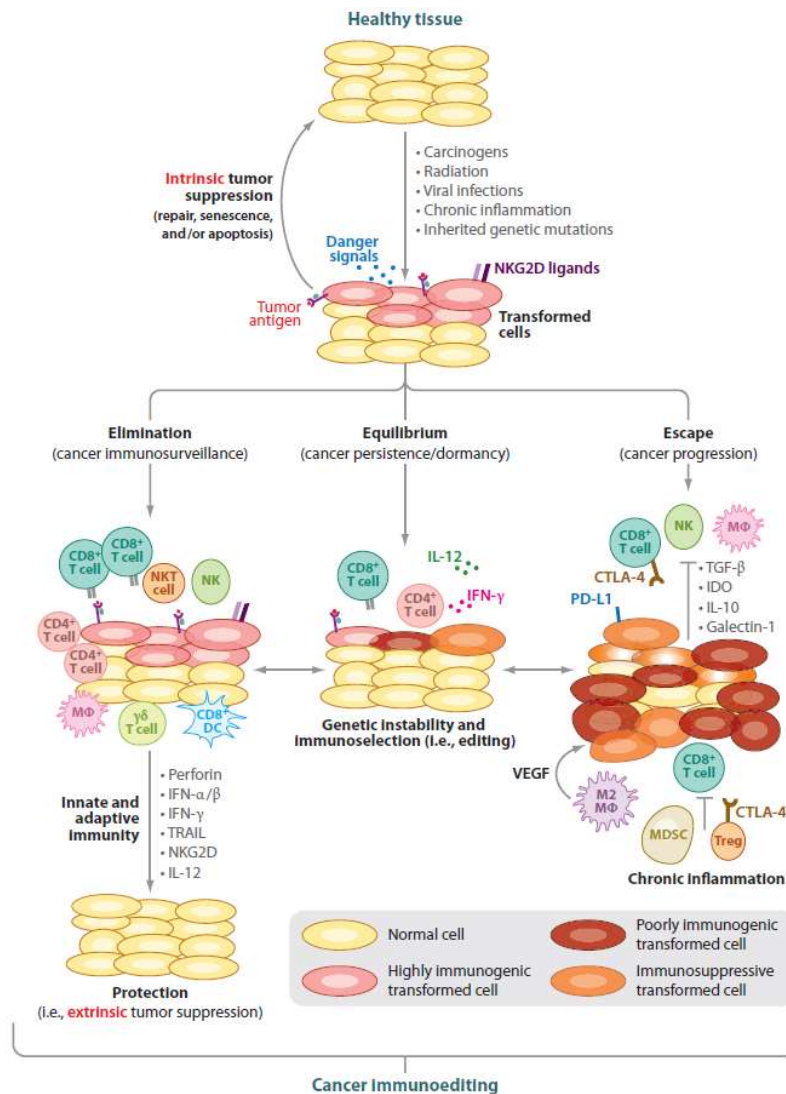


Figure 2 : Les trois phases de l'immunoédition tumorale (D'après Vesely *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 2011)<sup>54</sup>. Ces trois phases peuvent intervenir indépendamment ou séquentiellement pour contrôler et modifier le développement la tumeur. Suite à la transformation de cellules normales en cellules tumorales consécutivement à des perturbations génomiques et à l'échec des processus suppresseurs de tumeurs intrinsèques, le système immunitaire peut intervenir comme un mécanisme suppresseur de tumeur extrinsèque et éliminer les cellules tumorales ou prévenir leur expansion. Lors de la phase d'élimination, les cellules de l'immunité innée et adaptative vont agir de concert pour détecter et détruire les cellules transformées. Néanmoins, si certains clones tumoraux résistent à cette phase, un équilibre dynamique va s'instaurer durant lequel le système immunitaire va stabiliser l'expansion tumorale tout en exerçant une pression de sélection sur ces clones. A terme, certains clones pourront alors échapper à la reconnaissance, à la lyse ou au contrôle par le système immunitaire, et ainsi, progresser jusqu'à un stade cliniquement détectable.

## **Elimination**

La phase d'élimination est l'extension de l'immunosurveillance telle que décrite précédemment. Ainsi, plusieurs mécanismes existent pour permettre au système immunitaire de détecter les cellules anormales. Cette reconnaissance peut se faire par l'expression de signaux de danger comme l'interféron (IFN) du type I par la tumeur ou la libération de molécules associées aux dommages tissulaires (=DAMPs, ex : ATP, HMGB1, calréticuline) par les cellules tumorales elles-mêmes ou les cellules environnantes du fait du développement tumoral. Par ailleurs, un troisième mécanisme de reconnaissance implique l'expression par la tumeur de molécules de stress telles que MICA et MICB qui vont activer les cellules NK suite à l'engagement de leur récepteur NKG2D<sup>55</sup>. De plus, d'autres cellules, comme les lymphocytes T $\gamma\delta$  et les NKT, sont capables d'être activées directement suite à la reconnaissance de molécules exprimées par la tumeur, comme le ganglioside GD3 ou certains phosphoantigènes, par leur récepteur semi-invariant<sup>56,57</sup>. Cette activation va entraîner la sécrétion d'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) par ces dernières et induire la mort des cellules tumorales par des mécanismes antiprolifératifs, pro-apoptotiques et angiostatiques ou permettre la lyse directe des cellules tumorales via la sécrétion de granzyme B et de perforine ou encore, en déclenchant l'apoptose via l'activation des récepteurs Fas et TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) <sup>58-61</sup>.

La lyse des premières cellules tumorales va permettre la libération d'antigènes tumoraux et l'entrée dans le cycle immunitaire antitumoral (Figure 3), qui doit permettre d'éliminer précocement les tumeurs avant qu'elles ne deviennent cliniquement apparentes<sup>62</sup>. Ces antigènes tumoraux peuvent être de différentes natures : des néo-antigènes mutés, des antigènes de différenciation, surexprimés, cryptiques, viraux, carcinoembryogéniques ou restreints aux cellules germinales testiculaires<sup>63-65</sup>.

En présence des DAMPs, des antigènes tumoraux libérés dans l'environnement et des interférons de type I sécrétés par la tumeur, les cellules dendritiques (DC) vont endocyter ces antigènes pour les charger sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classes I et II, s'activer et maturer. Au cours de cette maturation, les DC vont augmenter l'expression à leur surface du CMH de classe II ainsi que de molécules de co-stimulation comme CD40, CD80 ou CD86. On distingue 2 grands sous-groupes de DC : les cDC1 spécialisées dans la cross-présentation aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> chez la souris et les cDC2 impliquées dans les interactions avec les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Chez l'Homme, les 2 sous-types peuvent présenter les antigènes via les CMH de classe I et II<sup>66</sup>. Cette prise en charge des

antigènes tumoraux peut aussi être réalisée par d'autres cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les monocytes/macrophages ou les lymphocytes B.

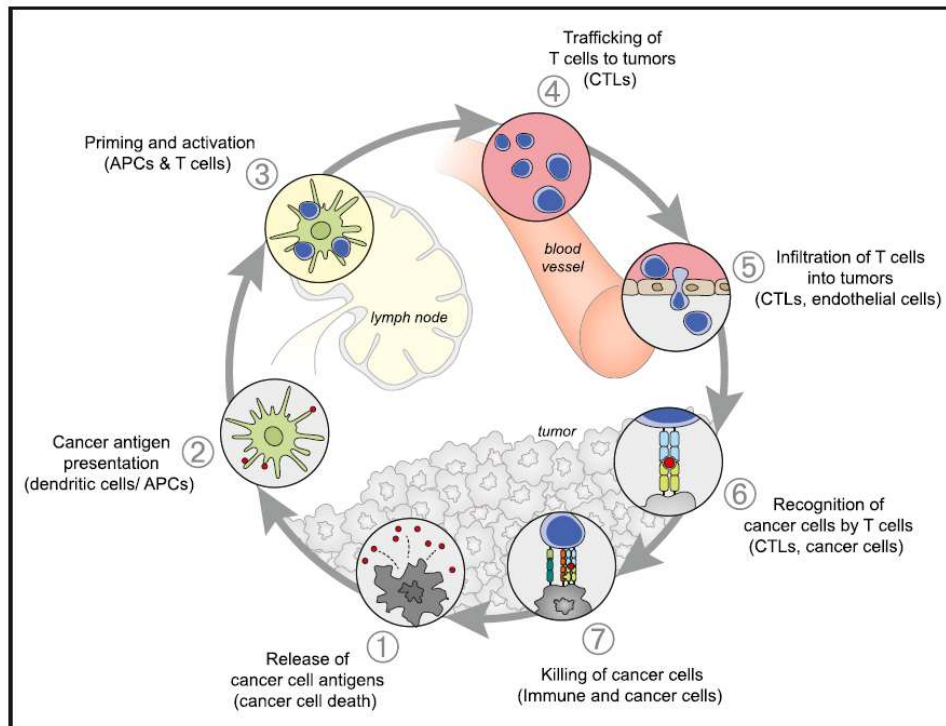


Figure 3 : Le cycle immunitaire antitumoral (D'après Chen & Mellman, *Immunity*, 2013)<sup>62</sup>. La mise en place d'une réponse immunitaire contre une tumeur est un processus cyclique pouvant s'auto-amplifier et élargir la réponse T spécifique. Ce cycle peut être divisé en sept étapes principales : (1) la libération d'antigènes tumoraux, (2) la capture et l'apprêtage des antigènes par les CPA, (3) la migration vers le ganglion drainant pour activer les lymphocytes spécifiques, (4) la migration des T activés vers la tumeur et (5) leur pénétration dans la tumeur, (6) la reconnaissance des cellules tumorales par les T, (7) pour aboutir à la destruction de cellules tumorales.

Les CPA vont ensuite migrer dans le ganglion drainant (ou au sein de structures lymphoïdes tertiaires (TLS) intra-tumorales<sup>67</sup>) afin de présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T spécifiques. Cette stimulation des lymphocytes T, accompagnée des signaux de co-stimulation et des cytokines adaptées, va permettre leur activation et leur différenciation en lymphocytes T effecteurs<sup>68</sup>.

Une fois activés, les lymphocytes T vont sortir du ganglion et migrer vers la tumeur sous l'influence de l'expression, au sein de celle-ci, de ligands de CXCR3 comme les chimiokines CXCL9 et CXCL10<sup>62,69</sup>. Les lymphocytes T cytotoxiques vont, ensuite, pénétrer dans la tumeur où ils pourront exercer leurs capacités cytolytiques sur les cellules tumorales avec le soutien des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th1. Ces lymphocytes Th1 sécrètent de l'IL-2, du TNF $\alpha$  et de l'IFN $\gamma$  ce qui amplifie le recrutement des macrophages, des lymphocytes NK et T CD8<sup>+</sup>, tout en promouvant leurs capacités cytotoxiques<sup>70</sup>.

## **Equilibre**

Lors de la phase d'équilibre, les variants tumoraux n'ayant pas été éliminés peuvent entrer dans un état de « dormance » durant lequel un équilibre dynamique va s'instaurer entre croissance tumorale et élimination par le système immunitaire. Durant cette phase, qui peut s'étendre sur plusieurs années, la forte instabilité génétique de la tumeur associée à la pression de sélection, exercée par les lymphocytes et l'IFN $\gamma$ , peut conduire à l'émergence de nouveaux variants avec une résistance accrue au système immunitaire. En effet, dans un modèle de souris immunodéficientes, les tumeurs présentent des protéines mutantes très antigéniques ce qui se traduit par une très forte immunogénicité tumorale et un rejet spontané lorsqu'elles sont transplantées dans une souris immunocompétente. Néanmoins, si la tumeur s'est développée dans une souris immunocompétente, elle est aussi capable de se développer dans une souris syngénique montrant que celle-ci a perdu ces antigènes fortement immunogéniques<sup>50</sup>. Chez l'Homme, ce phénomène a été démontré en 2019 par l'équipe de Charles Swanton<sup>71</sup>. Dans cette étude, les auteurs ont pu, à partir de l'analyse de 164 échantillons issus de 64 tumeurs, montrer l'existence d'une forte hétérogénéité tumorale, associée à un grand nombre de sous-clones tumoraux, entre les patients, mais aussi au sein d'une même tumeur. De plus, cette hétérogénéité est associée à un faible infiltrat immunitaire, et ce, malgré la corrélation entre le nombre de mutations et l'importance de l'infiltrat. Ces résultats suggèrent l'existence d'une immunosélection de clones exprimant peu de néo-antigènes et favorisant ainsi l'apparition de nouveaux clones résistants aux cellules du système immunitaire.

## **Evasion**

Trois grands mécanismes principaux permettent d'expliquer la résistance au système immunitaire de ces nouveaux clones (Figure 4)<sup>72</sup> :

- L'invisibilité vis-à-vis du système immunitaire
- L'inactivation directe des cellules effectrices par la tumeur
- Le détournement des cellules régulatrices et du microenvironnement

Du fait de la pression de sélection exercée par le système immunitaire sur les cellules tumorales, des clones de moins en moins immunogènes ont tendance à émerger au cours du temps<sup>50</sup>. Cette perte d'immunogénicité peut passer par la perte d'expression du CMH de classe I, rendant la tumeur invisible pour les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Cette perte du CMH est variable d'un cancer à l'autre (0-93%) mais aussi au sein d'une tumeur ou entre la tumeur primaire et les métastases<sup>73-75</sup>. Une autre possibilité est l'altération des mécanismes d'apprêtement des antigènes tumoraux via, entre autres, la perte d'expression du transporteur pour la présentation

des antigènes (TAP1)<sup>76</sup> ou simplement la perte de l'expression de certains néo-antigènes<sup>77</sup>. Dans les tumeurs impliquant des CPA comme le gliome ou le lymphome B, la perte du CMH de classe II a aussi été observée, prévenant ainsi l'activation directe des lymphocytes T CD4<sup>+</sup><sup>78,79</sup>.

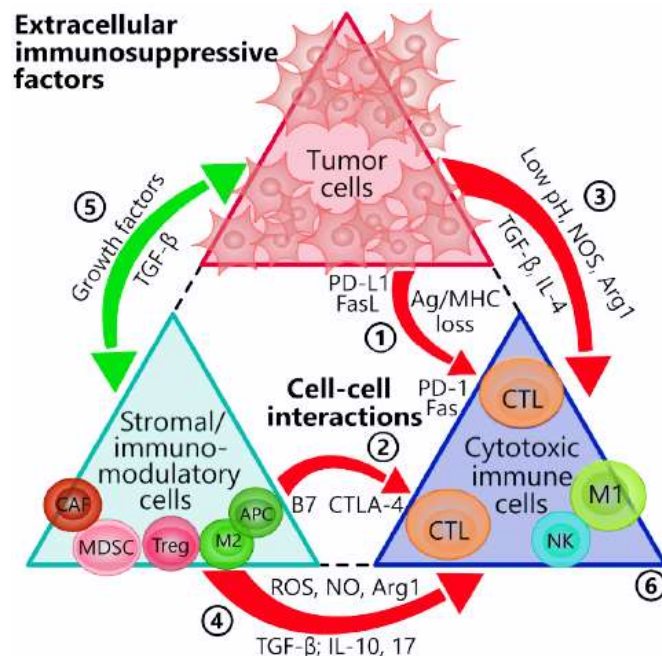


Figure 4 : Les interactions immunosuppressives au sein de la tumeur (D'après Wang et al., *Cancer Drug Resist*, 2020)<sup>72</sup>. Les cellules tumorales et les cellules de son microenvironnement influencent massivement la réponse cytotoxique antitumorale directement ou indirectement. Les flèches rouges indiquent des influences négatives et les flèches vertes indiquent des influences positives.

La tumeur peut aussi échapper au contrôle par le système immunitaire en inactivant directement les cellules effectrices via l'expression de ligands de molécules de co-inhibition. Lorsqu'ils sont exprimés par une CPA, ces ligands peuvent interagir avec leurs récepteurs exprimés par les lymphocytes T pour prévenir l'autoréactivité et maintenir la tolérance périphérique en initiant un programme d'anergie ou d'épuisement<sup>80</sup>. Les molécules de co-inhibitions et leurs ligands seront abordés plus en détail dans la partie IIb.

Le troisième grand mécanisme par lequel une tumeur peut échapper aux cellules cytotoxiques implique le détournement des cellules stromales et immunitaires régulatrices à son profit afin d'établir un environnement immunosuppresseur. Cela passe par l'expression de certaines cytokines et chimiokines attirant certains sous-types cellulaires et favorisant leur polarisation *in situ* vers des phénotypes suppresseurs. Dans un modèle peu immunogène de cancer du côlon chez la souris, il a été montré que le TGF-β inhibait la réponse Th1 et l'infiltration des lymphocytes T<sup>81</sup>. Dans le même temps, cette sécrétion TGF-β favorise la conversion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en lymphocytes T régulateurs (Treg)<sup>82</sup>. De plus, la

sécrétion de cytokines Th2 comme l'IL-4 peut favoriser la polarisation de macrophages vers un profil M2 et la génération de cellules myéloïdes suppressives (MDSC) pour bloquer l'activité des cellules cytotoxiques<sup>83</sup>. La production de VEGF a été décrite comme inhibant la maturation des DC<sup>84</sup>. Dans le cancer de l'ovaire, l'expression intratumorale de CCL22 et CCL28 permet l'attraction des Treg CCR4<sup>+</sup> et CCR10<sup>+</sup><sup>85,86</sup>. Par ailleurs, de nombreux couples chimiokines/récepteurs ont été associés avec le recrutement de MDSC dans la tumeur, parmi lesquels CCL2/CCR2, CCR5 et ses ligands, ou encore CX3CR1/CX3CL1<sup>87</sup>.

- MDSC

Les cellules myéloïdes suppressives sont des cellules myéloïdes immatures activées. Ces cellules peuvent être divisées en 2 grands groupes basés sur leurs caractéristiques morphologiques et phénotypiques : les MDSC-polymorphonuléaires (PMN-MDSC) et les MDSC-monocytiques (M-MDSC)<sup>88</sup>. Ces cellules possèdent une forte activité immunosuppressive et sont impliquées dans de nombreuses pathologies (cancer, infections chroniques, sepsis, auto-immunité) avec un mauvais pronostic associé<sup>89</sup>. Les mécanismes suppresseurs de ces cellules dépendent de la sécrétion des ROS, de peroxy-nitrites, d'arginase 1 et de prostaglandine E2 pour les PMN-MDSC et de NO, de TGF- $\beta$  ainsi de l'expression de ligands de molécules de co-inhibition et des ectonucléotidases CD39 et CD73 pour les M-MDSC<sup>90</sup>. Au-delà de leur fonction dans la répression de la réponse antitumorale, les MDSC sont aussi impliquées dans la formation de la niche pré-métastatique en induisant le remodelage de la matrice extracellulaire et en promouvant l'angiogenèse<sup>91</sup>. De plus, les PMN-MDSC font aussi office de réservoir énergétique pour les cellules des métastases. En effet, il a récemment été rapporté que les PMN-MDSC pouvaient accumuler des lipides en réprimant une triglycéride lipase avant de les transférer aux cellules tumorales métastatiques qui les absorberont par macropinocytose<sup>92</sup>.

- Macrophages associés à la tumeur (TAM)

Les macrophages ont un rôle central en tant que médiateurs l'inflammation et sont impliqués, à la fois, dans son initiation et sa progression. On définit classiquement 2 états de polarisation : M1, activés classiquement, et M2, alternativement activés, à l'instar des lymphocytes T CD4 Th1 et Th2, néanmoins, de multiples états intermédiaires existent du fait de la grande diversité cytokinique au sein de la tumeur<sup>93,94</sup>. Les macrophages M1 sont issus de l'activation de macrophages en présence de cytokines Th1 comme l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$  ou le LPS. Ces macrophages ont des propriétés plutôt antitumorales de par leur activité de phagocytose et



la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12, TNF)<sup>95</sup>. Par opposition à la polarisation en M1, l'état de polarisation M2 se fait en présence de cytokines Th2 (IL-4, IL-10 et TGF- $\beta$ ). Les macrophages M2 ont, quant-à-eux, des propriétés plutôt régulatrices et favorisent la réparation tissulaire<sup>96</sup>. De plus, leur rôle pro-tumoral implique le recrutement et l'expansion de Treg<sup>97</sup>, des propriétés pro-angiogéniques<sup>98</sup> et l'induction de l'EMT des cellules tumorales<sup>99</sup>. Enfin, ces macrophages peuvent aussi induire un remodelage stromal en sécrétant les facteurs de croissance épidermiques (EGF), des fibroblastes (FGF) et de l'endothélium vasculaire (VEGF)<sup>100</sup>.

- Neutrophiles associés aux tumeur (TAN)

Tout comme les TAM, on distingue deux types de TAN, les N1 antitumorales et les N2 pro-tumorales. En effet, il a été montré que la cytotoxicité directe de ces cellules pouvait inhiber la progression tumorale et le développement de métastases<sup>101,102</sup>. En revanche, l'induction d'un switch angiogénique, la promotion de la migration et de l'invasion ainsi que des propriétés immunosuppressives ont aussi été montrées pour ces cellules<sup>103-105</sup>.

- DC plasmacytoïdes et inflammatoires

Bien que primordiales pour la mise en place d'une réponse antitumorale efficace, les DC et tout particulièrement, les DC plasmacytoïdes (pDC) et les DC inflammatoires (générées lors de la différenciation de monocytes lors de l'inflammation) peuvent jouer un rôle délétère. En effet, dans un environnement suppresseur comme c'est le cas dans la plupart des tumeurs, ces cellules possèdent des propriétés tolérogéniques via la sécrétion d'IL-10, de TGF- $\beta$  et d'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO). De plus, les pDC expriment fortement des molécules de co-inhibition comme PD-L1<sup>106</sup>. Par ailleurs, il a aussi été montré, notamment dans le cancer du sein, que les pDC pouvaient favoriser l'accumulation de Treg en exprimant la molécule ICOS-L dont le récepteur, ICOS, est fortement exprimé par ces derniers<sup>107</sup>. Pour les DC inflammatoires, des études menées chez les souris indiquent qu'elles sont capables d'inhiber les réponses T cytotoxiques en libérant du NO et en exprimant fortement PD-L1<sup>108,109</sup>.

- Lymphocytes T régulateurs (Treg)

Les Treg sont un sous-type de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> modulant les réponses immunitaires physiologiques et pathologiques<sup>110</sup>. Ces cellules sont elles-mêmes catégorisées en 2 sous-types basés sur leur site de développement : les Treg naturels (nTreg) générés au sein du thymus et les Treg périphériques (pTreg) qui sont induits, hors du thymus, à partir de lymphocytes T



conventionnels (Tconv) suite à une activation TCR en présence de certaines cytokines dont le TGF- $\beta$ <sup>111</sup>. Les Treg sont caractérisés par l'expression de 2 marqueurs principaux, la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (CD25) et le facteur de transcription FoxP3<sup>112,113</sup>. Chez l'Homme, FoxP3 pouvant aussi être exprimé par les Tconv lors de l'activation, un troisième marqueur a été ajouté pour permettre de discriminer Tconv activés et Treg : CD45RA<sup>114</sup>. La proportion de ces cellules est largement accrue au sein des tumeurs humaines par rapport au sang périphérique d'un sujet sain (10-50% contre 2-5%)<sup>115,116</sup>. En effet, plusieurs récepteurs aux chimiokines, dont CCR4 et CCR5, ont été associés à la migration des Treg vers la tumeur sous l'impulsion des cellules myéloïdes ou de la tumeur elle-même, notamment via la sécrétion des chimiokines CCL22 ou CCL5<sup>117</sup>. Au sein de la tumeur, les Treg répriment l'activité des autres cellules immunitaires via divers mécanismes impliquant des cytokines, des molécules de co-inhibitions/co-activations et des métabolites (Figure 5)<sup>118</sup>. De par l'expression de CD25, les Treg sont capables de limiter la quantité d'IL-2 disponible dans le microenvironnement pour les lymphocytes T effecteurs, limitant ainsi leur activation et prolifération<sup>119</sup>. De plus, les Treg expriment de nombreuses cytokines immunosuppressives comme l'IL-10, le TGF- $\beta$  ou l'IL-35 et peuvent perturber l'environnement métabolique en exprimant de l'IDO<sup>120</sup>, altérant le métabolisme du tryptophane des cellules effectrices, et les ectonucléotidases CD39 et CD73, dégradant l'ATP en ADP puis AMP qui se lieront au récepteur inhibiteur A<sub>2A</sub>R des lymphocytes T effecteurs<sup>121</sup>. Enfin, les Treg peuvent limiter l'activation des lymphocytes T effecteurs en capturant les molécules de co-stimulation CD80/CD86 sur les CPA via CTLA-4<sup>122</sup>.

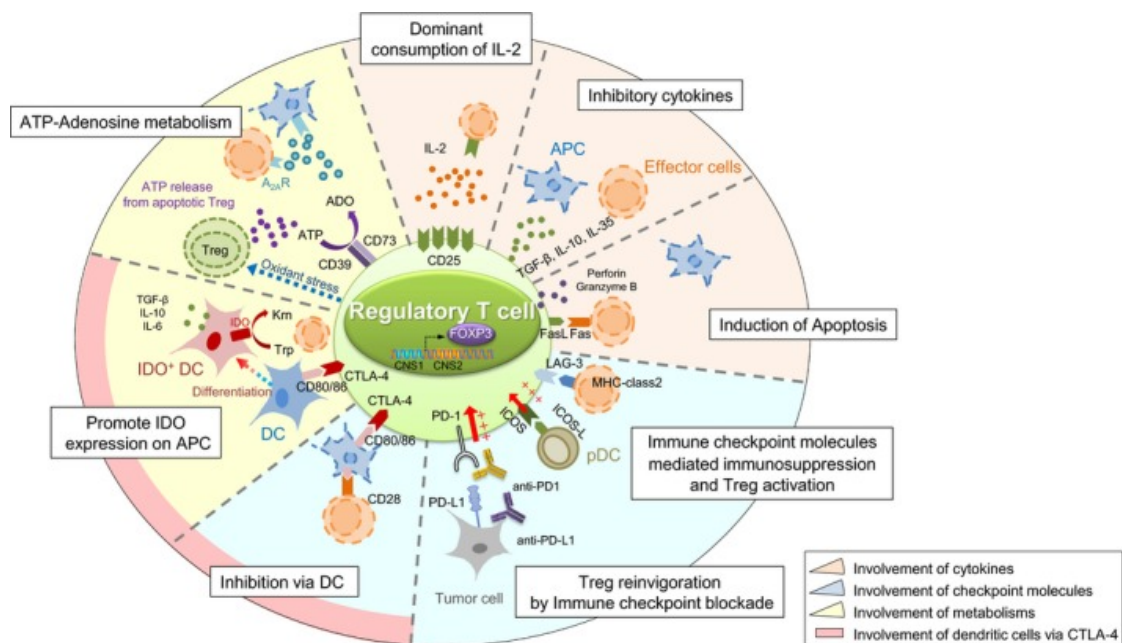


Figure 5 : Les mécanismes d'action des Treg (D'après Ohue & Nishikawa, *Cancer Sci*, 2019<sup>118</sup>). Les Treg exercent leur activité suppressive au travers de multiples mécanismes d'action impliquant des cytokines, des molécules de co-inhibitions/co-activations et des intermédiaires métaboliques.

- Fibroblastes associés au cancer (CAF)

En sus des cellules immunitaires régulatrices, les cellules stromales du microenvironnement tumoral jouent un rôle majeur dans le processus d'évasion de la tumeur au système immunitaire. Parmi ces cellules, les fibroblastes occupent une part importante. En présence de facteurs de croissance (TGF- $\beta$ , HGF, PDGF, FGF), protéines (Wnt-3A métalloprotéinases), ROS et cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6) sécrétés par les cellules tumorales et immunitaires, les fibroblastes peuvent être activés et se différencier en CAF. Les CAF peuvent sécréter de nombreuses molécules actives qui participent dans de nombreux processus tumoraux incluant la génération et la maintenance de cellules souches cancéreuses, la régulation des cellules immunitaires, l'angiogenèse, la réponse métabolique, ...<sup>123</sup>. Des études ont montré que la sécrétion d'IL-6 ou de TGF- $\beta$ 1 par les CAF pouvait favoriser l'EMT des cellules tumorales<sup>124,125</sup>. Les CAF sont aussi impliqués dans le recrutement des TAM, des MDSC et des Treg en sécrétant du CCL2<sup>126</sup>. Par ailleurs, la production de CXCL12 par les CAF perturbe la migration des lymphocytes T vers la tumeur<sup>127</sup>, tout comme la génération d'une véritable barrière physique de matrice extracellulaire<sup>128</sup>. De plus, les CAF peuvent réprimer directement l'activité des lymphocytes T en exprimant de la prostaglandine E2, PD-L1 et PD-L2 ou encore FAS-ligand<sup>129,130</sup>.

- Cellules endothéliales tumorales (TEC)

De plus en plus d'éléments suggèrent que les cellules endothéliales des tumeurs présentent un phénotype et des caractéristiques fonctionnelles uniques comparées aux cellules endothéliales normales. Les TEC impactent l'immunogénicité du microenvironnement en permettant l'adhésion, le roulement et l'extravasation des cellules immunitaires vers le stroma. Néanmoins, elles remplissent également des fonctions immunorégulatrices du fait de leur expression d'IDO1<sup>131</sup> ou du filtrage qu'elles exercent en favorisant l'entrée dans la tumeur des Treg et les MDSC<sup>132</sup>.

### 3) *Impact de la réponse immunitaire sur le pronostic*

Trois paramètres principaux influent sur l'efficacité de la réponse tumorale : la présence ou l'absence de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL), leur localisation au centre de la tumeur et/ou en périphérie et le type de cellules. Ainsi, on peut définir 3 grands types de tumeur basés sur ces paramètres (Figure 6)<sup>133</sup> :

- Les tumeurs dites « froides » dans lesquelles on retrouve peu d'infiltrat immunitaire et qui sont peu inflammatoires. Ces tumeurs sont généralement hyper-prolifératives avec une faible charge mutationnelle et peu d'expression du CMH de classe I.
- Les tumeurs dites « chaudes » qui sont, au contraire, très infiltrées et inflammatoires et dans lesquels, on peut retrouver une forte instabilité génomique ainsi que l'expression de ligands de molécules co-inhibitrices. Ces tumeurs, de meilleurs pronostics, sont d'ailleurs les plus susceptibles de répondre aux inhibiteurs de point de contrôle immunitaires<sup>134</sup>.
- Entre les tumeurs chaudes et froides, on retrouve des tumeurs dans lesquelles l'infiltrat immunitaire est cantonné à la périphérie de la tumeur en raison d'une exclusion physique ou de l'environnement immunosuppresseur intense, généré par l'expression tumoral de TGF- $\beta$  ou la présence, dans le cœur de la tumeur, de cellules immunosuppressives telles que décrit précédemment.

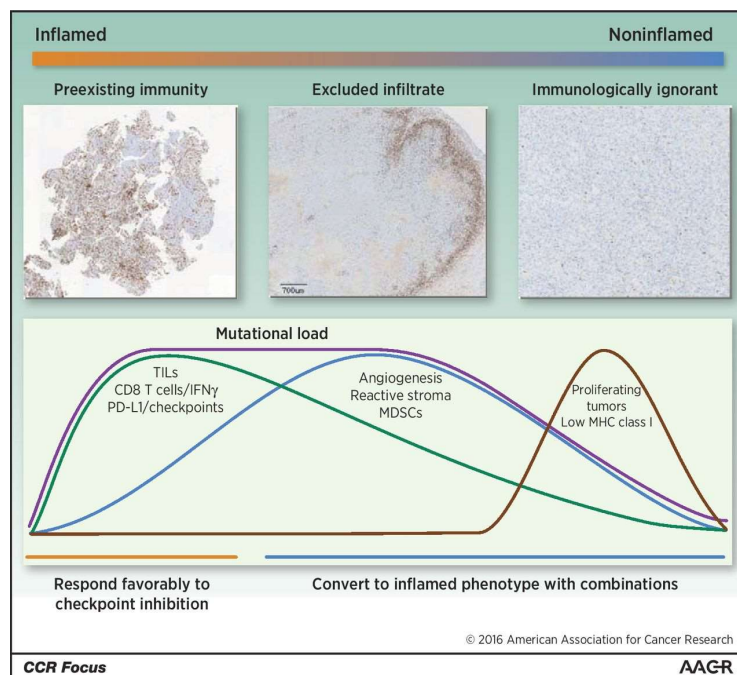


Figure 6 : Les différents types de tumeur (D'après Hegde et al., Clin Cancer Res, 2016). Les images d'immunohistochimie représentent les grands types d'infiltrat immunitaire dans la tumeur (de gauche à droite : « chaude », « exclusion immunitaire », « froide »)

Ce principe d'infiltration différentielle a été utilisé par Galon *et al.* en 2006 pour définir l'Immunoscore dans le cancer du côlon qui a, par la suite, été validé par un consensus international en 2018<sup>135</sup>. Ce score, basé sur la présence de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> au cœur et/ou en marge de la tumeur, propose 4 niveaux allant de l'absence totale de T CD8<sup>+</sup> à leur présence au cœur de la tumeur et permet de mieux définir le pronostic des patients atteints de cancer,

ainsi que d'identifier ceux qui sont le plus à risque de récives et de proposer des thérapies adaptées<sup>136</sup>.

Au-delà de la quantité, les types de cellules immunitaires et de cancer jouent un rôle important dans le pronostic (Figure 7)<sup>137</sup>. En effet, certains sous-types cellulaires comme les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ou les macrophages M1 semblent être globalement favorables tout comme la présence de TLS. En revanche, une importante proportion de cellules immunosuppressives (Treg ou macrophage M2) est associée avec un mauvais pronostic dans la majorité des cancers. Quelques exceptions ont été rapportées, notamment dans le cancer du rein où la forte angiogenèse affecte le contexte immunitaire dans la tumeur. Ainsi, de nombreuses cellules dendritiques immatures sont présentes, favorisant le recrutement des Treg. De plus, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> infiltrant les tumeurs rénales sont polyclonaux, peu cytotoxiques et expriment de nombreuses molécules de co-inhibition, expliquant le mauvais pronostic associé<sup>138</sup>.



Figure 7 : Impact de l'infiltrat immunitaire sur le pronostic des patients selon le cancer (D'après Fridman et al. Nature Reviews Clinical Oncology, 2017)<sup>137</sup>. Données issues de 200 études correspondant à près de 25000 patients présentant l'impact de la présence de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, de structure lymphoïdes tertiaires (TLS), de Treg, de macrophages (M) ou de leur sous-type (M1/M2). La couleur des cercles et leur intensité indique la tendance de l'impact sur le pronostic dans les différentes études (vert = positif, rouge = négatif). La taille des cercles indique le nombre de patients concernés.

## II) Thérapies du cancer et modulation de la réponse immunitaire antitumorale

De nombreuses thérapies sont disponibles pour traiter le cancer. Le choix de l'utilisation de l'une d'entre elle plutôt qu'une autre va dépendre de plusieurs paramètres parmi lesquels le type de cancer et son degré d'extension ainsi que de critères dépendant du patient (âge, antécédents, ...) ou la disponibilité (spatiale ou temporelle) dudit traitement. L'ensemble des thérapies disponibles peuvent être regroupées en 2 grandes catégories :

- Les traitements « conventionnels » visant à agir directement sur la tumeur. Ces derniers vont pouvoir influencer la réponse immunitaire et permettre d'initier, de relancer ou d'amplifier le cycle de l'immunité antitumorale (Figure 8)<sup>62,139</sup>.
- Les immunothérapies visant à stimuler directement l'élimination de la tumeur par le système immunitaire (ou des molécules dérivées de celui-ci).

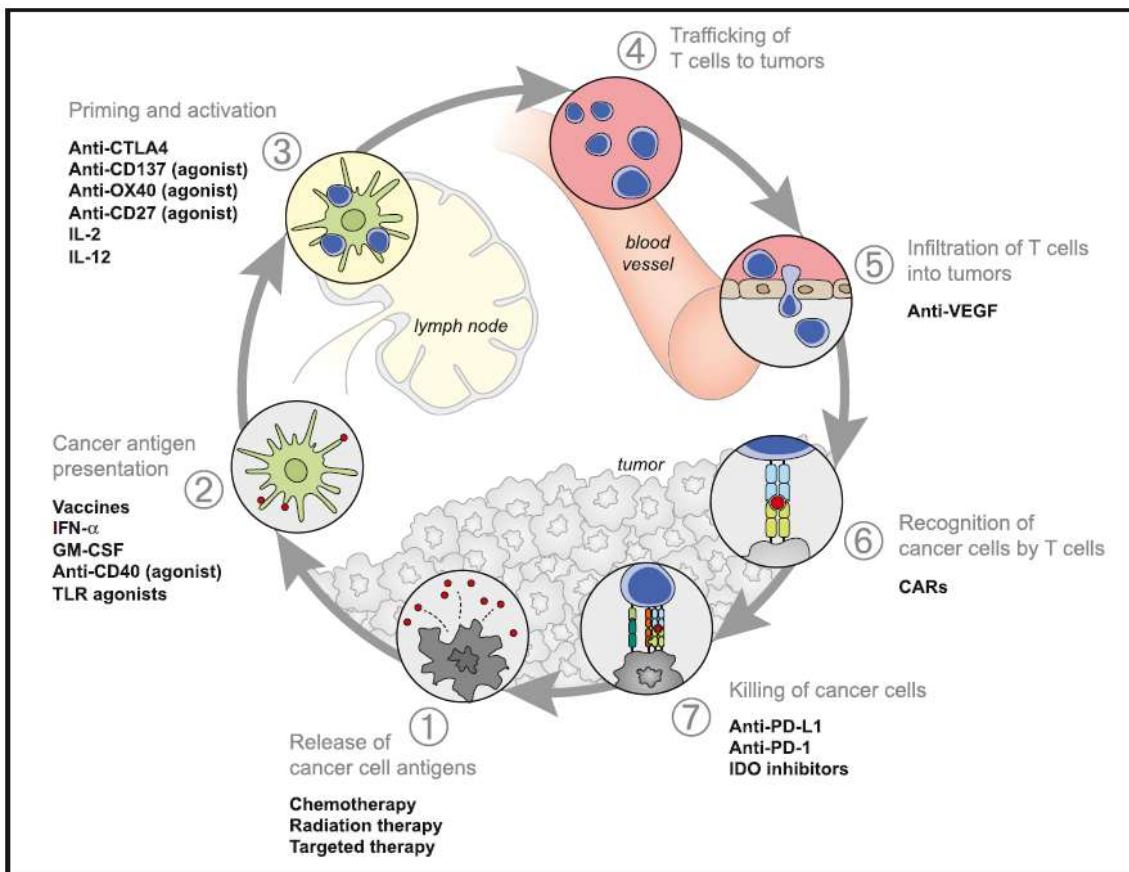


Figure 8 : Thérapies pouvant affecter le cycle immunitaire antitumoral (Adapté de Chen & Mellman , Immunity, 2013)<sup>62</sup>. La plupart des traitements du cancer peuvent agir sur le cycle immunitaire antitumoral afin de le stimuler et permettre l'élimination de la tumeur. Cette figure présente quelques thérapies utilisées ou en développement et qui peuvent promouvoir une étape du cycle.

## a) Les stratégies « conventionnelles »

### 1) La chirurgie

La chirurgie est la première forme de traitement du cancer à avoir été mise en place et celle-ci reste, encore aujourd'hui, très utilisée. Dans le cas où le cancer est localisé et à un stade précoce, la chirurgie peut être utilisée seule dans un objectif curatif. Cependant, l'exérèse chirurgicale est souvent associée à d'autres traitements en préopératoires ou en post-opératoire pour, respectivement, faciliter l'ablation chirurgicale ou limiter le risque de récives. Par ailleurs, la chirurgie est associée au prélèvement des ganglions sentinelles pour s'assurer de l'absence d'envahissement ganglionnaire de la tumeur. En cas d'envahissement, un curage ganglionnaire sera effectué pouvant affecter négativement la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale.

### 2) La radiothérapie

Dès la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, suite aux découvertes des rayons X et du radium, les rayonnements ont été utilisés dans le traitement du cancer. Tout comme la chirurgie, la radiothérapie est un traitement localisé. La source de radiation peut être apportée en faisceau par une machine à proximité du patient (radiothérapie externe), implantée directement dans la tumeur (curiethérapie) ou administrée par voie orale ou intraveineuse afin de se fixer préférentiellement sur les cellules tumorales (radiothérapie métabolique). L'exposition des cellules aux radiations ionisantes va induire des lésions de l'ADN et la formation de radicaux libres conduisant, *in fine*, à la mort cellulaire<sup>140</sup>.

Bien qu'initialement considérée comme immunosuppressive du fait de la sensibilité des lymphocytes à l'irradiation, la radiothérapie s'avère être très favorable à la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale grâce à la libération de DAMPs et leur détection via les TLR (*toll-like receptor*)<sup>141,142</sup>. De plus, l'irradiation a été associée à l'augmentation de l'expression du CMH de classe I ou d'antigènes associés à la tumeur par les cellules tumorales dans le mélanome et l'adénocarcinome gastrique respectivement<sup>143,144</sup>.

### 3) La chimiothérapie

Le premier document rapportant l'utilisation de chimiothérapie remonte à 1865 quand Lissauer traita un patient atteint de leucémie avec de l'arsénite de potassium. Néanmoins, l'ère moderne de la chimiothérapie débute dans les années 1940, après que Bonman et Gilman aient

utilisé, avec succès, une moutarde azotée chez un patient atteint d'un lymphome non Hodgkinien. Cette tentative faisait suite à l'extrapolation d'observations d'hypoplasie lymphoïde et de myélosuppression lors d'autopsie de soldats de la Première Guerre mondiale exposés à des moutardes soufrées<sup>145</sup>. Le cyclophosphamide, un dérivé de ces moutardes, est d'ailleurs toujours utilisé en thérapeutique. Au cours des décennies qui ont suivies, de nombreuses autres molécules, avec des propriétés antitumorales, ont été découvertes parmi lesquelles le méthotrexate, les anthracyclines, les taxanes ou les vinca-alcaloïdes. D'un point de vue mécanistique, toutes ces chimiothérapies « conventionnelles » agissent en perturbant le cycle cellulaire et vont de fait, affecter la plupart des cellules de l'organisme<sup>146</sup>. Face à ce manque de spécificité, de nouveaux traitements ont été développés afin de cibler des molécules plus spécifiques de la tumeur. Parmi ces nouvelles cibles, on peut citer certaines kinases jouant un rôle crucial dans le développement des tumeurs<sup>147</sup>. Des modifications spécifiques de certaines kinases ont d'ailleurs été mises en évidence dans certains cancers : le réarrangement *BCR-Abl* dans la leucémie myéloïde chronique<sup>148</sup> ou la mutation V600E du gène *BRAF* dans le mélanome<sup>8</sup>.

Malgré l'amélioration de la spécificité des chimiothérapies au cours des 20 dernières années, ces traitements restent assez peu spécifiques et vont aussi inhiber ou stimuler la réponse immunitaire antitumorale. En effet, certaines chimiothérapies sont connues pour induire une lymphopénie ou inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes T et des NK<sup>149</sup>. A l'opposé, certains agents utilisés en chimiothérapie ont été rapportés comme favorisant la présentation antigénique ou l'inhibition de cellules régulatrices, comme les Treg pour le cyclophosphamide à faible dose<sup>150</sup> (Table 1).



Table 1 : Les propriétés immunostimulatrices des agents de chimiothérapie (Adapté de Zitvogel et al., Nat Rev Immunol., 2008)<sup>149</sup>

Bioactivity	Mechanisms*	Drugs
Antigen uptake	Cell-surface calreticulin	Anthracyclines, irradiation
Antigen processing	Increased MHC class I expression	Irradiation, DAC
	Increased tumour-associated antigen production	Irradiation, DAC
	mTOR activation	Irradiation
	HMGB1 release	Anthracyclines, oxaliplatin <sup>†</sup> , irradiation
Antigen presentation	DC activation (through TLR4 and MyD88)	Paclitaxel <sup>§</sup> (in mice), irradiation
	APC activation (through TBK, IRF3 and IFN)	Vascular-disrupting agents
	HSP90	Bortezomib <sup>¶</sup>
	Self-peptide–MHC class I complexes	Myelosuppression and HSCs
	Increased antigen cross-presentation	Gemcitabine <sup>†</sup>
T-cell-dependent antitumour effects	T-cell activation	Taxanes and intratumour DCs or GM-CSF-containing vaccines
		Anthracyclines, oxaliplatin, irradiation
		IL-12 with DAC
		5-fluorouracil with vaccines
Homeostatic proliferation	Cytokine sink removal?	Low doses of total body irradiation
	T <sub>reg</sub> -cell inhibition?	High doses of alkylating agents, fludarabine
	Microbial translocation?	
Homing to tumours	Increased ICAM1, PECAM and VCAM1 expression	Irradiation
	Increased RANTES and CXCL10 production	Vascular-disrupting agents
Target destruction	Increased CD95 expression	Cisplatin, irradiation, 5-fluorouracil and dacarbazine
	Increased HSP production	5-Fluorouracil
	Decreased succinate dehydrogenase activity	Cisplatin
	Increased TRAIL expression	Imatinib mesylate <sup>†</sup> with IL-2
Generation of memory T cells	Homeostatic proliferation	Total body irradiation
	Self-peptide–MHC class I complexes	Cyclophosphamide, fludarabine with or without vaccines or HSCs
Inhibition of regulatory cells	Inhibition of MSCs and B cells	Gemcitabine
	Inhibition of T <sub>reg</sub> cells	Cyclophosphamide
	Inhibition of M2 macrophages	Taxanes
	Reduced TGFβ production	Bleomycin
NK-cell triggering	DC–NK-cell crosstalk	Imatinib mesylate
	Type I IFNs	Vascular-disrupting agents

## b) Les immunothérapies

### 1) Historique

De l’Égypte antique au début du 18<sup>ème</sup> siècle, des régressions tumorales ont été observées à de multiples reprises consécutivement à des épisodes infectieux. En 1868, Busch administra volontairement l’agent de l’érysipèle (*S. pyogenes*) à un patient atteint de cancer et observa une réduction tumorale. Puis en 1891, Coley fit le même type d’observation et décida de traiter, avec un certain succès, des patients atteints de cancers inopérables avec des injections de bactéries inactivées par la chaleur (toxine de Coley)<sup>151</sup>. Néanmoins, du fait de l’absence de protocole solide et de la forte variabilité des résultats, la toxine de Coley disparue progressivement au profit de la radiothérapie et de la chimiothérapie. Le principe de la méthode de Coley fut repris en 1959 par Old *et al.* qui établirent l’efficacité du bacille de Calmette-Guérin dans le traitement du cancer superficielle de la vessie<sup>152</sup>. Cette stratégie est d’ailleurs



toujours d'actualité. Depuis la découverte des hybridomes en 1975 permettant de produire à grande échelle des anticorps monoclonaux, le succès de ces derniers n'a cessé de croître<sup>153</sup>. Les années 2010 ont marqué un tournant dans les immunothérapies avec l'approbation par la FDA d'une part, des lymphocytes T avec un TCR génétiquement modifié (CAR T), et d'autre part, les anticorps ciblant les points de contrôle immunitaire CTLA-4 puis PD-1/PD-L1. La table 2 récapitule les grandes avancées dans les immunothérapies du cancer.

*Table 2 : Evolution des immunothérapies antitumorales au cours du temps (Adapté de Oiseth & Aziz, J Cancer Metastasis Treat, 2017)<sup>154</sup>*

Year	Event
1868	First report of an intentional infection of a cancer patient with erysipelas by Wilhelm Busch, with notable shrinkage of the tumor
1891	William Coley injected his first of many cancer patients with bacteria, reporting tumor regressions in many of them
1959	BCG shown to have anti-tumor effects in a mouse model, reported by Lloyd Old, Donald Clark, & Baruj Benacerraf
1975	Monoclonal antibodies manufactured by George Koehler & Caesar Milstein
1984	First report of interferon response in patients with hairy cell leukemia
1998	FDA approved IL-2 to treat patients with metastatic melanoma
2010	First autologous cell-based cancer vaccine (sipuleucel-T) is approved by the FDA for the treatment of metastatic, asymptomatic stage IV prostate cancer
2010	First successful use of gene-edited T-cells for the treatment of CD19 <sup>+</sup> hematologic malignancies in humans, reported by W. Qasim, H. Zhan, S. Samarasinghe <i>et al</i>
2011	Anti-CTLA-4 (ipilimumab), is the first inhibitory checkpoint inhibitor (ICI) approved by the FDA for treatment of stage IV melanoma
2015	The first oncolytic virus (T-VEC) is approved by the FDA for the treatment of metastatic melanoma
2016	A second class of ICIs, anti-PD-1 (pembrolizumab), is approved for the treatment of melanoma
2016	A third class of ICIs, PD-L1 (atezolizumab), is approved for treatment of bladder cancer
2016	First test in humans of CRISPR gene-editing technique for CAR T-cell therapy
2017	First approval of CAR-T cells (tisagenlecleucel) for the treatment of B-cell acute lymphoid leukemia
2018	Approval of anti-CCR4 mAb (mogamulizumab) in the treatment of mycosis fungoides or Sézari syndrome
2022	Anti-LAG-3 (relatlimab) is approved by the FDA for the treatment of melanoma in association with nivolumab

## 2) Les cytokines

Dans des modèles murins, le GM-CSF, l'interféron  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) et les interleukines (IL-) 2, 7, 12, 21 ont montré leur intérêt dans de multiples cancers. Néanmoins, leur efficacité reste limitée du fait que, d'une part, la réponse induite n'est pas spécifique de la tumeur et que, d'autre part, ces cytokines vont aussi favoriser l'émergence de mécanismes de contrôle de la réponse immunitaire comme l'expression de PD-1, CTLA-4, IL-10 ou TGF- $\beta$ <sup>155</sup>. Actuellement,

deux cytokines ont été autorisées pour le traitement de certains cancers chez l'Homme : l'interféron  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) et l'interleukine 2 (IL-2).

- Les interférons de type I (dont fait partie l'IFN- $\alpha$ ) favorisent la réponse antitumorale en induisant l'expression du CMH de classe I par les cellules tumorales et en permettant la maturation d'un sous-type de DC<sup>156,157</sup>. De plus, ils peuvent aussi activer les lymphocytes T cytotoxiques, les NK et les macrophages<sup>158</sup>. Enfin, les IFN de type I ont aussi des propriétés cytostatiques et anti-angiogéniques<sup>159,160</sup>.
- L'interleukine 2 à forte dose en monothérapie ou en association a montré un intérêt dans le traitement de certaines tumeurs<sup>161</sup>. Néanmoins, la toxicité associée et la stimulation préférentielle d'un sous-type de Treg exprimant ICOS limitent son utilisation à grande échelle<sup>162,163</sup>.

### 3) *Les virus oncolytiques*

Les virus oncolytiques sont des virus sélectionnés ou modifiés pour cibler spécifiquement les tumeurs et y exercer un cycle lytique<sup>164</sup>. Au-delà de leurs propriétés lytiques, ces virus peuvent aussi permettre de stimuler la réponse immunitaire spécifique contre la tumeur. En effet, ceux-ci peuvent augmenter la production de TAA par la tumeur<sup>165</sup>, forcer la production de cytokines immunostimulatrices<sup>166</sup> ou encore faire synthétiser des anticorps dirigés contre la tumeur par cette dernière<sup>167</sup>. De plus, les antigènes du virus peuvent devenir eux-mêmes une cible pour le système immunitaire.

Malgré des données précliniques prometteuses, les résultats obtenus chez l'Homme avec les virus oncolytiques sont contrastés, avec 10 à 20% de patients répondeurs et des réponses souvent partielles, et ce, dans la plupart des cancers<sup>168</sup>. Néanmoins, certains virus oncolytiques tirent leur épingle du jeu, comme le talimogène laherparepvec (Imlygic®), un virus dérivé de HSV-1 et codant pour le GM-CSF avec 19,3% de réponse durable dont plus de 80% de réponses complètes<sup>169</sup>. Ce dernier a été approuvé aux Etats-Unis et en Europe en 2015.

### 4) *La vaccination antitumorale*

Tout l'enjeu des vaccins antitumoraux repose sur l'identification d'antigènes spécifiques de la tumeur et la génération d'une réponse cytolytique contre celle-ci. Ces antigènes tumoraux peuvent être de différentes natures : des néo-antigènes mutés, des antigènes de différenciation, surexprimés, cryptiques, viraux, carcinoembryogéniques ou restreints aux cellules germinales testiculaires<sup>63-65</sup>. Un second point à considérer est la manière de délivrer

ces antigènes. Cette délivrance peut être faite directement sous forme de peptides, sous forme d'ADN/ARN ou les antigènes peuvent être chargés sur des CPA<sup>170</sup>.

De plus, dans un contexte tumoral, les DC sont souvent à un stade immature et vont donc favoriser la tolérisation des antigènes tumoraux délivrés<sup>171</sup>. Ainsi, l'utilisation d'adjuvants pour activer les DC est critique pour la mise en place d'une réponse antitumorale efficace. Parmi ces adjuvants, on peut citer les émulsions eau dans huile, les agonistes de TLR, STING ou CD40, ou encore certaines cytokines comme l'IL-2, l'IL-12, l'IFN ou le GM-SCF<sup>172</sup>.

### 5) Les thérapies par transfert adoptif de lymphocytes T (ACT)

Ces thérapies sont basées le transfert de lymphocytes T provenant directement de la tumeur ou du sang périphérique expansus *ex vivo*. Ces lymphocytes T peuvent être administrés directement ou être modifiés génétiquement préalablement, notamment via l'ajout d'un TCR transgénique, d'un récepteur chimérique (CAR), ou encore la délétion de certains gènes inhibiteurs<sup>173</sup>. Par ailleurs, des stratégies similaires sont évaluées avec les cellules NK<sup>174,175</sup>.

- TIL purifiés

Dans les années 1980, Rosenberg *et al.* ont été les premiers à montrer l'activité antitumorale de TIL expansus *ex vivo* dans différents modèles murins<sup>176</sup>. Cet effet était potentialisé par l'addition d'IL-2 et l'utilisation d'un traitement lymphodéplétant mais non myéloablatif<sup>177</sup>. En effet, la lymphodéplétion permet de « créer de l'espace » pour les cellules infusées tout en réduisant la compétition pour les cytokines et en éliminant les cellules suppressives<sup>178</sup>. Chez l'Homme, cette stratégie a été appliquée avec succès dans des études de I/II chez des patients atteints de mélanomes métastatiques, avec plus de 40% de patients répondeurs<sup>179</sup>. L'expansion des TIL a aussi pu être réalisée dans plusieurs autres cancers comme les cancers du rein<sup>180</sup>, du sein<sup>181</sup>, du pancréas<sup>182</sup>, de l'ovaire<sup>183</sup> ou du poumon<sup>184</sup>. Néanmoins, une des limites de l'utilisation des TIL purifiés est la réactivité de ces derniers contre la tumeur. En effet, dans le mélanome, on retrouve une importante charge mutationnelle et donc de nombreux néo-antigènes, mais la situation est beaucoup plus variable dans les autres tumeurs solides<sup>185,186</sup>.

- Lymphocytes T modifiés génétiquement

Pour contrer le potentiel manque de réactivité des TIL, des stratégies visant à modifier des lymphocytes T pour leur faire exprimer un récepteur spécifique de la tumeur, et ainsi forcer la réactivité, ont été développées. Les antigènes pouvant être utilisés comme cible peuvent être

des antigènes de différenciation tissulaires, des molécules surexprimées par les cellules tumorales ou des antigènes viraux.

- Lymphocytes T transduits avec un TCR transgénique

Dans cette stratégie, un nouveau TCR complet est introduit dans les lymphocytes T en insérant des séquences codant pour les chaînes TCR- $\alpha$  et TCR- $\beta$ <sup>187</sup>. Ainsi, les cellules conservent leur régulation physiologique et nécessitent donc l'interaction avec un CMH pour s'activer. Les premières évidences du potentiel de cette stratégie ont été apportées en 2006 dans un essai clinique impliquant 17 patients atteints d'un mélanome métastatique<sup>188</sup>. La cible du TCR transgénique était l'antigène de différenciation tissulaire MART-1, présent dans plus de 80% des mélanomes<sup>189</sup>. L'utilisation d'autres cibles, incluant NY-ESO-1, les protéines MAGE ou l'épitope E6 du virus HPV16, a été évaluée depuis<sup>190-192</sup>. Concernant le type cellulaire, les lymphocytes T à un stade précoce de différenciation semblent être les plus favorables pour obtenir une réponse efficace<sup>193</sup>. Comme pour les TIL purifiés, l'addition d'IL-2 et d'un traitement lymphodéplétant permettent d'améliorer les performances de ces thérapies<sup>194</sup>.

- Cellules CAR-T

Les cellules CAR-T sont des lymphocytes T dans lesquels ont été introduites les séquences codant pour un récepteur chimérique. Ce récepteur est composé d'un domaine de reconnaissance de l'antigène (sous la forme d'un fragment variable simple chaîne (scFv)) couplé à la chaîne CD3-zêta et de domaines de co-stimulation, tels que CD28, OX40 ou 4-1BB<sup>195</sup>. Ainsi, ces lymphocytes T sont capables de s'activer indépendamment d'une stimulation par le CMH<sup>196</sup>. Plus récemment, une quatrième génération de CAR-T, capable de sécréter des cytokines après reconnaissance de l'antigène, a été développée<sup>197</sup>. La première cible visée avec succès est CD19 avec comme indications les leucémies B et le myélome multiple<sup>198,199</sup>. De nouvelles cibles émergent pour les CAR comme BMCA dans le myélome multiple<sup>200</sup>, HER2 dans le sarcome<sup>201</sup>, CAIX<sup>202</sup> dans le cancer du rein, EGFR dans le cholangiocarcinome<sup>203</sup> ou GD2 dans le neuroblastome<sup>204</sup>.

La thérapie par cellules CAR-T permet aux patients d'obtenir des rémissions complètes de leur cancer. Néanmoins, 10 à 20% d'entre eux ne répondent pas aux traitements et, 30 à 50% des répondeurs rechutent dans l'année suivant le traitement<sup>205,206</sup>. Ces chiffres soulèvent les défis associés aux thérapies par CAR-T qui s'étendent de la production des CAR-T (isolement des T autologues, phénotype des T transduits) et leur infusion, à la persistance de la réponse et

l'évolution de la pathologie (perte de l'antigène)<sup>207</sup>. De plus, la toxicité associée au traitement par CAR-T est non négligeable, en particulier avec les syndromes de relargage cytokiniques<sup>208</sup>.

Par ailleurs, une des principales limites des CAR-T reste leur efficacité limitée au-delà des cancers hématologiques. En effet, les tumeurs solides sont très hétérogènes rendant la détermination d'un antigène spécifique de l'ensemble de la tumeur délicate<sup>209</sup>. Pour contrer cela, plusieurs options sont envisagées : la génération de lymphocytes avec plusieurs CAR<sup>209</sup> ou des constructions permettant de stimuler les cellules immunitaires adjacentes afin d'élargir la réponse en libérant de l'IL-12 ou de l'IL-18<sup>197,210</sup>. De plus, comparée aux cancers hématologiques, l'accessibilité aux tumeurs solides est moindre du fait de la structure de l'endothélium vasculaire et de la matrice tumorale<sup>211</sup>. Enfin, l'environnement immunosuppresseur présent au sein de la tumeur peut affecter la capacité des CAR-T à exercer leurs fonctions cytotoxiques.

- Lymphocytes T édités par CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas correspond au système immunitaire adaptatif des procaryotes et est basé sur la reconnaissance spécifique d'une séquence d'ADN grâce à un petit ARN guide (sgRNA), puis le clivage de ladite séquence par l'enzyme Cas<sup>212</sup>. Ce mécanisme de défense bactérien a été détourné afin d'éditer des gènes dans à peu près n'importe quel type cellulaire. Dans le cadre de l'immunothérapie antitumorale par transfert adoptif, CRISPR-Cas9 est utilisé pour modifier la spécificité antigénique, augmenter la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T ou désactiver certains mécanismes inhibiteurs<sup>213</sup>.

Pour accroître la fonctionnalité des lymphocytes T en augmentant leur sécrétion de cytokines, CRISPR-Cas9 a été utilisé pour modifier la régulation du TCR en supprimant certains mécanismes régulateurs comme les diacylglycérol kinases<sup>214</sup> ou la tyrosine phosphatase PTPN2<sup>215</sup>. Concernant les mécanismes inhibiteurs, un KO du gène codant pour le récepteur II du TGF- $\beta$  (*TGFBR2*) a permis d'augmenter l'efficacité de CAR-T dans des modèles de xélogreffe en limitant la conversion en Treg et en prévenant l'épuisement des CAR-T<sup>216</sup>. De plus, il a été montré que la délétion de PD-1, CTLA-4 ou LAG-3 dans les lymphocytes T humains, notamment T CD8<sup>+</sup>, augmentait leur sécrétion d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$  *in vitro* et l'efficacité *in vivo* dans des modèles de xélogreffe<sup>217-220</sup>. Récemment, deux études cliniques, intégrant des lymphocytes T pour lesquels un KO de PD-1 a été effectué, ont été publiées. Dans la première, 3 patients ont été infusés avec des lymphocytes T transduits avec un TCR transgénique ciblant NY-ESO-1 et pour lesquels PD-1 et leur TCR d'origine ont été inactivés<sup>221</sup>.

Dans le cadre de la seconde étude clinique, 12 patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules avancé ont reçu des lymphocytes T rendus KO pour le gène PD-1 par CRISPR-Cas9<sup>222</sup>. L'efficacité de l'édition du gène PD-1 était limitée avec une médiane de 5,81%. Du fait de cette faible édition, l'efficacité était elle aussi limitée avec 1 seul patient répondeur avec une maladie stable.

## 6) Les anticorps monoclonaux

### Généralités

Au cours des dernières décennies, la place des anticorps monoclonaux n'a cessé de croître dans la prise en charge du cancer, en particulier dans les stades les plus avancés (Table 3). C'est en 1975 que les premiers anticorps monoclonaux apparaissent suite à la mise au point de la technique des hybridomes, qui permet d'immortaliser des lymphocytes B en les fusionnant avec des cellules de myélome<sup>153</sup>. Cette technique a permis de passer outre de nombreux inconvénients des sérums polyclonaux utilisés jusqu'alors (difficulté de production, variabilité inter-lots, risque infectieux, ...). Néanmoins, certaines limites liées à leur phénotype murin ont été mises en exergue : ceux-ci ont une demi-vie courte du fait de l'absence de liaison au FcRn, ils ne disposent pas des fonctions effectrices dépendantes des récepteurs Fc et ils sont immunogènes pour l'Homme. Grâce à l'essor des biotechnologies, ces limites ont pu être contournées par l'humanisation du fragment constant puis des fragments variables des anticorps monoclonaux<sup>223</sup>.

Table 3 : Liste des anticorps monoclonaux disposant d'une autorisation de mise sur le marché

DCI	Nom commercial	Cible	Format	1ère indication approuvée	1ère AMM
Relatlimab	Opdualag	LAG-3	IgG4 humaine	Mélanome	2022
Tebentafusp	Kimmtrak	gp100, CD3	Bispécifique immunoconjugué (TCR-scFV)	Mélanome uvéal métastatique	2022
Amivantamab	Rybrevent	EGFR; cMET	IgG1 bispécifique humaine	Cancer bronchique non à petites cellules	2021
Loncastuximab tesirine	Zynlonta	CD19	ADC, IgG1 humanisée	Lymphome diffus à grandes cellules B	2021
Tisotumab vedotin	Tivdak	Facteur tissulaire	ADC, IgG1	Cancer du col de l'utérus	2021
Sacituzumab govitecan	Trodelyv	TROP-2	ADC, IgG1 humanisée	Cancer du sein triple négatif	2020
Belantamab mafodotin	Blenrep	BCMA	ADC, IgG1 humanisée	Myélome multiple	2020
Isatuximab	Sarclisa	CD38	IgG1 chimérique	Myélome multiple	2020
Margetuximab	Margenza	HER2	IgG1 chimérique	Cancer du sein HER2 <sup>+</sup>	2020
Tafasitamab	Monjuvi, Minjuvi	CD19	IgG1 humanisée	Lymphome diffus à grandes cellules B	2020

DCI	Nom commercial	Cible	Format	1ère indication approuvée	1ère AMM
Cemiplimab	Libtayo	PD-1	IgG4 humaine	Carcinome épidermoïde cutané	2019
Enfortumab vedotin	Padcev	Nectin-4	ADC, IgG1 humaine	Cancer de la vessie	2019
Polatuzumab vedotin	Polivy	CD79b	ADC, IgG1 humanisée	Lymphome diffus à grandes cellules B	2019
Mogamulizumab	Poteligeo	CCR4	IgG1 humanisée	Lymphome T cutané	2018
Moxetumomab pasudotox	Lumoxiti	CD22	IgG1 murine couplé à une immunotoxine	Leucémie à tricholeucocytes	2018
Avelumab	Bavencio	PD-L1	IgG1 humaine	Carcinome à cellule de Merkel	2017
Inotuzumab ozogamicin	Besponsa	CD22	ADC, IgG4 humanisée	Leucémie aiguë lymphoblastique	2017
Durvalumab	Imfinzi	PD-L1	IgG1 humaine	Cancer de la vessie	2017
Dinutuximab beta	Qarziba	GD2	IgG1 chimérique	Neuroblastome	2017
Olaratumab	Lartruvo	PDGFR $\alpha$	IgG1 humaine	Sarcome des tissus mous	2016
Atezolizumab	Tencentriq	PD-L1	IgG1 humanisée	Cancer de la vessie	2016
Daratumumab	Darzalex	CD38	IgG1 humaine	Myélome multiple	2015
Elotuzumab	Empliciti	SLAMF7	IgG1 humaine	Myélome multiple	2015
Necitumumab	Portrazza	EGFR	IgG1 humaine	Cancer bronchique non à petites cellules	2015
Blinatumomab	Blincyto	CD19	BiTEs	Leucémie lymphoblastique	2014
Ramucizumab	Cyramza	VEGF	IgG1 humaine	Cancer de l'estomac	2014
Pembrolizumab	Keytruda	PD-1	IgG4 humaine	Mélanome	2014
Nivolumab	Opdivo	PD-1	IgG4 humaine	Mélanome	2014
Obituzumab	Gazyvaro	CD20	IgG1 humanisée	Leucémie lymphoïde chronique	2013
Trastuzumab emtansine	Kadcyla	HER2	ADC, IgG1 humanisée	Cancer du sein	2013
Pertuzumab	Perjeta	HER2	IgG1 humanisée	Cancer du sein	2012
Brentuximab	Adcetris	CD30	ADC, IgG1 chimérique	Maladie de Hodgkin	2011
Denosumab	Xgeva	RANKL	IgG2 humaine	Prévention des métastases osseuses	2011
Ipilimumab	Yervoy	CTLA-4	IgG1 humaine	Mélanome	2011
Ofatumumab	Arzerra	CD20	IgG1 humaine	Leucémie lymphoïde chronique	2009
Panitumumab	Vectibix	EGFR	IgG2 humaine	Cancer colorectal	2006
Bevacizumab	Avastin	VEGF	IgG1 humanisée	Cancer colorectal	2004
Cetuximab	Erbix	EGFR	IgG1 chimérique	Cancer colorectal	2004
Bevacizumab	Avastin	VEGF	IgG1 humanisée	Cancer colorectal	2004
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	CD20	Radio-conjugué, IgG1 murine	Lymphome non-hodgkinien	2002
Alemtuzumab	Campath	CD52	IgG1 humanisée	Leucémie lymphoïde chronique B	2001
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	CD33	ADC, IgG4 humanisée	Leucémie aiguë myéloïde	2000
Trastuzumab	Herceptin	HER2	IgG1 humanisée	Cancer du sein	1998
Rituximab	Rituxan, MabThera	CD20	IgG1 chimérique	Lymphome non-hodgkinien	1997

Un anticorps est constitué de 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères reliées par des ponts disulfures. Chaque chaîne est subdivisée en plusieurs domaines dont 1 est variable. Selon le nombre et l'organisation des domaines constants de la chaîne lourde, on peut définir 5 grandes classes d'anticorps (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD), elles-mêmes divisées en sous-classes avec des caractéristiques spécifiques<sup>224</sup>. D'un point de vue fonctionnel, un anticorps dispose de 2 fragments de liaison à l'antigène (Fab) et d'un fragment constant (Fc pour fragment cristallisable). Sur les domaines variables des chaînes lourdes et légères, on retrouve les CDRs (*Complementary Determining Regions*) qui sont le support de la reconnaissance anticorps/antigène. Le Fc, quant à lui, supporte les fonctions effectrices des anticorps en interagissant avec le système du complément ou les récepteurs Fc (FcR) exprimés notamment par les cellules immunitaires (Table 4)<sup>225</sup>. Les propriétés effectrices des anticorps monoclonaux peuvent être réparties dans 4 modalités non-exclusives :







- La liaison à l'antigène : cette interaction peut neutraliser des facteurs solubles, bloquer l'activité de récepteurs cellulaires en empêchant la liaison avec leur ligand ou la formation de multimères fonctionnels (antagoniste) ou au contraire, stimuler ces récepteurs directement (agoniste)
- La cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) : la reconnaissance des Fc des anticorps fixés sur les cellules tumorales (ou régulatrices) par les cellules effectrices de l'immunité (macrophages, NK, ...) va activer ces dernières et aboutir à la lyse des cellules sur lesquelles les anticorps se sont fixés
- La phagocytose à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCP) : en recouvrant la surface des cellules tumorales (opsonisation), les anticorps peuvent faciliter la phagocytose de ces cellules par celles du système immunitaire via des interactions Fc/FcR
- L'activation du complément (CDC) : la liaison du C1q aux portions Fc des anticorps va permettre l'activation de la cascade du complément et aboutir à la lyse des cellules.

Les IgG1 et IgG3 disposent d'importantes capacités fonctionnelles dépendantes du Fc contrairement aux autres classes d'anticorps dont la fonctionnalité est quasi exclusivement dépendante de la liaison à l'antigène, à l'exception des IgM, capable d'activer le complément ou des IgE impliquées dans la dégranulation des mastocytes dans les phénomènes d'allergie<sup>225-</sup>

<sup>227</sup>.



Table 4 : Les récepteurs Fc (D'après Gogesch et al.)<sup>225</sup>

						
Name	FcyRI	FcyRIIa	FcyRIIb	FcyRIIc	FcyRIIIa	FcyRIIIb
CD	CD64	CD32a	CD32b	CD32c	CD16a	CD16b
Gene	<i>FCGR1A</i>	<i>FCGR2A</i>	<i>FCGR2B</i>	<i>FCGR2B</i>	<i>FCGR3A</i>	<i>FCGR3B</i>
Affinity	High	Low to medium	Low to medium	Low to medium	Low to medium	Low to medium
Major role	Activation	Activation	Inhibition	Activation	Activation	Decoy Activation
Human IgG interaction	IgG1, IgG3, IgG4	IgG3, IgG1, IgG2, IgG4	IgG3, IgG1, IgG4	IgG3, IgG1	IgG1, IgG3, IgG4	IgG1, IgG3
Cell type	Monocytes DCs (Neutrophils) (Mast cells) (Macrophages)	Monocytes Neutrophils DCs Macrophages Basophils Eosinophils Mast cells Platelets	B cells Monocytes DCs Macrophages Eosinophils Basophils (Neutrophils) (Activated T cells)	NK cells Monocytes Neutrophils	NK cells Monocytes (Macrophages) (Activated T cells)	Neutrophils (Basophils)

Les anticorps monoclonaux utilisés en cancérologie peuvent être classés en 3 grandes catégories selon leur cible et le mécanisme d'action associé :

- Les anticorps dont l'objectif primaire est d'empêcher directement le développement tumoral en ciblant directement des molécules exprimées par la tumeur ou celles impliquées dans la mise en place de son microenvironnement
- Les anticorps visant des récepteurs inhibiteurs exprimés par les cellules immunitaires ou les ligands de ceux-ci pour lever l'inhibition dépendante de l'interaction entre ces récepteurs et leurs ligands
- Les anticorps visant des récepteurs activateurs exprimés par les cellules immunitaires pour augmenter leur activité

### Anticorps à action primaire sur le développement tumoral

Ces anticorps vont cibler préférentiellement des molécules surexprimées par la tumeur voire exprimées exclusivement par celle-ci ou des facteurs solubles impliqués dans l'oncogenèse. Dans cette catégorie, on peut citer les anticorps ciblant les récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGF) EGFR et HER2 ou les anticorps ciblant le VEGF. Les membres de la famille de l'EGFR sont impliqués dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules. En contexte tumoral, ceux-ci sont régulièrement surexprimés<sup>228</sup>. Ainsi, les anticorps ciblant EGFR et HER2 agissent en se liant à leur cible ce qui va empêcher l'interaction avec ses ligands (EGFR)<sup>229</sup> et son homodimérisation (HER2)<sup>230</sup> et ainsi, limiter leur fonctionnalité. De plus, ces anticorps vont aussi pouvoir permettre la lyse des cellules tumorales par ADCC via leur fragment Fc<sup>231,232</sup>. Les anticorps ciblant des facteurs solubles

comme le VEGF vont limiter la vascularisation de la tumeur et ainsi son approvisionnement en ressources<sup>233</sup>.

L'action de ces anticorps peut se faire de manière indirecte en transportant vers les cellules tumorales des molécules cytotoxiques ou des radio-isotopes. Dans ce cas, le critère principal pour la sélection de la cible est la spécificité d'expression par la tumeur. Parmi ces cibles, on peut citer la protéine Nectin-4 qui est normalement restreinte à l'embryogenèse, mais dont l'expression a été rapportée dans de nombreux cancers<sup>234,235</sup> ou l'antigène de maturation B (BCMA) exprimé préférentiellement par les lymphocytes B matures et surexprimé dans le myélome multiple<sup>236</sup>.

### **Les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (« immune checkpoint blockade »)**

Physiologiquement, la réponse T est régulée par l'intermédiaire d'un équilibre entre signaux de co-stimulation et signaux de co-inhibition (« immune checkpoints »). Suite à leur activation, les lymphocytes T vont exprimer différents récepteurs inhibiteurs au cours du temps. La stimulation de ces récepteurs de co-inhibition va permettre le retour à un état d'équilibre, le maintien de la tolérance au soi et la prévention des dommages tissulaires induits lors de la réponse contre des agents pathogènes<sup>237</sup>. Certaines tumeurs sont capables d'exprimer certains ligands de molécules de co-inhibition, participant ainsi à l'échappement immunitaire en limitant l'activation des lymphocytes T. Pour tenter de lever ces inhibitions, des anticorps ciblant les molécules de co-inhibition ou leurs ligands ont été développés. Les premières cibles qui ont été autorisées pour un usage en clinique chez l'Homme sont CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) et la paire récepteur/ligand PD-1/PD-L1 (*Programmed cell death (ligand) 1*). En 2022, un anticorps ciblant LAG-3 (*Lymphocyte-activation gene 3*), un troisième axe inhibiteur, a été autorisé par la FDA chez l'Homme dans le mélanome en association avec un anti-PD-1.

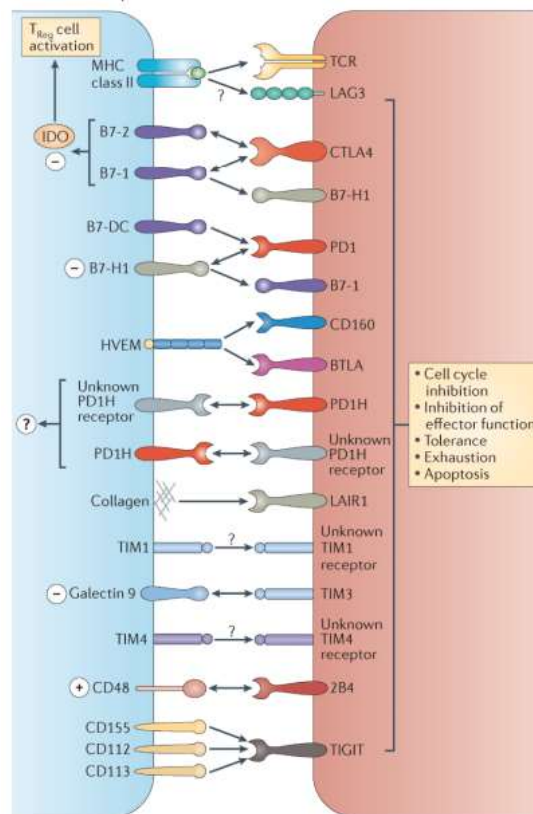


Figure 9 : Les molécules de co-inhibition exprimées par les lymphocytes T et leurs ligands (Adapté de Chen & Flies, Nat Rev Immunol, 2013)<sup>237</sup>. Les molécules exprimées par les lymphocytes T sont présentées sur la partie droite (rouge) et leurs ligands respectifs exprimés par les CPA ou les cellules tumorales sont sur la partie gauche (bleu).

- **CTLA-4**

CTLA-4 est la première molécule de co-inhibition à avoir été ciblée. Ce récepteur est exprimé majoritairement par les lymphocytes T, mais aussi certaines cellules NK intratumorales<sup>238</sup> et intervient dans la régulation précoce de l'activation T. En effet, CTLA-4 est un homologue de la molécule de co-activation CD28 et partage ses 2 ligands CD80 et CD86, pour lesquels son affinité est beaucoup plus importante<sup>239-241</sup>. Contrairement à CD28, CTLA-4 a pour fonction d'inhiber l'activation des lymphocytes T. En effet, dans des modèles murins KO pour CTLA-4, les animaux développent des syndromes lymphoprolifératifs fatals en moins de 1 mois, associés à une activation massive des lymphocytes T<sup>242</sup>. Bien qu'exprimée constitutivement dans les Treg et seulement induit dans les autres lymphocytes T<sup>239,243</sup>, le rôle de CTLA-4 dans les lymphocytes T conventionnels (Tconv) n'est pas négligeable. En effet, le phénotype précédemment décrit existe, mais avec une sévérité plus modérée dans des souris KO uniquement dans les Treg, montrant que l'expression CTLA-4 par les Tconv permet une régulation partielle de l'activation de ceux-ci<sup>244</sup>. Une autre différence entre CD28 et CTLA-4 est la localisation des protéines, en effet, CTLA-4 est majoritairement retrouvé dans des

vésicules intracellulaires avec un *turn-over* rapide à la membrane contrairement à CD28 qui est constitutivement exprimé à la surface des lymphocytes T<sup>245,246</sup>.

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le mécanisme d'action de CTLA-4. Le premier envisage une simple compétition entre CD28 et CTLA-4 pour leurs ligands<sup>247</sup>, potentiellement associée à une signalisation inhibitrice. En effet, il a été rapporté que CTLA-4 pouvait, via sa queue cytoplasmique, interagir avec la voie PI3-kinase et donc être associé à une signalisation intracellulaire<sup>248</sup>. D'autres protéines peuvent s'associer à CTLA-4 parmi lesquelles, 2 phosphatases (SHP-2 et PP2A) et ce, malgré l'absence de motif inhibiteur ITIM<sup>249,250</sup>. Cependant, ces modèles sont mis en difficultés par le fait que le syndrome lymphoprolifératif associé au KO de CTLA-4 est corrigé par la présence de cellules sauvages dans des modèles de souris chimères, soulignant l'existence d'un mécanisme extrinsèque<sup>251</sup>. Ce mécanisme extrinsèque a été décrit en 2011 par Qureshi *et al.* : la trans-endocytose de CD80 et CD86<sup>122</sup>. Ainsi, lors de l'engagement de CD80 et CD86, CTLA-4 arracherait ces derniers aux CPA puis l'ensemble serait transporté en intracellulaire, dégradé et CTLA-4 serait recyclé à la surface de la cellule ; limitant la quantité des molécules CD80 et CD86 disponible à la surface des CPA. Par ailleurs, CTLA-4 serait aussi impliqué dans l'induction de l'expression de TGF- $\beta$  par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et d'IDO par les DC<sup>252,253</sup>.

Compte tenu de l'importance de la co-stimulation fournie par les CPA dans la mise en place de la réponse antitumorale, CTLA-4 a été le premier point de contrôle immunitaire ciblé pour le traitement du cancer. Dès le milieu des années 90, il a été montré que l'utilisation d'anticorps bloquant CTLA-4 permettait un rejet tumoral et ce, dans plusieurs modèles de cancer<sup>254-258</sup>. Néanmoins, ce rejet semble corrélé avec l'immunogénicité de la tumeur. Ainsi, des stratégies combinant un anti-CTLA-4 avec différents immunomodulateurs comme le GM-CSF ou la chimiothérapie ont été testés avec succès<sup>259,260</sup>. Ces résultats précliniques prometteurs ont abouti à la génération de 2 anticorps monoclonaux humanisés : l'ipilimumab et le tremelimumab. Lors des essais cliniques, ces 2 anticorps ont montré une efficacité limitée ( $\approx$ 10-20% de patients répondeurs) associée à une toxicité importante avec près de 30% d'effets indésirables d'origine immunitaire<sup>261,262</sup>. Néanmoins, malgré la faible proportion de patients répondeurs, cette réponse est maintenue dans le temps après l'arrêt du traitement<sup>263,264</sup>. Suite à deux essais de phase III comparant l'efficacité de l'ipilimumab en association avec la dacarbazine ou la vaccination gp100 et la dacarbazine ou la vaccination seule, l'ipilimumab a été autorisé dans le traitement du mélanome<sup>263,265,266</sup>. Le tremelimumab n'a, quant à lui, pas pu montrer sa supériorité face aux traitements de référence<sup>267</sup>. Le mécanisme d'action des

anticorps anti-CTLA-4 est encore aujourd'hui largement débattu. Les 2 hypothèses principales s'orientent autour du blocage de l'interaction entre CTLA-4 et CD80/CD86, et la déplétion des Treg (Figure 10)<sup>268</sup>.

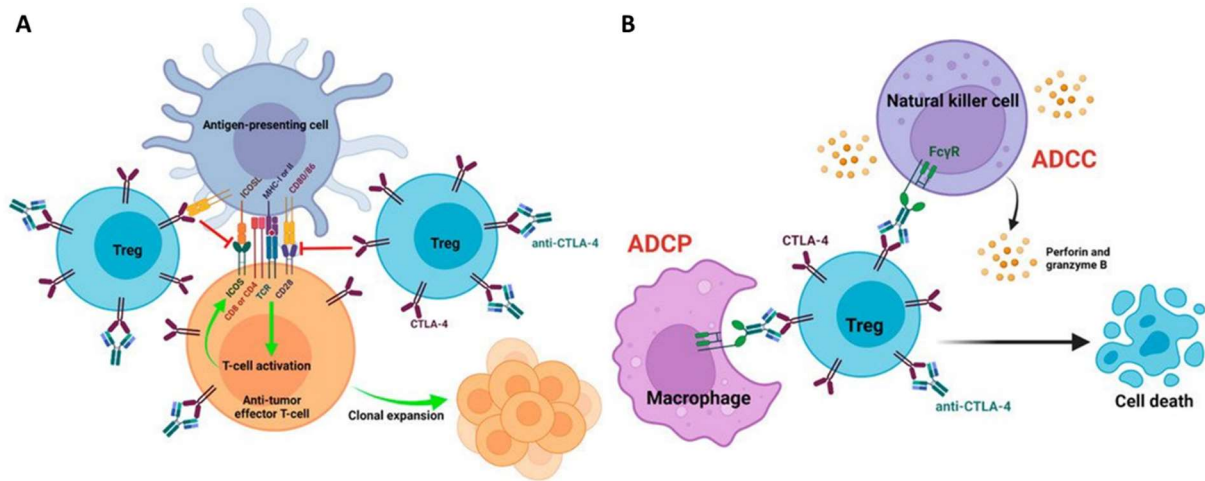


Figure 10 : Les mécanismes d'action potentiels des anticorps ciblant CTLA-4. (Adapté de Hong & Maleki Vareki, *Cancers*, 2022)<sup>268</sup> (A) Le blocage de l'interaction entre CTLA-4 et CD80/86 permettrait l'engagement de ces derniers par CD28 et donc la co-stimulation des lymphocytes T effecteurs. (B) En se fixant sur CTLA-4 exprimé par les Treg, l'anti-CTLA-4 rendrait ces cellules susceptibles à la lyse par les NK ou la phagocytose par les macrophages.

- **PD-1/PD-L1**

PD-1 est une protéine transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines dont l'expression est induite à la surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> suite à leur activation<sup>269</sup>. L'engagement de PD-1 avec un de ces ligands, PD-L1 et PD-L2, conduit à l'activation de la phosphatase SHP-2 qui vont inhiber les kinases impliquées dans le processus d'activation T<sup>270,271</sup>. Contrairement à CTLA-4, l'inhibition exercée par PD-1 sur la réponse immunitaire intervient après l'activation pour permettre un retour à l'état basal et ainsi, limiter les réponses excessives et l'autoimmunité<sup>269,272,273</sup>. En cas de stimulation prolongée des lymphocytes T par un antigène (infection chronique/cancer), l'expression de PD-1 se maintient à des niveaux élevés et s'accompagne de l'expression d'autres molécules inhibitrices, de modifications épigénétiques et de changements dans l'expression de facteurs de transcription aboutissant à la différenciation des T vers un stade dit d'épuisement<sup>274</sup>. Par ailleurs, l'expression de PD-1 n'est pas limitée aux lymphocytes T, on le retrouve aussi exprimé par les NK, les LB et les macrophages avec une fonction régulatrice<sup>275-277</sup>. De plus, PD-1 est aussi exprimé par les Treg, où il jouerait un rôle dans le développement, la maintenance et la fonction de ceux-ci<sup>278</sup>. Néanmoins, d'autres données suggèrent que PD-1 aurait aussi des propriétés inhibitrices sur ces cellules<sup>279,280</sup>. Quant aux ligands de PD-1, PD-L1 et PD-L2, tous deux sont largement

exprimés par les CPA mais aussi d'autres types cellulaires hématopoïétiques ou non, incluant les cellules tumorales avec un pronostic variable<sup>281,282</sup>.

Tous ces éléments ont abouti à l'hypothèse que le blocage de l'interaction entre PD-1 et ses ligands devrait favoriser la réponse antitumorale. Cette hypothèse a été vérifiée chez la souris en 2005 avec la démonstration que l'utilisation d'anticorps ciblant PD-1 ou PD-L1 permettait d'induire un rejet tumoral dans différents modèles murins de cancer<sup>283</sup>. Chez l'Homme, les anti-PD-1 ont montré leur efficacité, en particulier dans le mélanome, avec des taux de réponse de 16 à 75% selon les études, plus de 70% de survie à 1 an, 34% de survie à 5 ans et une meilleure tolérance que les anti-CTLA-4<sup>284,285</sup>. Ainsi, les 2 premiers anti-PD-1 (pembolizumab et nivolumab) ont obtenu une autorisation de mise sur le marché en 2014 dans cette indication puis dans de nombreux autres cancers par la suite. A ce jour, quatre anticorps ciblant PD-1 (pembrolizumab, nivolumab, cemiplimab et dostarlimab) et trois anticorps ciblant PD-L1 (atezolizumab, durvalumab et avelumab) ont été autorisés par la FDA<sup>286</sup>. D'un point de vue mécanistique, le blocage de l'interaction PD-1/PD-L1 empêche la signalisation inhibitrice de PD-1. De plus, des données obtenues chez la souris indiquent que l'utilisation d'un anti-PD-1 permet de restaurer la fonction d'un sous-type de lymphocytes T épuisés exprimant le facteur de transcription TCF1<sup>287,288</sup>. Par ailleurs, le traitement avec les anti-PD-1 peut aussi affecter d'autres sous-types comme les cellules myéloïdes. En effet, une analyse longitudinale de l'infiltrat tumorale, effectuée chez la souris, montre qu'en présence d'anti-PD-1, le compartiment myéloïde est remodelé d'un profil M2-like vers un profil M1-like<sup>289</sup>.

Pour tenter d'accroître la part de patients répondeurs, de nombreuses combinaisons de traitement associant les anti-PD-1/PD-L1 sont évaluées chez la souris et chez l'Homme, en témoigne la part croissante des combinaisons dans les essais cliniques des anti-PD-1/PD-L1<sup>286,290</sup>. Parmi les premières testées, on peut citer l'association anti-PD-1/anti CTLA-4. Cette combinaison a été associée, chez la souris, à une augmentation significative du rejet tumoral et de la survie des animaux dans un modèle de vaccination antitumorale<sup>291</sup>. En outre, chez l'Homme, la combinaison du nivolumab et de l'ipilimumab est associée à une augmentation de taux de réponse et de la médiane de survie dans plusieurs cancers dont le mélanome métastatique, le carcinome rénal avancé et le cancer du côlon avec instabilité des microsatellites et défaut de réparation des mésappariements<sup>292</sup>. Cependant, ce gain d'efficacité se fait au prix d'une toxicité fortement accrue<sup>293</sup>.

Plus récemment, la combinaison anti-PD-1/anti-LAG-3 a été mise en avant avec l'autorisation de mise sur le marché du relatlimab, un anti-LAG-3, dans le traitement du

mélanome. En effet, chez la souris, l'utilisation d'anticorps ciblant PD-1 et LAG-3 permet un rejet tumoral complet dans la majorité des animaux<sup>294</sup>. Lors des études cliniques associant le relatlimab au nivolumab, la médiane de survie sans progression a été plus que doublée avec l'association (10,2 mois contre 4,6 mois pour le nivolumab seul) et les taux de survie à 1 et 2 ans ont été accrus d'environ 5%, avec une toxicité modérée<sup>295</sup>.

Enfin, d'autres combinaisons sont évaluées comme celles avec de la chimiothérapie, la radiothérapie, des inhibiteurs de l'angiogenèse ou encore des cytokines/anticorps agonistes afin de favoriser l'initiation de la réponse et/ou stimuler l'activité des lymphocytes T désinhibés par les anti-PD-1/PD-L1<sup>296</sup>.

De nombreuses autres molécules de co-inhibition sont en cours d'évaluation préclinique et clinique pour l'immunothérapie du cancer parmi lesquelles on retrouve BTLA et son ligand/récepteur HVEM.

- **HVEM/BTLA**

HVEM (*Herpes Virus Entry Mediator*) est un membre de la superfamille des récepteurs au TNF (*TNFRSF14*). HVEM interagit avec de nombreux ligands incluant, les membres de la superfamille du TNF, LIGHT et la lymphotoxine  $\alpha$ , et les ligands de la famille des immunoglobulines, BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*) et CD160, ainsi que la glycoprotéine D du virus Herpès simplex (Figure 11)<sup>297</sup>. HVEM, comme ses ligands, est largement exprimé par les cellules immunitaires et des cellules non-immunitaires incluant les cellules épidermiques et endothéliales ainsi que certains neurones<sup>298</sup>.

Les interactions entre HVEM et ses ligands font intervenir certains des 4 domaines riches en cystéines (CRD) composant le domaine extracellulaire d'HVEM selon la molécule considérée. En effet, LIGHT va interagir avec les CRD2 et CRD3, là où BTLA et CD160 vont se lier à HVEM via le CRD1. De plus, la signalisation associée à l'engagement d'HVEM et de BTLA ou CD160 est bidirectionnelle. En effet, l'engagement d'HVEM, quel que soit le ligand, aboutit à une augmentation de l'activation, de la survie et des fonctions effectrices<sup>299</sup>. La signalisation associée implique le recrutement des protéines TRAF, en particulier TRAF2<sup>300</sup>, et l'activation de la voie NF $\kappa$ B. La stimulation de la voie PI3K/AKT a aussi été rapportée suite à l'engagement d'HVEM<sup>301</sup>.

A l'inverse, l'engagement de BTLA, en tant que récepteur, conduit à un signal inhibiteur dépendant des phosphatases SHP1 et SHP2, à l'instar de PD-1, limitant la phosphorylation de

CD3 $\zeta$  et ainsi la cascade de signalisation TCR et donc, l'activation des lymphocytes T<sup>302</sup>. Néanmoins, bien que les protéines BTLA et PD-1 soient structurellement similaires, celles-ci sont non redondantes dans leurs mécanismes d'inhibition de l'activation des lymphocytes T. En effet, BTLA va recruter préférentiellement SHP1 contrairement à PD-1 dont l'activité passe par SHP2<sup>303</sup>. Des travaux récents de Xu *et al.* suggèrent l'existence d'un mécanisme supplémentaire d'inhibition transitoire de l'activation T, indépendant des phosphatases SHP1 et SHP2<sup>303</sup>. Par ailleurs, l'engagement de BTLA a aussi été associé au recrutement de la protéine GRB2 et d'une sous-unité de PI3K, activant la voie AKT et aboutissant à un signal favorisant la survie cellulaire<sup>304</sup>.

Pour CD160, la signalisation semble dépendante du type cellulaire et du contexte. En effet, CD160 existe sous 2 formes : une forme à ancre GPI pouvant être clivée et une forme transmembranaire. La forme transmembranaire est associée à l'activation des cellules NK via les voies de signalisations Erk1/2 et PI3K<sup>305,306</sup>. A l'opposé, l'engagement de CD160 par HVEM est associé à un signal inhibiteur dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup><sup>307</sup>. Pour les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, le signal associé à l'engagement de CD160 est moins clair et semble dépendant du contexte. Par ailleurs, la forme soluble de CD160 possède des propriétés inhibitrices du fait de sa compétition avec la forme transmembranaire pour le CMH de classe I, le second ligand de CD160<sup>308</sup>.

Les interactions entre HVEM et ses ligands peuvent s'effectuer non seulement suite à l'interaction entre 2 cellules différentes (interaction en « trans ») mais aussi sur une même cellule (interaction en « cis »)<sup>299</sup>. La formation du complexe HVEM-BTLA en « cis » empêche les interactions en « trans » avec d'autres ligands que LIGHT membranaire<sup>309</sup>. De même, LIGHT peut perturber les interactions entre HVEM et BTLA en « trans » de manière non compétitive. En cas d'interaction en « cis », le signal inhibiteur délivré par BTLA est dominant sur le signal NF $\kappa$ B activateur normalement généré par la stimulation d'HVEM<sup>310</sup>. Concernant CD160 et LIGHT, une étude récente a montré que l'engagement d'HVEM en « cis » par ces 2 molécules induit un fort signal de co-stimulation via NF $\kappa$ B<sup>310</sup>.



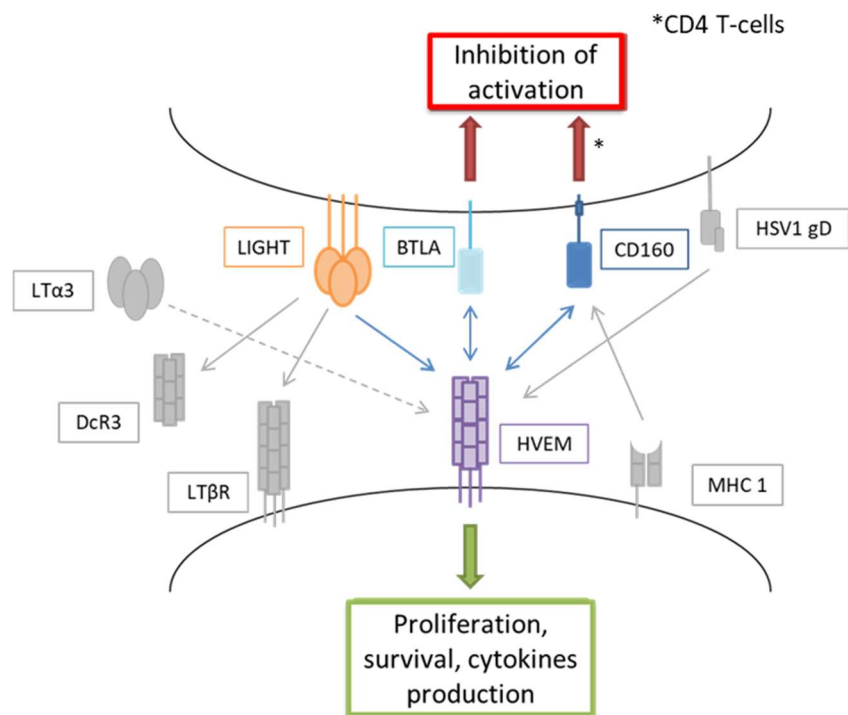


Figure 11 : Le réseau d'interaction d'HVEM

La présence de la protéine HVEM a aussi été rapportée à la surface des cellules tumorales. En effet, d'après les données du « *Human Protein Atlas* », près de 40% des tumeurs exprimeraient HVEM, avec un fort niveau d'expression dans plus de 25% des cancers thyroïdiens, colorectaux, urothéliaux, rénaux, prostatiques et des lymphomes et mélanomes testés<sup>311,312</sup>. Par ailleurs, Migita *et al.* ont pu mettre en évidence, dans le cancer de l'œsophage, qu'HVEM était surexprimé par le tissu tumoral comparé au tissu sain adjacent<sup>313</sup>. Depuis 2014, une dizaine d'études se sont intéressées au pronostic associé à l'expression d'HVEM par la tumeur. Dans la majorité de celles-ci, une forte expression d'HVEM était associée avec un mauvais pronostic (Table 5).

Table 5 : Pronostic associé à l'expression d'HVEM par la tumeur

Cancer	N (niveau d'expression d'HVEM)	Association avec le pronostic	Référence
Cancer colorectal	234 (119 high/115 low)	✓ (mauvais)	Inoue (2015) <sup>314</sup>
Cancer gastrique	136 (61 high/75 low)	✓ (mauvais)	Lan (2017) <sup>315</sup>
Carcinome œsophagien	103 (42 high/61 low)	✓ (mauvais)	Migita (2014) <sup>313</sup>
Cancer du pancréas	224 (47 high/161 low)	✓ (bon)	Sideras (2017) <sup>316</sup>

Cancer	N (niveau d'expression d'HVEM)	Association avec le pronostic	Référence
Cancer du sein	1005 (166 pos/839 neg)	✓ (mauvais)	Tsang (2017) <sup>317</sup>
Carcinome hépatocellulaire	150 (66 high/84 low)	✓ (mauvais)	Hokuto (2015) <sup>318</sup>
	154 (136 high/13 low)	✓ (bon)	Sideras (2017) <sup>319</sup>
	221 (82 high/139 low)	✓ (mauvais)	Yi (2020) <sup>320</sup>
Cholangiocarcinome	102 (52 high/50 low)	✓ (bon)	Ma (2021) <sup>321</sup>
Cancer de la vessie	402 (201 high/201 low)	✓ (bon)	Zhu (2018) <sup>322</sup>
Cancer du poumon non à petites cellules	415 (77 pos/338 neg)	✗	Ren (2018) <sup>323</sup>
Cancer du rein à cellules claires	140 (99 high/41 low)	✓ (mauvais)	Tang (2019) <sup>324</sup>
Cancer du foie métastatique	104 (49 high/55 low)	✓ (mauvais)	Sasaki (2019) <sup>325</sup>
Mélanome	116 (51 high/65 low)	✓ (mauvais)	Malissen (2019) <sup>326</sup>

Concernant l'impact de cette expression sur la réponse immunitaire antitumorale, une baisse du nombre des TIL a été observée dans les cancers de l'œsophage, hépatocellulaires et colorectaux<sup>313,314,318</sup>. Cette réduction en nombre était associée à une diminution de l'expression d'enzymes et de cytokines inflammatoires telles que le granzyme, la perforine et l'IFN $\gamma$ <sup>318</sup>. Ces données confirment les résultats obtenus précédemment par Derré *et al.* dans le mélanome<sup>327</sup>. L'ensemble de ces données suggèrent qu'HVEM pourrait jouer un rôle critique dans l'immuno-évasion de certaines tumeurs en interagissant avec son ligand inhibiteur, BTLA, exprimé par les TIL. Cette hypothèse est appuyée par plusieurs études *in vitro* et *in vivo*, menées principalement avec des cellules murines. Tout d'abord, en 2009, Han *et al.* ont montré que le traitement de souris avec une forme soluble de la protéine BTLA, afin d'entrer en compétition avec le ligand naturel, permettait de réduire le poids des tumeurs et d'augmenter la sécrétion d'IL-2 et d'IFN $\gamma$  par les TIL<sup>328</sup>. Quelques années plus tard, l'utilisation d'un siRNA pour bloquer l'expression d'HVEM par la tumeur a permis d'obtenir des résultats similaires avec une lignée murine de cancer colorectal<sup>313</sup>. Enfin, une dernière étude a pu mettre en évidence que le blocage de BTLA, associée à une chimiothérapie permettait de réduire le volume tumoral dans un modèle murin de tumeurs péritonéales via une action sur les lymphocytes B<sup>329</sup>.

## **Anticorps agonistes des cellules effectrices cytotoxiques**

Par opposition aux points de contrôle inhibiteurs dont la fonction est de modérer la réponse immunitaire afin d'éviter une activation excessive, il existe des points de contrôle activateurs qui vont pouvoir favoriser l'activation des cellules effectrices de l'immunité. Ainsi, l'utilisation d'anticorps agonistes de ces molécules doit permettre de stimuler ces cellules effectrices et ainsi promouvoir la réponse immunitaire antitumorale.

- **4-1BB/4-1BB-L**

4-1BB (CD137, TNFRSF9) est un récepteur de la superfamille du TNF. Il a été identifié à la surface de nombreux types cellulaires activés dont les lymphocytes T, les NK, les lymphocytes B ou les DC<sup>330</sup>. De plus, 4-1BB a été identifié comme étant un marqueur majeur des Treg intratumoraux<sup>331</sup>. A ce jour, un seul ligand de 4-1BB a été décrit : 4-1BB-L (TNFSF9), retrouvé à la surface des CPA et de certaines cellules tumorales<sup>330,332</sup>. Sur les lymphocytes T, la stimulation TCR est associée avec une expression transitoire de 4-1BB. L'engagement de 4-1BB avec son ligand aboutit à un signal de co-stimulation puissant faisant intervenir les voies NFκB, MAPK et ERK3 via TRAF1 et TRAF2, associé à la prolifération, la sécrétion d'IL-2 et d'IFNγ<sup>333</sup>, ainsi qu'à l'augmentation de l'expression de Bcl-x<sub>L</sub> et Bfl-1 favorisant ainsi la survie des lymphocytes T<sup>334</sup>.

L'interaction entre 4-1BB et 4-1BB-L a aussi des conséquences sur la cellule exprimant le ligand. En effet, des modifications du métabolisme des monocytes/macrophages favorisant la prolifération cellulaire ont été rapportées<sup>335,336</sup>. Ces modifications font intervenir la voie de signalisation AKT/mTOR avec le concours d'une tyrosine kinase SRC<sup>336</sup>. Une autre étude mentionne l'implication de la voie de signalisation des MAPK et ERK1,2 dans les monocytes humains<sup>337</sup>. Pour les lymphocytes, une étude menée chez la souris a mis en évidence que pour les cellules exprimant 4-1BB-L, la signalisation associée pouvait inhiber l'activation en condition non-inflammatoire<sup>338</sup>. Dans ce cas, 4-1BB exprimé suite à l'activation serait séquestré par son ligand en « cis » et internalisé, limitant la co-stimulation en « trans ». De plus, 4-1BB-L serait capable de transduire directement un signal inhibiteur.

En contexte tumoral, une étude récente a mis en évidence le rôle d'un rétrosignal, consécutif à l'interaction 4-1BB/4-1BB-L, limitant l'accumulation des lymphocytes B pathologiques dans un modèle de lymphome murin<sup>339</sup>. Dans des lignées de cancer du poumon non à petites cellules, le rétrosignal passant par 4-1BB-L est accompagné de l'inhibition de la prolifération et de l'induction de l'apoptose<sup>340</sup>. Des résultats similaires ont été obtenus dans le

myélome multiple<sup>341</sup>. A l'inverse, dans le cancer du côlon, Ge *et al.* ont mis en évidence un rôle du 4-1BB-L nucléaire dans la prolifération et la capacité d'invasion des cellules tumorales en limitant l'accumulation de Gsk3 $\beta$ , un régulateur de la voie Wnt<sup>342</sup>.

Dans des modèles précliniques murins de sarcome (faiblement immunogène) et de mastocytome (fortement immunogène), l'utilisation d'anticorps agonistes de 4-1BB conduit à un rejet massif des tumeurs<sup>343</sup>. Ces résultats ont été confirmés dans divers autres modèles, soulignant l'effet de ces anticorps sur la rupture de la tolérance à la tumeur<sup>344,345</sup>. Sur la base de ces résultats, 2 anticorps agonistes ciblant 4-1BB humain, l'urelumab et l'utomilumab, ont été développés<sup>346</sup>. L'urelumab en monothérapie a rapidement été mis de côté du fait de la forte toxicité hépatique associée, il est actuellement testé à faible dose en association avec le nivolumab. A l'opposé, du fait de son faible agonisme, l'utomilumab est peu toxique mais aussi, peu efficace et est aussi en cours d'évaluation en combinaison avec le pembrolizumab ou des thérapies à base de transfert adoptif<sup>346</sup>.

- **ICOS/ICOSLG**

ICOS (CD278) est une autre molécule de co-stimulation de la famille de CD28 et est exprimée à la surface des lymphocytes T (effecteurs et régulateurs) suite à une activation TCR. Un seul ligand a été identifié pour ICOS : ICOS ligand (ICOSLG, CD275). ICOSLG est exprimé à la surface des CPA, incluant les macrophages, les DC et les lymphocytes B, mais aussi à la surface de certaines cellules non-hématopoïétiques, dont certaines cellules tumorales, et des cellules endothéliales<sup>347,348</sup>. L'expression d'ICOSLG est augmentée en présence de cytokines inflammatoires dont le TNF- $\alpha$  et s'accompagne du recrutement de cellules effectrices au sein des tissus<sup>347</sup>. C'est notamment le cas dans le cas du rejet de greffe allogénique<sup>349</sup>.

A l'instar de CD28, ICOS est impliqué dans les processus de prolifération, de survie et de différenciation des lymphocytes T, notamment via la voie PI3K/AKT<sup>350</sup>. Néanmoins, contrairement à ce dernier, la stimulation d'ICOS ne permet pas la synthèse d'IL-2<sup>351</sup>. ICOS est aussi impliqué dans le processus de différenciation des lymphocytes T folliculaires en régulant le facteur de transcription c-Maf<sup>352</sup> et joue un rôle majeur dans la stabilité du centre germinatif<sup>353</sup>. De plus, l'interaction entre ICOS et ICOSLG est associée à un rétrosignal. Celui-ci a notamment été observé avec les DC où l'engagement d'ICOSLG induit la sécrétion d'IL-6 via la phosphorylation des MAPK<sup>354</sup>.

De par son expression sur les cellules effectrices et régulatrices, ICOS peut être impliqué dans des processus pro- et antitumoraux. En effet, ICOS joue un rôle majeur dans l'amplification de la réponse T CD8<sup>+</sup> cytotoxique<sup>355</sup>. De plus, ICOS est aussi impliqué dans la

fonction et le maintien des Treg et leur sécrétion d'IL-10 et de TGF- $\beta$ <sup>356</sup>. Par ailleurs, l'expression d'ICOSLG a été rapportée dans certains cancers hématologiques mais aussi dans plusieurs tumeurs solides incluant le cancer colorectal, le glioblastome (pas d'expression au niveau du tissu sain) ou le mélanome<sup>357-360</sup>. Dans le cancer colorectal, l'expression d'ICOSLG corrélait seulement avec les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. En revanche, dans le mélanome et le glioblastome, l'expression d'ICOSLG par la tumeur a été associée à l'expansion des Treg et à l'expression d'IL-10 par ces derniers.

Ainsi, la modulation d'ICOS dans le cancer peut se faire en utilisant des anticorps agonistes ou antagonistes. Ainsi, au moins 2 études ont montré la synergie potentielle entre des agonistes d'ICOS et un anti-CTLA-4 en forçant l'expression d'ICOSLG par la tumeur via un virus recombinant *in vivo*<sup>361</sup> ou en vaccinant des animaux avec une tumeur modifiée pour exprimer ICOSLG<sup>362</sup>. Dans les 2 cas, l'association a été associée à un rejet tumoral. Par ailleurs, le ciblage d'ICOS avec des anticorps antagonistes devrait permettre d'inhiber la fonction et la prolifération des Treg, favorisant ainsi l'action des cellules effectrices. Plusieurs anticorps ciblant ICOS font (ou ont fait) l'objet d'essais cliniques. A ce jour, le développement de quatre d'entre eux (3 agonistes et 1 antagoniste), seul ou en combinaison avec des anti-CTLA-4 ou anti-PD-1 a été interrompu en raison de résultats décevants. Deux nouveaux anticorps sont actuellement en phase précoce de leur développement clinique : l'alomfilimab, une IgG1 avec des propriétés agonistes et qui dépléterait les Treg<sup>363</sup>, et l'izuralimab, un anticorps bispécifique associant un anticorps anti-ICOS agoniste avec un anti-PD-1<sup>364</sup>.

### **Modulation des cellules régulatrices pour stimuler la réponse antitumorale**

La plupart des stratégies de traitement évoquées jusqu'à présent visent principalement à stimuler la réponse effectrice en favorisant directement l'activation des cellules effectrices ou en levant les mécanismes d'inhibition intrinsèques de ces cellules. Une autre stratégie possible pour stimuler la réponse effectrice est de cibler les cellules régulatrices afin de limiter leur présence dans la tumeur et/ou leur fonctionnalité. Cet objectif peut être atteint en les déplaçant directement, à l'instar des anti-CTLA-4 dont une partie du mécanisme pourrait passer la déplétion des Treg<sup>365</sup> ou en limitant les signaux les favorisant au sein de la tumeur. Dans cette partie, nous nous focaliserons sur les stratégies visant les Treg. Néanmoins, des stratégies visant les MDSC ou les CAF sont aussi en cours d'évaluation<sup>366,367</sup>.

Le rôle des Treg dans le contrôle de l'immunité antitumorale a été mis en évidence dès 1999 avec des expériences de déplétion chez la souris avec un anti-CD25<sup>368</sup>. De la même manière, l'utilisation d'un anti-CD4 a permis le rejet de tumeur à un stade tardif en déplaçant

les Treg et en altérant ainsi l'environnement cytokinique tumoral<sup>369</sup>. Enfin, l'utilisation de modèles de souris FoxP3-DTR, permettant la déplétion ciblée des Treg en présence de toxine diphtérique a permis de montrer que l'absence de Treg permettait un meilleur contrôle de la croissance tumorale allant jusqu'au rejet selon le moment auquel la toxine est administrée<sup>370</sup>. Chez l'Homme, leur présence en forte proportion a été associée à un plus mauvais pronostic dans la plupart des cancers<sup>137</sup>, avec la subtilité que les Treg sont définis, dans la plupart des études, sur la base de l'expression du facteur de transcription FoxP3 qui s'avère aussi être exprimé par une fraction des lymphocytes T effecteurs. Cette fraction de lymphocytes T effecteurs exprimant FoxP3 est fortement présente dans certains cancers comme le cancer colorectal<sup>371</sup>. Dès lors, plusieurs stratégies ont été envisagées afin de limiter la présence des Treg au sein de la tumeur et ainsi, promouvoir la réponse antitumorale. Celles-ci peuvent être divisées en 2 grandes catégories : celles visant à réduire le nombre de Treg au sein de la tumeur et celles visant à moduler leur activité<sup>118</sup>.

La plupart des stratégies visant à réduire le nombre de Treg s'appuient sur le ciblage de molécules fortement exprimées par ceux-ci avec des anticorps déplétant, c'est par exemple le cas pour CD25<sup>372</sup>, CCR4<sup>373</sup>, GITR<sup>374</sup>, 4-1BB<sup>375</sup> ou GARP<sup>376</sup>. De plus, l'utilisation de certaines chimiothérapies comme le cyclophosphamide à faible dose permet aussi une déplétion, plus ou moins spécifique, des Treg<sup>150</sup>. Concernant la modulation de l'activité des Treg, il a été rapporté que l'utilisation d'un anticorps agoniste pour GITR, dans le glioblastome, permettrait la différenciation des Treg vers un phénotype effecteur Th1 avec la sécrétion d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$ , aboutissant à une réduction de la croissance tumorale<sup>377</sup>. Par ailleurs, dans un modèle murin, le blocage de l'activité de GARP avec un anticorps permet d'inhiber l'activation du TGF- $\beta$  et ainsi d'augmenter le contrôle de la croissance tumorale<sup>378</sup>. Des résultats similaires ont été obtenus avec des anticorps ciblant les ectonucléotidases CD39 et CD73 en combinaison avec de l'oxaliplatine<sup>379</sup>.

Récemment, de nouvelles stratégies ont émergé pour améliorer la spécificité des traitements vis-à-vis des Treg. Ainsi, en 2019, Dao *et Al.* ont utilisé un anticorps mimant le TCR pour cibler FoxP3 intracellulaire<sup>380</sup>. Cet anticorps est dirigé contre un épitope de FoxP3 présenté par HLA-A\*02:01. Ainsi, celui-ci est capable de se fixer spécifiquement sur les Treg FoxP3<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup>) et de les dépléter par ADCC. Par ailleurs, Sinclair *et Al.* ont généré un oligonucléotide antisens de FoxP3 (AZD8701) en utilisant une technologie propriétaire de Ionis Pharmaceuticals<sup>381</sup>. L'utilisation d'AZD8701 *in vitro* a été associée avec une diminution des fonctions suppressives des Treg. De plus, l'expression de FoxP3 a été

modulée négativement par AZD8701, de manière dose-dépendante, dans des modèles murins et de souris humanisée. Une autre stratégie pour éliminer plus spécifiquement les Treg de la tumeur consiste en l'utilisation d'anticorps ciblant CD25 couplés à un photoabsorbant (photoimmunothérapie) permettant de focaliser un rayonnement infrarouge proche, et ainsi, induire des dommages létaux aux cellules<sup>382</sup>. Par ailleurs, dans l'objectif de concentrer les effets du traitement dans la tumeur et de limiter les conséquences du traitement en périphérie, un anti-CTLA-4 conditionnel (anti-CTLA-4 DVD) a été développé<sup>383</sup>. Cet anticorps, testé dans des modèles murins, possède une seconde chaîne variable spécifique d'un antigène tumoral et qui masque l'anti-CTLA-4. Une fois dans la tumeur, la seconde chaîne variable est clivée par une sérine protéase présente au sein de la tumeur, libérant ainsi le site de liaison de l'anti-CTLA-4. Cette stratégie permet de découpler l'efficacité thérapeutique de la toxicité associée aux anti-CTLA-4. Enfin, l'utilisation de divers anticorps bispécifiques est en cours d'évaluation pour renforcer la spécificité de liaison envers les Treg<sup>384</sup>. Parmi ces anticorps, on peut citer l'ATOR-1015 ciblant CTLA-4 et OX40 ou l'ATOR-1144 ciblant CTLA-4 et GITR.

### III) Principes expérimentaux et objectifs du projet

#### a) La souris humanisée comme modèle d'étude de l'immunité antitumorale

Malgré de multiples avantages, les modèles murins ne permettent pas de refléter entièrement la biologie humaine. En effet, de nombreuses différences existent entre les systèmes immunitaires humain et murin<sup>385</sup>, on peut citer, par exemple, le CD28 qui est exprimé dans 100% des lymphocytes T chez la souris contre 50 à 80% chez l'Homme<sup>386</sup> ou encore la capacité des lymphocytes T activés humains à exprimer le CMH de classe II ainsi que les protéines CD80 et CD86<sup>387</sup>. En conséquence, près de 85% des traitements, qui ont montré un intérêt chez la souris, s'avèrent inefficaces ou toxiques lors des essais cliniques chez l'Homme<sup>388</sup>. Pour tenter de se rapprocher de la physiologie humaine, des modèles de souris dites humanisées ont été développés. Dans le cadre de cette thèse, les modèles concernés sont ceux générés à partir de souris immunodéficientes dans lesquelles sont co-greffées une tumeur humaine (lignée ou dérivée de patient) et/ou un système immunitaire humain. L'utilisation de souris humanisées permet, par exemple, de retrouver la forte toxicité associée au traitement par anti-CTLA-4 observée en clinique mais limitée dans les modèles murins utilisés classiquement<sup>389,390</sup>.

- Souris immunodéficientes

L'existence d'une réponse xénogénique est un obstacle majeur à l'utilisation de cellules humaines (tumoraux ou immunitaires) dans des modèles murins immunocompétents. Pour contrer ce phénomène, différents gènes impliqués dans le développement, la survie ou la fonction des cellules du système immunitaire ont été inactivés pour favoriser la prise des greffes de cellules humaines (Table 6). Ainsi, le ciblage des gènes *Foxn1*, *Rag2* ou *Prkdc* conduit à une absence de lymphocytes T et B, la délétion des gènes *IL-2rg* et *B2m* affecte les NK et la présence d'un fond génétique NOD ou l'insertion d'un SIRPα humain prévient de la phagocytose par les macrophages murins<sup>391</sup>. En sus des altérations génétiques des souris immunodéficientes, l'insertion de gènes humains codant pour certaines cytokines (ou à défaut, une supplémentation en cytokines humaines) est aussi possible afin de favoriser le développement et/ou le maintien de certaines sous-populations immunitaires humaines<sup>392</sup>.

Table 6 : Les principales souches de souris immunodéficientes utilisables pour générer des souris humanisées (Adapté de Tian et al., *Front. Oncol.*, 2020)<sup>391</sup>

Name	Strain	T	B	NK	Macrophage (for human cells)	Complement
Nude	Foxn1 <sup>null</sup>	No	Yes	Yes	Phagocytose	Yes
Scid	B6.CB17-Prkdc <sup>scid</sup> /SzJ	No	No	Yes	Phagocytose	Yes
BRG	BALB/c.Rag2 <sup>-/-</sup> IL-2Rg <sup>c-/-</sup>	No	No	No	Partial tolerant	Yes
NOD-scid	NOD.CB17-Prkdc <sup>scid</sup> /J	No	No	Function impaired	Tolerant	No C5
NOD/SCID B2m <sup>null</sup>	NOD.Cg-B2m <sup>tm1Unc</sup> Prkdc <sup>scid</sup> /SzJ	No	No	Function loss	Tolerant	No C5
NSG	NOD.Cg-Prkdc <sup>scid</sup> IL2rg <sup>tm1Wjl</sup> /SzJ	No	No	No	Tolerant	No C5
NOG	NOD.Cg-Prkdc <sup>scid</sup> IL2rg <sup>tm1Sug</sup> /JicTac	No	No	No	Tolerant	No C5
BRGS	BALB/c.Rag2 <sup>-/-</sup> IL-2Rg <sup>c-/-</sup> NOD.sirpa	No	No	No	Tolerant	Yes
hSIRPα-BRG	BALB/c.Rag2 <sup>-/-</sup> IL-2Rg <sup>c-/-</sup> human.sirpa	No	No	No	Tolerant	Yes

- Mode de reconstitution

L'apport des cellules immunitaires humaines peut se faire de 2 manières principales : (1) l'injection directe de cellules matures (PBMC) et (2) la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34<sup>+</sup> isolées de sang de cordon ou mobilisées en périphérie (Figure 12 ; Table 7). Ce dernier modèle peut être complété par l'addition de tissus fœtaux humains.

- Modèle PBMC

Ce modèle est généré en injectant des PBMC à une souris immunodéficiente avec ou sans conditionnement préalable par irradiation<sup>393,394</sup>. Ce modèle permet la mise en place rapide d'un système immunitaire fonctionnel bien que fortement biaisé en faveur des lymphocytes T. La présence de certaines cytokines comme l'IL-1β, le GM-CSF, l'IFN-γ, l'IL-10 et l'IL-2 a été rapportée dans ces souris, contribuant à la survie des cellules humaines<sup>395</sup>. En lien avec le biais CD3<sup>+</sup>, la principale limite de ce modèle est le développement d'une maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) d'origine xénogénique au bout de 4 à 8 semaines<sup>394</sup>. Par ailleurs, ce modèle



permet d'utiliser un tissu tumoral et des PBMC issus d'un même donneur pour étudier l'effet d'un traitement sur la réponse allogénique<sup>396</sup>.

- Modèle CSH

Une autre possibilité est l'utilisation de cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> isolées de sang de cordon ou du sang périphérique. La greffe de CSH s'effectue après une myéloablation par irradiation ou traitement avec du busulfan et peut être effectuée chez le souriceau de quelques semaines ou directement chez le nouveau-né. Ce modèle permet la reconstitution, en une vingtaine de semaines, d'un système immunitaire humain plus complet que le modèle PBMC, avec des lymphocytes B et des cellules myéloïdes, et ce, avec une GvHD retardée<sup>397</sup>.

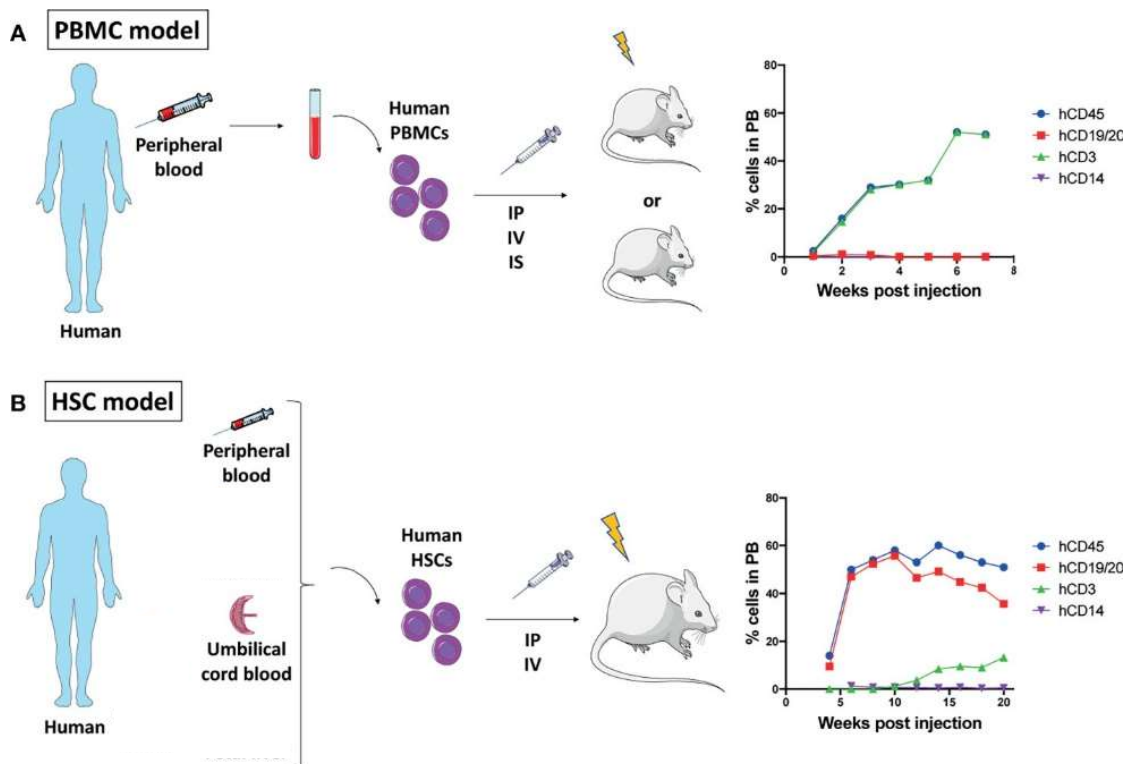


Figure 12 : Les différents modes de reconstitution d'un système immunitaire humain en souris humanisée et la cinétique de reconstitution associée (Adapté de Cogels et al., *Front. Oncol.*, 2021)<sup>398</sup>. (A) Humanisation par injection de PBMC, (B) humanisation par greffe de cellules souches hématopoïétiques (HSC).

- Modèle CSH + tissus fœtaux

Ce modèle est similaire au précédent auquel sont ajoutés des morceaux de foie et thymus fœtaux sous la capsule rénale. Le principal intérêt de cet ajout par rapport au modèle CSH est l'éducation des cellules pro-T sur un CMH humain contre un CMH murin dans le modèle précédent<sup>399</sup>. De plus, les LB sont fonctionnels avec une commutation de classe et la production

d'anticorps spécifiques<sup>400</sup>. La principale limite de ce modèle est la nécessité d'obtenir des tissus fœtaux et donc, les contraintes réglementaires et éthiques associées.

- Applications et pertinence du modèle de souris humanisée en cancérologie

Au cours des dernières années, les modèles de souris humanisées ont prouvé leur intérêt pour l'évaluation de nouvelles immunothérapies antitumorales incluant des thérapies cellulaires, géniques ou à base d'anticorps. Ces études incluent, entre autres, l'utilisation d'anti-PD-1/PD-L1/CTLA-4, ainsi que d'anticorps agonistes ciblant ICOS ou 4-1BB<sup>401</sup>. D'un point de vue mécanistique, les modèles de souris humanisées ont majoritairement confirmé les données observées chez les patients traités par ces anticorps, incluant l'augmentation de la production d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ou la diminution des proportions de Treg et de cellules myéloïdes dans la tumeur<sup>402,403</sup>. Par ailleurs, l'utilisation de modèles de souris humanisées associant l'utilisation d'une tumeur dérivée du patient (PDX) et des cellules immunitaires autologues (modèle « avatar ») est aussi envisagée afin de prédire la réponse d'un patient aux immunothérapies et aider à personnaliser le traitement<sup>404</sup>.

Table 7: Avantages et inconvénients des modèles de souris humanisées<sup>405-407</sup>

Modèle	Avantages	Inconvénients
PBMC	Simple à mettre en place Reconstitution rapide Prise de greffe robuste Coût limité	GvHD rapide (4-6 semaines) Biais lymphocytes T (+ de 90%)
CSH	Présence de lymphocytes T, LB et cellules myéloïdes Relativement simple à générer GvHD retardée	Mise en place longue Lymphocytes T éduqué sur un MHC murin Réponses B suboptimales Coût élevé Disponibilité des CSH
CSH + tissus fœtaux	Présence de lymphocytes T, LB et cellules myéloïdes GvHD retardée Lymphocytes T éduqués sur un CMH humain Immunité au niveau des muqueuses	Complexe à mettre en place (chirurgie) Reconstitution longue Nécessite des tissus fœtaux humains (contraintes réglementaires et éthiques) Coût élevé

## b) Hypothèses de travail

L'apparition des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (et des immunothérapies en général) a permis une avancée considérable dans la prise en charge des patients atteints de

cancer, montrant le rôle clé du système immunitaire dans le contrôle du développement tumoral. Néanmoins, une part importante des patients atteints de cancer reste non répondeuse et la toxicité associée à ces thérapies est non négligeable, soulevant la nécessité d'identifier de nouveaux mécanismes d'évasions et de nouvelles cibles pour l'immunothérapie permettant d'atteindre les tumeurs qui ne sont pas sensibles aux thérapies actuellement disponibles.

Ainsi, mon projet de thèse se divise en 2 grandes parties : (1) l'évaluation d'HVEM en tant que nouvelle cible pour l'immunothérapie à travers l'utilisation d'un anticorps monoclonal visant HVEM humain en souris humanisée avec des PBMC et (2) la validation du rôle de certains ligands exprimés par la tumeur dans la modulation de la réponse immunitaire, notamment en favorisant les Treg, dans des modèles murins et de souris humanisées avec des CSH CD34<sup>+</sup>.

### **Ciblage d'HVEM pour l'immunothérapie du cancer**

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'expression d'HVEM par les tumeurs sur le système immunitaire et la croissance tumorale dans le cancer de la prostate en souris humanisée. Dans la continuité de la thèse du Dr Simon Brunel, nous avons poursuivi l'étude d'un anticorps monoclonal ciblant HVEM. Cet anticorps a été fourni par le Pr Daniel Olive dans le cadre d'une collaboration pour l'évaluation du potentiel thérapeutique d'anticorps ciblant l'axe HVEM/BTLA et a été testé dans un modèle de souris humanisées avec des PBMC greffées avec des lignées tumorales humaines de cancer de la prostate exprimant ou non HVEM. Enfin, le contenu en TIL des tumeurs a été analysé afin de tenter d'identifier le mécanisme d'action *in vivo* de l'anti-HVEM.

### **Rôle de ligands tumoraux dans la modulation de la réponse antitumorale**

Au cours des 2 dernières années, nous avons initié un second projet s'intéressant aux interactions potentielles entre les Treg et les cellules tumorales. En effet, celles-ci restent peu étudiées alors que, la tumeur modelant son microenvironnement à son avantage, elles sont susceptibles d'être une des clés pour atteindre les Treg tumoraux tout en limitant les effets systémiques. Ainsi, en utilisant des lignées exprimant ou non les ligands d'ICOS et 4-1BB et des modèles de souris immunodéficientes et immunocompétentes (syngéniques pour 4-1BB-L ou humanisées pour ICOS-L), nous avons cherché à savoir comment l'expression de ces molécules, largement exprimées par les tumeurs, modulait la réponse immunitaire antitumorale. Les comparaisons de croissance tumorale ont été complétées, quand cela était possible, par des analyses des TIL (protéomique par cytométrie spectrale et/ou transcriptomique).

---

## **Résultats**

---

## I) Etude d'un anticorps monoclonal ciblant HVEM dans un modèle de cancer de la prostate en souris humanisée

### *Objectif*

L'objectif de cette étude était d'évaluer le potentiel thérapeutique du ciblage d'HVEM dans l'immunothérapie du cancer. Ce travail s'inscrit dans la cadre d'une collaboration avec le Pr Daniel Olive et la continuité des travaux initiés par le Dr Simon Brunel au cours de sa thèse.

### *Méthode*

Nous avons évalué un anticorps murin ciblant HVEM humain (clone 18.10) dans un modèle de souris humanisées avec des PBMC et greffées en sous-cutanées avec des tumeurs exprimant ou non HVEM. Cette évaluation s'est faite par le suivi de la croissance tumorale et l'analyse de la composition des TIL.

### *Résultats*

A partir des données du TCGA, nous avons pu montrer qu'HVEM, associé à BTLA, était un facteur de mauvais pronostic dans le cancer de la prostate. Ensuite, nous avons pu montrer que l'utilisation d'un anticorps ciblant HVEM humain permettait d'améliorer le contrôle de la croissance tumorale en souris humanisées, cet effet étant dépendant de l'expression d'HVEM par la tumeur. D'un point de vue mécanistique, nous avons mis en évidence que l'effet antitumoral dépendait, au moins en partie, des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et plus particulièrement, de leur nombre et leur prolifération au sein de la tumeur. Enfin, la comparaison directe des croissances des clones tumoraux en souris immunodéficientes et humanisées, nous a permis de confirmer qu'HVEM était un point de contrôle de l'immunité T antitumorale.

### *Conclusion*

Cette étude a mis en évidence le potentiel du ciblage d'HVEM pour l'immunothérapie du cancer dans le cas où la tumeur exprime HVEM. Par ailleurs, elle nous a aussi permis de mettre au point un modèle relativement simple pour valider de nouveaux potentiels points de contrôle immunitaire T.

*Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue Cancers (disponible ci-après). Dans la cadre de cette publication, j'ai contribué à au moins 50% des données générées pour chacune des figures principales et les figures supplémentaires 2 à 4.*

## Article

# Blockade of HVEM for Prostate Cancer Immunotherapy in Humanized Mice

Nicolas Aubert <sup>1,†</sup> , Simon Brunel <sup>1,†</sup>, Daniel Olive <sup>2</sup>  and Gilles Marodon <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Centre d'Immunologie et Maladies Infectieuses-Paris, CIMI-PARIS, Sorbonne Université, INSERM, CNRS, 75013 Paris, France; nicolas.aubert@etu.upmc.fr (N.A.); simonbrunel@live.fr (S.B.)

<sup>2</sup> Institut Paoli-Calmettes, Aix-Marseille Université, INSERM, CNRS, CRCM, Tumor Immunity Team, IBISA Immunomonitoring Platform, 13009 Marseille, France; daniel.olive@inserm.fr

\* Correspondence: gilles.marodon@inserm.fr

† Equal contributions.

**Simple Summary:** Current immune checkpoint inhibitors have shown limitations for immunotherapy of prostate cancer. Thus, it is crucial to investigate other immune checkpoints to prevent disease progression in patients with prostate cancer. Here, we first show that the HVEM/BTLA immune checkpoint is associated with disease progression in patients. We then show that immunotherapy aimed at targeting HVEM reduced tumor growth twofold in vivo in a humanized mouse model of the pathology. The mode of action of the therapy was dependent on CD8<sup>+</sup> T cells and is associated with improved T cell activation and reduced exhaustion. Finally, we demonstrated that HVEM expressed by the tumor negatively regulated the anti-tumor immune response. Our results indicate that targeting HVEM might be an attractive option for patients with prostate cancer.



**Citation:** Aubert, N.; Brunel, S.; Olive, D.; Marodon, G. Blockade of HVEM for Prostate Cancer Immunotherapy in Humanized Mice. *Cancers* **2021**, *13*, 3009. <https://doi.org/10.3390/cancers13123009>

Academic Editor: Constantin N. Baxevanis

Received: 12 May 2021  
Accepted: 10 June 2021  
Published: 16 June 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The herpes virus entry mediator (HVEM) delivers a negative signal to T cells mainly through the B and T lymphocyte attenuator (BTLA) molecule. Thus, HVEM/BTLA may represent a novel immune checkpoint during an anti-tumor immune response. However, a formal demonstration that HVEM can represent a target for cancer immunotherapy is still lacking. Here, we first showed that HVEM and BTLA mRNA expression levels were associated with a worse progression-free interval in patients with prostate adenocarcinomas, indicating a detrimental role for the HVEM/BTLA immune checkpoint during prostate cancer progression. We then showed that administration of a monoclonal antibody to human HVEM resulted in a twofold reduction in the growth of a prostate cancer cell line in NOD.SCID.gc-null mice reconstituted with human T cells. Using CRISPR/Cas9, we showed that the therapeutic effect of the mAb depended on HVEM expression by the tumor, with no effect on graft vs. host disease or activation of human T cells in the spleen. In contrast, the proliferation and number of tumor-infiltrating leukocytes increased following treatment, and depletion of CD8<sup>+</sup> T cells partly alleviated treatment's efficacy. The expression of genes belonging to various T cell activation pathways was enriched in tumor-infiltrating leukocytes, whereas genes associated with immuno-suppressive pathways were decreased, possibly resulting in modifications of leukocyte adhesion and motility. Finally, we developed a simple in vivo assay in humanized mice to directly demonstrate that HVEM expressed by the tumor is an immune checkpoint for T cell-mediated tumor control. Our results show that targeting HVEM is a promising strategy for prostate cancer immunotherapy.

**Keywords:** immune checkpoint; HVEM; BTLA; monoclonal antibody; cancer immunotherapy; humanized mice; prostate cancer

## 1. Introduction

Immune escape by tumors is now considered a hallmark of cancer [1]. Many immune mechanisms may explain the loss of tumor control, including defective MHC function and expression, recruitment of suppressive immune cells, and expression of co-inhibitory

receptors such as PD-L1 [2]. In the last few years, targeting co-inhibitory receptors with monoclonal antibodies has shown impressive results in tumor regression and overall survival, leading to the approval of anti-CTLA-4, anti-PD-1, and anti-PD-L1 in numerous cancers [3]. However, the success of immune checkpoint inhibitors (ICI) remains partial as many patients fail to respond. This is particularly relevant for prostate cancer (PCa), the second deadliest cancer in the industrialized world and for which numerous clinical trials using ICI monotherapy have been disappointing [4]. Limited tumor infiltrates (cold tumors) or low expression of the targeted molecule may explain the relative inefficiency of ICI [5,6]. To overcome these limitations, other pathways that might be involved in immune escape must be investigated as these could complement actual therapies.

Recently, a new co-inhibitory pair was identified as a checkpoint of the anti-tumor immune response: HVEM (herpes virus entry mediator, TNFRSF14) and BTLA (B and T lymphocyte attenuator) [7]. Many immune cells can express these two molecules, including T and B cells, and BTLA is involved in the regulation of many biological processes [8]. HVEM signaling through BTLA inhibits T cell activation through recruitment of Src-homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatases, SHP-1, and SHP-2 to the phosphorylated tyrosines of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif [9]. Additionally, the HVEM network includes many additional partners, such as LIGHT, herpes simplex virus-1 (HSV-1), glycoprotein D (gD), lymphotoxin  $\alpha$  (Ltx $\alpha$ ), or CD160 [7]. The binding of HVEM to CD160 is associated with the inhibition of CD4<sup>+</sup> T cell activation [10], whereas it activates CD8<sup>+</sup> T cells [11] and NK cells [12].

LIGHT is a T cell activator because transgenic expression of LIGHT in T cells leads to massive activation, especially in mucosal tissues [13]. In contrast, stimulation of HVEM expressed by T cells by any of its ligands is associated with proliferation, survival, and production of inflammatory cytokines, such as IL-2 and IFN- $\gamma$  [14,15]. Thus, the HVEM network is complex, and T cell activation or inhibition may follow HVEM engagement depending on cis- or transactivation by various ligands in various types of cells.

Although the role of HVEM in T cell activation is well established, the role of HVEM expressed by tumor cells on the immune system is not clear. Several clinical studies have shown that HVEM expression is upregulated in many types of cancers including colorectal cancers [16], melanomas [17], esophageal carcinomas [18], gastric cancers [19], hepatocarcinomas [20], breast cancers [21], lymphomas [22], and PCa [23]. In these studies, a worse prognosis and lower survival of patients correlated with high levels of HVEM expression in the tumors or with elevated detection of soluble HVEM in the serum. Moreover, a reduction in the number of tumor-infiltrating leukocytes (TILs) is also associated with HVEM expression in tumors [13,15,17], indicating a detrimental role for HVEM in various cancers. In addition, different strategies to inhibit HVEM expression or function lead to increased T cell proliferation and function in syngeneic tumor mouse models [18,24,25]. However, to our knowledge, no study to date has assessed the possibility of using a monoclonal antibody (mAb) to HVEM to favor the anti-tumor immune response in a humanized context *in vivo*.

Similarly, upregulated expression of BTLA on CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> T cells or increased levels of soluble BTLA were associated with unfavorable prognosis for gallbladder cancer [26], diffuse large-B cell lymphoma [27], clear cell renal cell cancer [27], and prostate cancer patients [23]. Moreover, we have shown that tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells are inhibited in melanoma patients through HVEM/BTLA signaling [28]. The safety of a mAb against BTLA is currently being evaluated in a clinical trial (NCT04278859).

To generate humanized mice, we used immuno-compromised NOD.SCID. $\gamma$ c-null (NSG) mice, which are deprived of murine T, B, and NK cells, but that retain functionally immature macrophages and granulocytes [29]. Patient-derived xenografts (PDX) have been shown to faithfully recapitulate tumor architecture and clinical features in breast [30], ovarian [31], lung [32], skin [33], and prostate [34] cancers. However, it is challenging to generate PDX mouse models on a regular and consistent basis. Humanized mice grafted with human cancer cell lines have been used in hundreds of studies to evaluate

the efficacy of various treatments for cancer immunotherapy [35]. Regardless of the mode of reconstitution of the human immune system in NSG mice (from progenitors or peripheral blood, as herein), all suffer from the same drawback that human T cells will be allogeneic to the tumor. This would prevent the tumor antigen-specific response to be accurately measured in humanized mice. Nevertheless, accumulating evidence indicates that, in addition to their different proportions in the naïve T cell repertoire, a high degree of similarity exists between antigen-specific and allogeneic-specific immune responses [36,37]. Furthermore, T cell response to the tumor is not restricted to antigen-specific T cells but can also imply bystander T cells, which are not specific but actively engaged in tumor control [38,39]. Thus, despite some limitations, humanized mice may still provide valuable clues on therapeutic strategies aimed at enhancing the allogeneic immune response mediated by human T cells to the tumor, with relevance to T cell-mediated tumor antigen-specific and bystander immune responses in cancer patients. In this study, we investigated the therapeutic potential of a monoclonal antibody targeting human HVEM in humanized mice and the underlying cellular and molecular mechanisms associated with therapeutic efficacy.

## 2. Results

### 2.1. HVEM and BTLA Were Associated with Lower Progression-Free Intervals in Prostate Cancer Patients

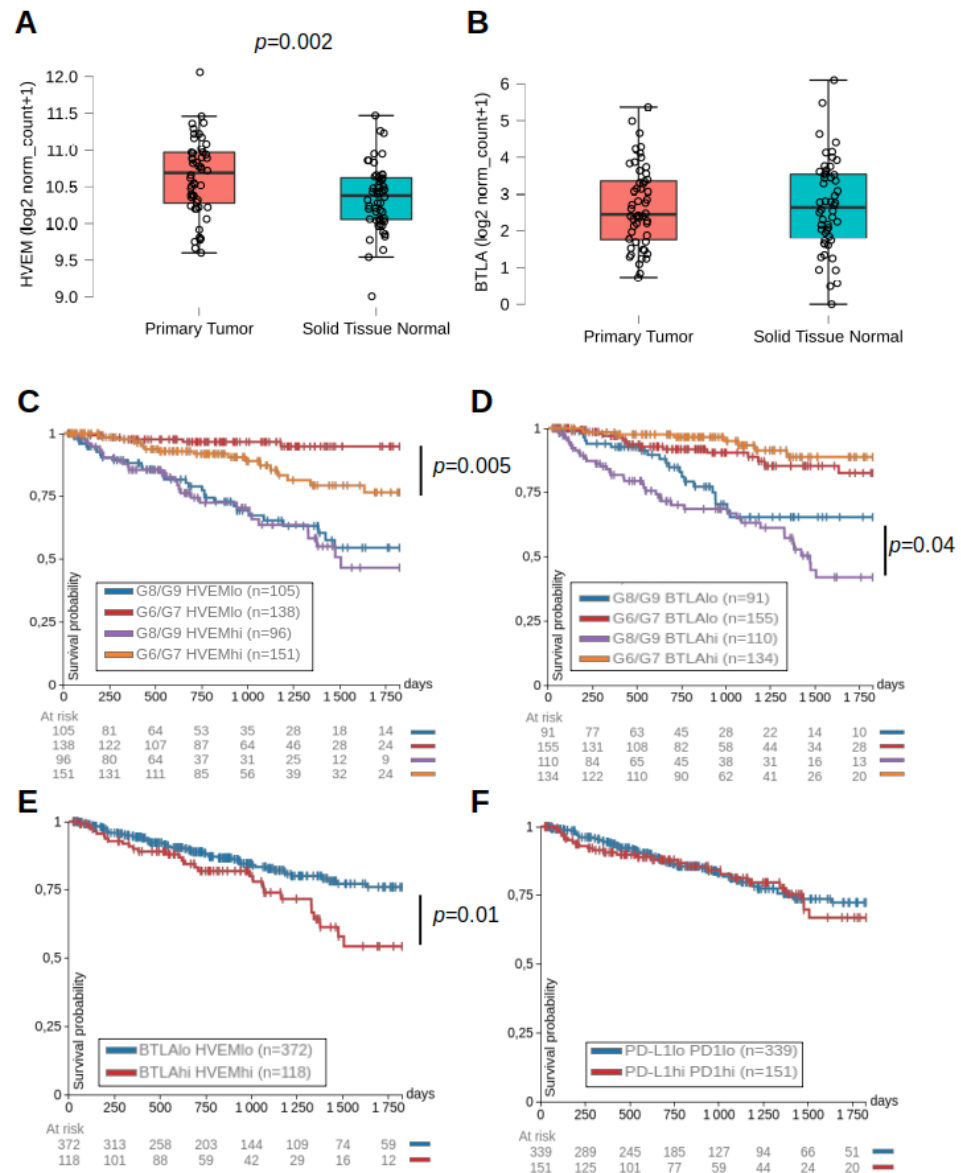
Analysis of TCGA (The Cancer Genome Atlas) revealed that HVEM mRNA was expressed at high levels in the PRAD (PRostate ADenocarcinomas) dataset (normalized  $\log_2$  counts > 10) and higher levels in primary tumors than in patient-matched normal tissues (Figure 1A). In contrast, BTLA was expressed at low (normalized  $\log_2$  counts < 3) and similar levels in the tumor and patient-matched normal tissues (Figure 1B). For patients with Gleason scores of 6 or 7 (low-grade adenocarcinomas), above-median expression of HVEM was associated with a lower progression-free interval (PFI) over 5 years, whereas this was not observed for BTLA (Figure 1C). In contrast, HVEM mRNA expression levels were not correlated with good or poor PFI in patients with more advanced disease (Gleason scores of 8 or 9), but above-median expression of BTLA was associated with a lower PFI (Figure 1D). Overall, the above-median expression of HVEM and BTLA together was a poor prognostic factor for PFI irrespective of the clinical score (Figure 1E). Interestingly, this was not observed for the PD1/PD-L1 co-inhibitory signaling pathway (Figure 1F). These results indicate a detrimental role of HVEM/BTLA in PCa at all stages of the disease and suggest that blocking the HVEM/BTLA pathway might be an attractive option for PCa patients. Accordingly, we focused the rest of the study on PCa cell lines in vivo.

### 2.2. Targeting HVEM with a mAb Improved Tumor Control in Humanized Mice

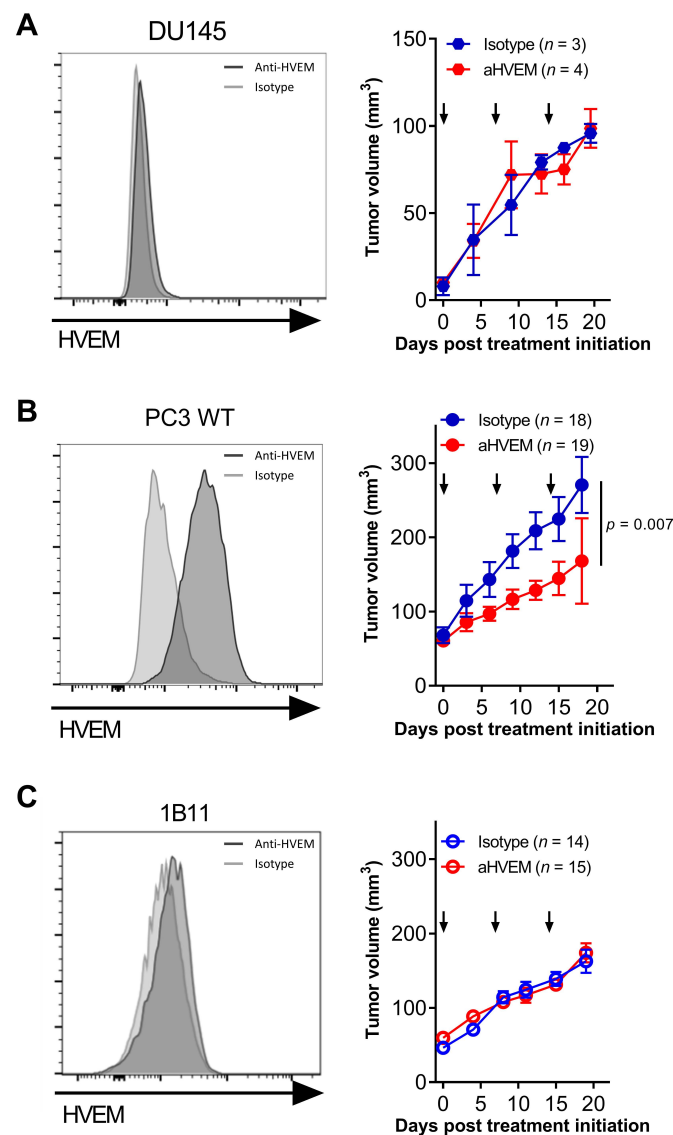
We first determined whether targeting HVEM with a mAb could impact tumor growth in vivo. For this, we implanted prostate cancer cell lines in NSG mice and grafted human PBMCs a few days later. No differences in tumor growth were observed in mice grafted with the prostate cancer cell line DU145, which did not express HVEM (Figure 2A). In contrast, a twofold reduction in tumor growth was observed in mice grafted with the HVEM-positive PC3 prostate cancer cell line (Figure 2B). The presence of human cells was mandatory for the efficacy of the mAb since tumor growth was unaffected by the treatment in non-humanized NSG mice (Figure S1A). The lack of an effect in non-humanized mice also indicates that the mAb did not directly kill the PC3 cell line in vivo. To formally demonstrate that HVEM on the tumor was required for therapeutic efficacy of the mAb, we generated an HVEM-deficient PC3 cell line (clone 1B11) using CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein (RNP) transfection. Treatment with the mAb was completely inefficient on the 1B11 clone in humanized mice (Figure 2C), showing that HVEM expression by the tumor was mandatory for the therapeutic efficacy of the mAb. Notably, the mAb was also effective at controlling tumor growth in humanized mice grafted with the HVEM-positive melanoma cell line Gerlach but not with the HVEM-negative triple-negative breast cancer (TNBC) cell



line MDA-MB-231 (Figure S1B,C). Altogether, these results indicate that the therapeutic efficacy of targeting HVEM was independent of the tumor tissue origin but rather strictly dependent on HVEM expression by the tumor.



**Figure 1.** HVEM and BTLA were associated with lower progression-free intervals in prostate cancer patients. Expression of HVEM (A) and BTLA (B) mRNA (expressed as log<sub>2</sub> of normalized counts) in matched patients in the primary tumor or normal tissue ( $n = 52$ ). The  $p$ -value indicated on the graph is from a paired Student’s  $t$ -test with normality assumption validated by a Shapiro–Wilk test. Data were extracted from the PRAD dataset of the TCGA using Xena. Progression-free intervals (PFI) of PCa patients according to the level of expression of HVEM (C) or BTLA (D) and the Gleason scores signing low-grade (G6/G7) or high-grade (G8/G9) adenocarcinomas over a 5-year follow-up. For each group of clinical scores, patients were split into two groups according to below-median (HVEM<sup>lo</sup> or BTLA<sup>lo</sup>) or above-median (HVEM<sup>hi</sup> or BTLA<sup>hi</sup>) mRNA expression. PFI curves of PCa patients harboring below-median or above-median expression of both HVEM and BTLA (E) or both PD1 and PD-L1 (F) independently of clinical scores. The number of patients in each group is indicated in brackets and the number of patients at risk at main time points is indicated below the graph. The  $p$ -values on the graphs are from a log-rank test in Xena.

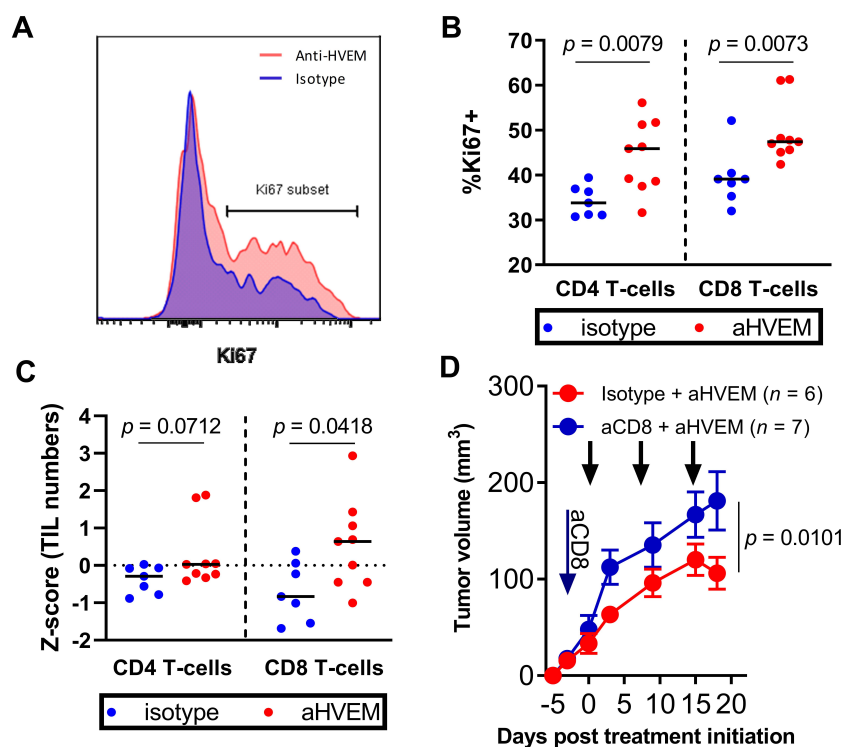


**Figure 2.** Targeting HVEM with a mAb improved tumor control in humanized mice. HVEM expression and tumor growth of the prostate cancer cell lines DU145 (A), PC3 (B), and the HVEM-deficient PC3 clone 1B11 (C). HVEM expression was determined by flow cytometry with the anti-HVEM mAb (clone 18.10) and a secondary antibody. Curves represent the cumulative mean tumor volume ( $\pm$ SEM) from one experiment with DU145, two for 1B11, and three for PC3. The number of mice at the beginning of the experiments is indicated in brackets. Arrows indicate the time of the injections. The *p*-value reported on the graph tests the null hypothesis that the slopes are identical using a linear regression model.

### 2.3. Tumor Control Was Dependent on CD8<sup>+</sup> T Cells in Anti-HVEM-Treated Mice

To investigate the mode of action of the mAb, we determined the composition of human CD45<sup>+</sup> cells in the PC3 tumor and the spleens of treated and untreated animals by flow cytometry. To determine the efficiency of human cell reconstitution independent of technical variability linked to sample preparation, we first established the frequencies of human CD45<sup>+</sup> cells relative to the added frequencies of murine and human CD45<sup>+</sup> cells (Figure S2A). Human CD45<sup>+</sup> cells represented close to 100% of all CD45<sup>+</sup> cells in the spleen (Figure S2B). Among hCD45<sup>+</sup> cells, CD3<sup>+</sup> T cells represented 90% (Figure S2C), in which CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells represented 60% and 30%, respectively (Figure S2D). Likewise, human CD45<sup>+</sup> cells represented 90% of all CD45<sup>+</sup> cells in the tumor (Figure S2E). Among

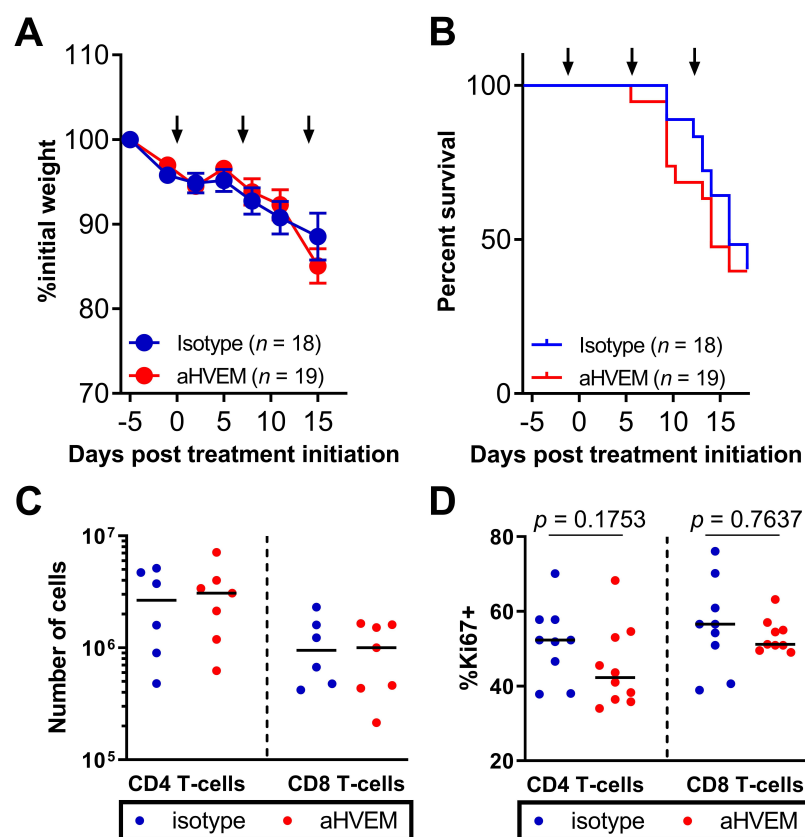
hCD45<sup>+</sup> cells, CD3<sup>+</sup> T cells represented more than 98% (Figure S2F), in which CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells represented 40% and 60%, respectively (Figure S2G). We noticed that the CD4 to CD8 ratio was inverted in the tumor relative to the spleen (Figure S2D–G), indicating that CD8<sup>+</sup> T cells might have a preferential tropism to the PC3 tumor in humanized mice, as previously described [40]. Importantly, treatment did not affect any of these proportions. In contrast, we observed an increase in the frequencies of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells expressing the proliferation marker Ki67 (Figure 3A,B). Additionally, CD8 but not CD4 T cell numbers (represented as z-scores to normalize the numbers across experiments) were significantly increased in the anti-HVEM-treated group relative to the control group (Figure 3C), suggesting a role for CD8<sup>+</sup> T cells in tumor control. However, the frequencies of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells expressing the cytotoxic molecules granzyme B or perforin were not elevated in the tumor or spleen of the anti-HVEM group (Figure S3). To directly determine the contribution of CD8<sup>+</sup> T cells to tumor control in anti-HVEM-treated mice, we investigated tumor growth in mice depleted of human CD8<sup>+</sup> T cells. Depletion of CD8<sup>+</sup> T cells was efficient in most of the mice analyzed, as assessed by the frequencies of CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells remaining after treatment (Figure S4). Depletion of CD8<sup>+</sup> T cells reversed the effect of the anti-HVEM mAb (Figure 3D), showing that tumor control was dependent on CD8<sup>+</sup> T cells.



**Figure 3.** Tumor control was dependent on CD8<sup>+</sup> T cells. (A) Representative histogram of Ki67 staining. (B) Frequencies of Ki67-expressing cells among CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the tumor. Data are cumulative of two independent experiments performed at D21 post-humanization. (C) Absolute numbers of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in PC3 tumors from two independent experiments. To allow comparison, we converted numbers obtained in each mouse to z-scores (number of standard errors separating the samples from the mean). Each dot is a mouse. The *p*-value on the graphs is the result of a Mann–Whitney non-parametric *t*-test. (D) Growth of the PC3 cell line in humanized mice treated with anti-HVEM mAb and depleted or not of their CD8 T cells. CD8 T cells were depleted on the day following humanization (blue arrow). Curves are the mean tumor volume ( $\pm$ SEM) in the indicated number of mice. Black arrows indicate the time of anti-HVEM mAb injection. Data are cumulative of two independent experiments. The *p*-value reported on the graphs tests the null hypothesis that the slopes are all identical using a linear regression model.

#### 2.4. Treatment with the Anti-HVEM mAb Did Not Increase Graft vs. Host Disease Nor the Number or Proliferation of Human T Cells

Our observations thus far are consistent with the hypothesis that targeting HVEM on the tumor releases an inhibitory signal on CD8<sup>+</sup> T cells, allowing their proliferation in situ. We wanted to rule out the possibility that the mAb behaves as an agonist, directly activating HVEM<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in vivo, leading to better tumor control. One prediction of this hypothesis would be that GVHD occurring in NSG mice grafted with the tumor and reconstituted with human T cells would be exacerbated following anti-HVEM administration. However, despite the impact of the mAb on tumor growth (Figure 2), we observed similar weight loss and mortality in anti-HVEM or isotype control-treated mice (Figure 4A,B). Furthermore, in contrast to TILs, the activation of human T cells in the spleens was the same in both groups, as judged by similar numbers of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and similar frequencies of Ki67<sup>+</sup> cells (Figure 4C,D). Thus, anti-HVEM therapy in humanized mice reduced the growth of HVEM<sup>+</sup> tumors by a mechanism that was independent of a systemic agonist effect of the mAb on human T cells.

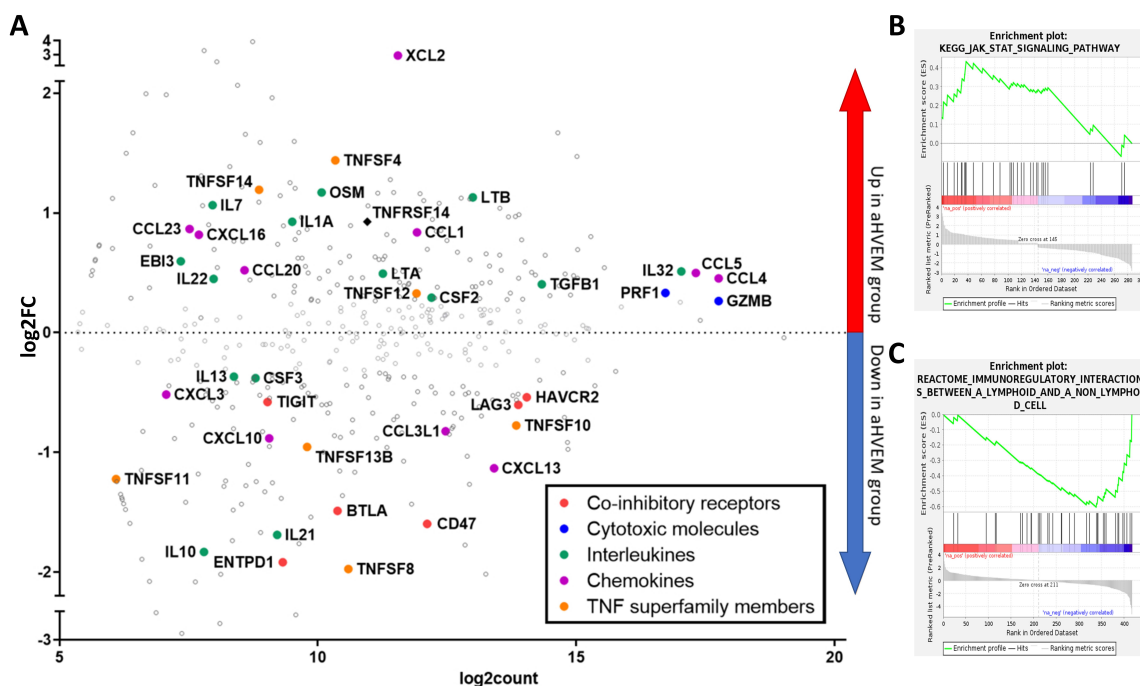


**Figure 4.** Treatment with the anti-HVEM mAb did not increase GVHD nor the number or proliferation of human T cells in the spleen. Percentages of initial weight (A) and survival (B) of tumor-bearing humanized NSG mice following treatment by the anti-HVEM mAb or an isotype control are shown. Data shown are cumulative of 3 independent experiments. Numbers (C) and frequencies of Ki67<sup>+</sup> cells (D) at D21 post humanization in the indicated subsets and are cumulative of two independent experiments. Each dot is a mouse. The *p*-values are from a Mann–Whitney *t*-test.

#### 2.5. mRNA Enrichment Analysis Showed Increased Activation and Decreased Immuno-Suppression in TILs of Anti-HVEM-Treated Mice

To better characterize the anti-tumor immune response following mAb treatment, we established a list of differentially expressed genes (DEG) in sorted hCD45<sup>+</sup> TILs from mice treated with the anti-HVEM mAb or its isotype control. For the analysis, 287 genes with a raw count higher than 55 and an absolute fold-change of at least 20% were set to

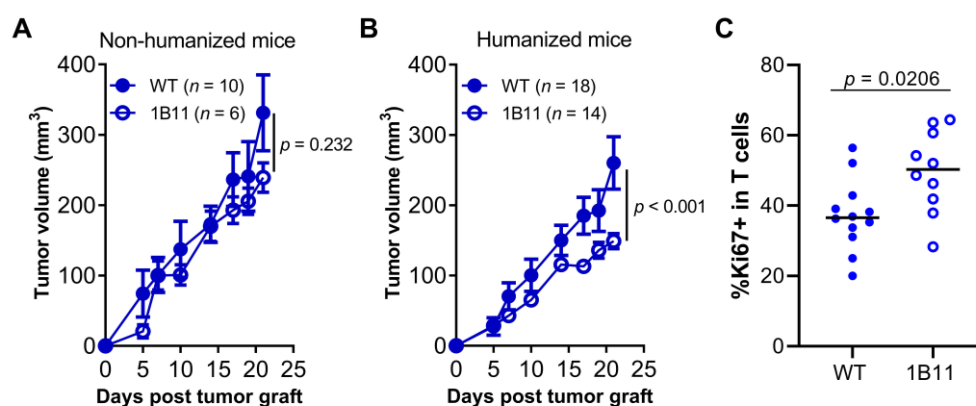
be differentially expressed. Among the 287 genes, 145 were upregulated with a  $\log_2FC > 0.26$ , and 142 were downregulated ( $\log_2FC < -0.3$ ) in HVEM-treated mice relative to isotype-treated controls (Figure 5A). Several interleukins and chemokines genes signing T cell activation were enriched in the treated group, such as *LTA*, *IL22*, *IL32*, *CCL5*, and *CCL4*. Of note, *GZMB* and *PRF1* were among the genes with the highest levels of expression, but the difference between the groups was weak, confirming our observation by flow cytometry (Figure S3). Gene set enrichment analysis (GSEA) identified the “JAK-STAT signaling pathway” signature as significantly and positively enriched in TILs of HVEM-treated mice (Figure 5B). In addition, upregulated genes in the anti-HVEM group were enriched in members of several ontologies related to lymphocyte activation, including the tumor necrosis factor-mediated signaling pathway, cytokine and chemokine binding and activity, and T cell receptor complex (Figure S5). On the other hand, some genes belonging to immunosuppressive pathways were downregulated in HVEM-treated TILs such as *ENTPD1* (CD39); *IL10*; and the co-inhibitory receptors *BTLA*, *TIGIT*, *LAG3*, and *HAVCR2* (TIM3), as well as the “don’t eat me” receptor *CD47* (Figure 5A). We verified by flow cytometry that *BTLA* was indeed down modulated on human T cells following anti-HVEM treatment (Figure S6). In addition, GSEA showed that the “immunoregulatory interactions between a lymphoid and a non-lymphoid cell” signature was significantly repressed in the DEG signature (Figure 5C), signing altered adhesion and motility of TILs. Overall, anti-HVEM treatment was associated with profound modifications of TILs, with increased expression of genes belonging to activation and proliferation signaling pathways and decreased expression of genes signing an exhausted phenotype.



**Figure 5.** mRNA enrichment analysis showed increased activation and decreased immunosuppression in TILs of anti-HVEM treated mice. (A) MA-plot comparing gene expression between TILs from anti-HVEM and isotype-treated mice. Represented are the  $\log_2$  fold-change in the expression of a given gene between anti-HVEM or isotype-treated mice ( $\log_2FC$ , y-axis) vs. the mean absolute count after normalization ( $\log_2count$ ). Only genes with raw counts higher than 55 are shown. Some notable genes were manually annotated according to their biological functions by the indicated color code. (B) GSEA identified the “JAK-STAT signaling pathway” signature as significantly enriched (normalized enrichment score (NES) = 1.81,  $p$ -value = 0.004,  $q$ -value = 0.17 (FDR),  $p$ -value = 0.32 (FWER)) in genes upregulated by the treatment. (C) “Immunoregulatory interaction between a lymphoid and a non-lymphoid cell” signature was significantly enriched (NES = -1.86,  $p$ -value = 0.001,  $q$ -value = 0.15 (FDR),  $p$ -value = 0.25 (FWER)) in genes downmodulated by the treatment.

## 2.6. HVEM Was an Immune Checkpoint during Anti-Tumor T Cell Immune Response in Humanized Mice

A reduction in tumor growth in the absence of HVEM was already apparent for the isotype-treated group, as shown in Figure 2B,C. Thus, we directly compared the growth of HVEM-positive or HVEM-negative PC3 cells in NSG mice with or without the addition of human PBMCs (Figure 6). Both cell lines grew equally well in non-humanized NSG mice (Figure 6A), showing that HVEM deficiency did not affect *in vivo* tumor development *per se*. In contrast, tumor growth of the 1B11 clone was reduced twofold compared to that of the parental PC3 cell line in humanized mice (Figure 6B). Furthermore, T cell proliferation was significantly increased in the absence of HVEM from the tumor (Figure 6C). Thus, removing HVEM from the tumor released a brake on the allogeneic T cell response to the tumor, demonstrating that HVEM was an immune checkpoint under these experimental conditions.



**Figure 6.** HVEM was an immune checkpoint during anti-tumor T cell immune response in humanized mice. Growth of the indicated PC3 cell lines (WT or 1B11) in non-humanized (A) or PBMC-humanized mice (B). Curves are the mean tumor volume ( $\pm$ SEM) in the indicated number of mice. Data are cumulative of at least two experiments. The *p*-value on the graphs tests the null hypothesis that the slopes are equal using a linear regression model. (C) Frequencies of Ki67<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in PC3 WT or 1B11 tumor at day 21 post-humanization from one experiment with 6 and 5 mice, respectively. The *p*-values are from a Mann–Whitney *t*-test.

## 3. Discussion

Here, we report improved tumor control by human T cells *in vivo* following administration of a mAb to HVEM. Moreover, we deciphered the mode of action of the mAb *in vivo* using complementary technologies. Furthermore, we propose a simple *in vivo* assay for immune checkpoint discovery and validation. To our knowledge, the present report is the first to combine CRISPR/Cas9-mediated deletion of putative checkpoints with the assessment of tumor growth in humanized mice. One limitation of the assay is that PBMC-humanized mice are mostly reconstituted with T cells, as shown herein, limiting the usefulness of the assay to T cell-specific immune checkpoints. Another limitation is the allogeneic nature of the immune response to the tumor in humanized mice, which would only be circumvented in PDX models with autologous human immune cells, an ongoing effort but still challenging to set up [41]. Despite these limitations, we believe that our *in vivo* assay will be of great help in investigating other candidates in more advanced models of humanized mice, that is, mice reconstituted with human hematopoietic progenitors.

We show that the HVEM/BTLA checkpoint could be exploited for therapy in humanized mice using a mAb to human HVEM. We found that HVEM expression by the tumor was necessary and sufficient to elicit tumor control by the mAb since it had no effect on HVEM-negative cell lines and no agonist activity on human T cells. Park et al. showed in a syngeneic mouse model that transfecting an agonist scFv anti-HVEM in tumor cells resulted in increased T cell proliferation, improved IFN- $\gamma$  and IL-2 production and improved tumor control [24]. In addition to the species differences, the discrepancy with



our results could be explained by the fact that T cells are strongly activated in huPBMC mice [42]. The downregulation of HVEM expression upon activation [43] may have limited the binding of the anti-HVEM antibody to T cells in our model. Thus, it remains possible that the mAb would behave differently in humans. In contrast, BTLA is upregulated upon T cell activation [44], increasing the susceptibility of T cells to inhibition by HVEM<sup>+</sup> tumor cells [16,18,20,45]. The opposite was observed in the tumor microenvironment following treatment, with an increase in *HVEM* and a reduction of *BTLA* gene and protein expression, with a concomitant increase in *LTA* and *LIGHT*, two other ligands for HVEM. It is important to note that the binding sites of *LIGHT* and *BTLA* differ on HVEM [46]. Thus, the anti-HVEM mAb might have limited inhibition of activated T cells through blockade of HVEM binding with *BTLA* but not with the other ligands that are T cell activators. An alternative possibility would be that *LIGHT* and *LT $\alpha$*  in their soluble forms inhibit the interaction of HVEM with *BTLA* [47]. As of today, reciprocal regulation of HVEM and *BTLA* has not been reported but our observation is reminiscent of earlier findings showing reciprocal regulation of HVEM by *LIGHT* [43].

Previous studies in mice have also shown that inhibiting HVEM expression on the tumor or its interaction with its ligands has a positive effect on T cells. Injection of a plasmid encoding a soluble form of *BTLA* (to compete with endogenous *BTLA* for HVEM) was associated with an increase in inflammatory cytokine production by TILs and a decrease in anti-inflammatory cytokines at the RNA level [25]. Similarly, vaccination with a tumor-associated antigen was more efficient if HVEM interactions with its ligands were blocked by HSV-1 gD, allowing regression of a large tumor mass [48]. Moreover, silencing HVEM expression in the tumors with siRNA was also associated with an increase in CD8 T cells and inflammatory cytokine production in a murine colon carcinoma model [18]. In addition, the use of siRNA to HVEM on ovarian cancer in vitro promoted T cell proliferation and TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  production [49]. Numerous results from our study also support increased T cell activation in the absence of HVEM/*BTLA* signaling: (i) TILs from mice treated with anti-HVEM were enriched in ontologies signing activation by cytokines, chemokines, and signaling pathways that are well-known inducers of proliferation, differentiation, migration, and apoptosis; (ii) comparison between TILs from mice treated with the anti-HVEM or isotype control mAb also highlighted decreased expression of many co-inhibitory receptor genes (*BTLA*, *TIGIT*, *LAG3*, and *HAVCR2* [50,51]) or with immunosuppressive functions (*ENTPD1* and *IL10*), suggesting a lower exhaustion status; and (iii) TILs from anti-HVEM-treated mice or the HVEM-null PC3 cell line had increased frequencies of Ki67<sup>+</sup> cells relative to controls, signing improved proliferation. Altogether, these results strongly suggest that HVEM expressed by the tumor negatively regulated T cell-mediated control of tumor growth.

Interestingly, we observed that CD8<sup>+</sup> T cell depletion in vivo favored the growth of PC3 tumors in anti-HVEM-treated mice. It might be inferred from this result that CD8<sup>+</sup> T cells would also play a role in the absence of the treatment. However, a major role for human CD4<sup>+</sup> T cells in PC3 tumor control in NSG mice has been reported [40]. In this study, CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells were depleted before injection into mice. Despite depletion, a significant proportion of CD8 T cells were still present in the tumor although they were absent from the spleen, casting doubt on the interpretation of these results. It would be interesting to evaluate the role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the absence of treatment in our model. Notably, a similar implication of CD8<sup>+</sup> T cells on tumor control in humanized mice was reported for the TNBC MDA cell line treated with the anti-PD1 pembrolizumab [52]. Overall, we propose a model in which treatment with the anti-HVEM mAb would block the HVEM/*BTLA* inhibitory signaling on CD8<sup>+</sup> TILs that would increase their proliferation and numbers, associated with a reduction of their exhausted phenotype, ultimately leading to better tumor control.

#### 4. Conclusions

The recent success of ICI for cancer immunotherapy (anti-CTLA-4, anti-PD-1/PD-L1) has confirmed the hypothesis that the immune system can control many cancers, but disappointing results were obtained for PCa [4] which is in line with our observation that PD1/PD-L1 is not associated with lower PFI in PCa patients. In light of the promising results reported herein, anti-HVEM therapy might be combined with ICI and/or chemotherapy to further enhance anti-tumor immunity in PCa.

#### 5. Materials and Methods

##### 5.1. Preparation of Human Peripheral Mononuclear Cells

Human peripheral blood was obtained from Etablissement Francais du Sang (EFS) after obtaining informed consent from the donor. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using a Biocoll density gradient (Biochrom GmbH, Berlin, Germany). Cells were washed in PBS 3% FCS and diluted to the appropriate concentration in  $1 \times$  PBS before injection into mice.

##### 5.2. Humanized Mice Tumor Model

All animals used were NSG mice (stock  $\neq$  005557) purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). To assess therapeutic activity, 8–20-week-old males and females NSG mice were injected subcutaneously with  $2 \times 10^6$  tumor cells. One week later, mice were irradiated (2 Gy) and grafted the same day with  $2 \times 10^6$  huPBMC by retro-orbital injection. This experimental protocol was inspired by our previous work on setting up the lower limit of grafted PBMCs to limit GVHD in NSG mice [53]. Four to five days after transplantation, the anti-huHVEM antibody or isotype control was injected intraperitoneally at 2 mg/kg. General health status, body weight, and survival of mice were monitored every 3–4 days to evaluate GVHD progression. Mice with overt signs of GVHD, such as weight loss greater than 20% of their initial weight, hunched back, ruffled fur, and reduced mobility, were immediately sacrificed. For CD8 depletion, the optimal conditions and efficacy assessments have been previously described [54]. Briefly, mice were injected intraperitoneally with 10 mg/kg of the anti-CD8 MT807R1 (rhesus recombinant IgG1 provided by the Nonhuman Primate Reagent Resource [55]) or the isotype control (clone DSPR1) the day following humanization.

##### 5.3. Antibodies

The clone 18.10 has been described previously [56]. Briefly, 18.10, a murine IgG1 anti-human HVEM mAb, was produced as ascites and purified by protein A binding and elution with the Affi-gel Protein A MAPS II Kit (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). A Mouse IgG1 isotype control (clone MOPC-21 clone) was purchased from BioXCell (West Lebanon, NH, USA).

##### 5.4. Cell Lines

PC3 (non-hormonal-dependent human prostate cancer cells) and DU145 (prostate cancer cells) were grown in high-glucose DMEM supplemented with 10% FCS, L-glutamine, and antibiotics (penicillin/streptomycin, ThermoFisher, Les Ulis, France). The PC3 cell line was genetically authenticated before the initiation of the experiments (Eurofins). All cells were confirmed to be free of mycoplasmas before injection into mice using the MycoAlert detection kit (Lonza, Basel, Switzerland). Tumor growth was monitored using an electronic caliper, and volumes were determined using the following formula:  $[(\text{length} \times \text{width}^2)/2]$ . The animals were sacrificed and analyzed 21 days after the humanization.

##### 5.5. Generation of HVEM-Deficient PC3 Clone Using CRISPR-Cas9 RNP Transfection

A total of 50,000 PC3 cells were seeded into a 24-well plate. Twenty-four hours later, cells were incubated with sgRNA complementary to exon 3 of HVEM (GCCAU-UGAGGUGGGCAAUGU + Scaffold, TrueGuide synthetic guide RNAs, Invitrogen™,



ThermoFisher), Cas9 nuclease (TrueCut™ Cas9 Protein v.2, Invitrogen™, ThermoFisher), and Lipofectamine (Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Cas9 Transfection Reagent, Invitrogen™, ThermoFisher) according to the manufacturer instructions (TrueCut Cas9 Protein v.2 (27/09/2017)). After three days, the efficiency was evaluated using the GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit (Invitrogen™, ThermoFisher) according to the manufacturer's instructions. For this assay, DNA was amplified using the following primers: TGCGAAGTTCCCACTCTCTG (forward) and GGATAAGGGTCAGTCGCCAA (reverse). The cells were cloned by limiting dilution in 96-well plates. Clones were screened for HVEM expression by flow cytometry using anti-HVEM (clone 94801, BD, Le Pont de Claix, France) and were considered negative if HVEM expression was undetectable for at least three subsequent measurements.

#### 5.6. Phenotypic Analysis by Flow Cytometry

Tumors were digested with 0.84 mg/mL collagenase IV and 10 µg/mL DNase I (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 40 min at 37 °C with intermediate flushing of the tissue. Cells were passed through a 100 µm cell strainer and suspended in PBS containing 3% FCS. To eliminate dead cells and debris, we isolated tumor cell suspensions using a Bicol gradient. Rings were collected and washed, and cell pellets were suspended in PBS 3% FCS before counting on the LUNA™ Automated Cell Counter (Logos Biosystems, Villeneuve d'Ascq, France). Subsequently, up to  $2 \times 10^6$  live cells were stained with a viability dye (eF506, Fixable Viability Dye, ThermoFisher) for 12 min at 4 °C. Fc receptor binding was blocked with human FcR Blocking Reagent (120-000-442, Miltenyi Biotec, Paris, France) and anti-CD16/32 (clone 2.4G2) for 10 min. The following antibodies were added for 35 min at 4 °C: hCD45-BUV805 (HI30, BD), hCD3-PECyn7 (SK7, BD), hCD4-PerCP (RPA-T4, BioLegend, Amsterdam, The Netherlands), hCD8-APC-H7 (SK1, BD), hKi67-AF700 (B56, BD), hCD270-BV421 (cw10, BD), hBTLA-PE-CF594 (J168-540, BD), mCD45-BUV395 (30-F11, BD), hGranzymeB-APC (GB11, eBioscience, ThermoFisher), and hPerforin-PE (B-D48, BioLegend). For intracellular staining, Foxp3/transcription factor staining (eBioscience, ThermoFisher) or Cytofix/Cytoperm (BD) buffer sets were used. Cells were washed with  $1 \times$  PBS before acquisition on an  $\times 20$  cytometer (BD). The absolute count of different populations was determined by adding 50 µL of cell counting beads (Bangs Laboratories Fishers, IN, USA) before acquisition. Data were analyzed using FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR, USA).

#### 5.7. NanoString nCounter Expression Assay

For the NanoString® experiment, 14- to 15-week-old NSG mice were humanized and treated with anti-HVEM or isotype. On day 28 post-humanization, tumors were harvested and TILs were isolated as described above. To maximize mRNA recovery, we pooled TILs by treatment groups (four mice in the anti-HVEM group and five in the isotype control group). Cells were then stained with a viability dye (eF506) and anti-hCD45-APC (HI30, BioLegend). Live hCD45<sup>+</sup> cells were sorted using an Aria II cell sorter. After centrifugation, the cells were suspended in RLT buffer (Qiagen, Les Ulis, France) before freezing at  $-80$  °C until analysis. Data were normalized using NanoString's intrinsic negative and positive controls according to the normalization approach of the nSolver analysis software (Nanostring, Seattle, WA, USA).

#### 5.8. Bioinformatics Analysis

For ontology enrichment analysis, only genes upregulated by the treatment were analyzed using the enrichment analysis visualization Appyter to visualize Enrichr results [57]. The list of DEG (up- and downregulated) was ranked by fold-change for pre-ranked GSEA. Enrichment was performed with the C2 Canonical Pathways v.7.4 gene set using the GSEA 4.1.0 Linux desktop application [58] from the Broad Institute. With that workflow, a false discovery rate (FDR) or a family-wise error rate (FWER) less than 0.25 is deemed "significant". The Cancer Genome Atlas (TCGA) database was analyzed using the Xena browser

(<http://xena.ucsc.edu>, accessed on 9 June 2021) provided by the University of California (Santa Cruz, CA, USA) [59]. The Prostate Adenocarcinoma (PRAD) dataset was used with subsequent filterings on TNFRSF14, BTLA, PDCD1, and CD274 mRNA expression levels and Gleason clinical scores.

### 5.9. Statistical Analysis

All statistical tests were performed using Prism v.8 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA) or JASP v.0.14.3 (available at <https://jasp-stats.org>, accessed on 9 June 2021). The nature of the statistical test used to compare results is indicated in each figure legend. When necessary, the p-values of these tests are indicated in the figure panels. The statistical power of the analyses (alpha) was set arbitrarily at 0.05.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13123009/s1>, Figure S1: Anti-HVEM therapy in humanized mice, Figure S2: Human cell reconstitution in spleen and PC3 tumor of humanized mice, Figure S3: Granzyme B and perforin expression and frequencies in T cells in humanized mice, Figure S4: CD8 depletion efficiency in humanized mice, Figure S5: Enrichment analysis in TILs of anti-HVEM-treated mice. Figure S6: BTLA expression in CD3<sup>+</sup> TILs from PC3 tumors of humanized mice.

**Author Contributions:** Methodology, G.M.; formal analysis, G.M., S.B., and N.A.; investigation, S.B. and N.A.; resources, D.O.; writing—original draft preparation, G.M., S.B., and N.A.; writing—review and editing, D.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by INSERM Transfert, Cancéropôle Île-de-France and Association pour la recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP). The funders play no role in the design of the study and collection, nor in the analysis or interpretation of the data. S.B. was supported by a doctoral fellowship from the French Ministère de l'Éducation Supérieure et de la Recherche. N.A. was supported by a doctoral fellowship from the Fondation Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). D.O.'s team was supported by the grant "Equipe FRM DEQ201802339209". D.O. is senior scholar of the Institut Universitaire de France.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of Sorbonne University (protocol code 18/EFS/033). Mice were bred in our animal facility under specific pathogen-free conditions following current European legislation. All protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation Charles Darwin (Ce5/2012/025).

**Informed Consent Statement:** Human peripheral blood mononuclear cells were collected from healthy adult volunteers by Etablissement Français du Sang. Informed consent was obtained from all the subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available upon request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Olivier Bregerie, Flora Issert, and Doriane Foret for taking care of our mice; Pukar KC for technical help; Sylvaine Just-Landi for preparing the 18.10 mAb; Armanda Casrouge and Claude Baillou for cell sorting; and Benoit Salomon for critical reading of the manuscript. The results shown here are partly based upon data generated by the TCGA Research Network: <https://www.cancer.gov/tcga>.

**Conflicts of Interest:** D.O. declares competing interests as being the co-founder and shareholder of Imcheck Therapeutics, Alderaan Biotechnology, and Emergence Therapeutics, and has research funds from Imcheck Therapeutics, Alderaan Biotechnology, Collectis, and Emergence Therapeutics.

## Abbreviations

PBMC	peripheral blood mononuclear cells
HVEM	herpes virus entry mediator
BTLA	B and T lymphocyte attenuator
TILs	tumor-infiltrating leukocytes
NSG	NOD.SCID.γc-null
ICI	immune checkpoint inhibitors
RNP	ribonucleoproteins
DEG	differentially expressed genes
GVHD	graft vs. host disease
IPA	ingenuity pathway analysis
GSEA	gene set enrichment analysis
FDR	false discovery rate
FWER	family-wise error rate
PDX	patient-derived xenografts
PCa	prostate cancer
TCGA	The Cancer Genome Atlas
PRAD	prostate adenocarcinomas
PFI	progression-free interval

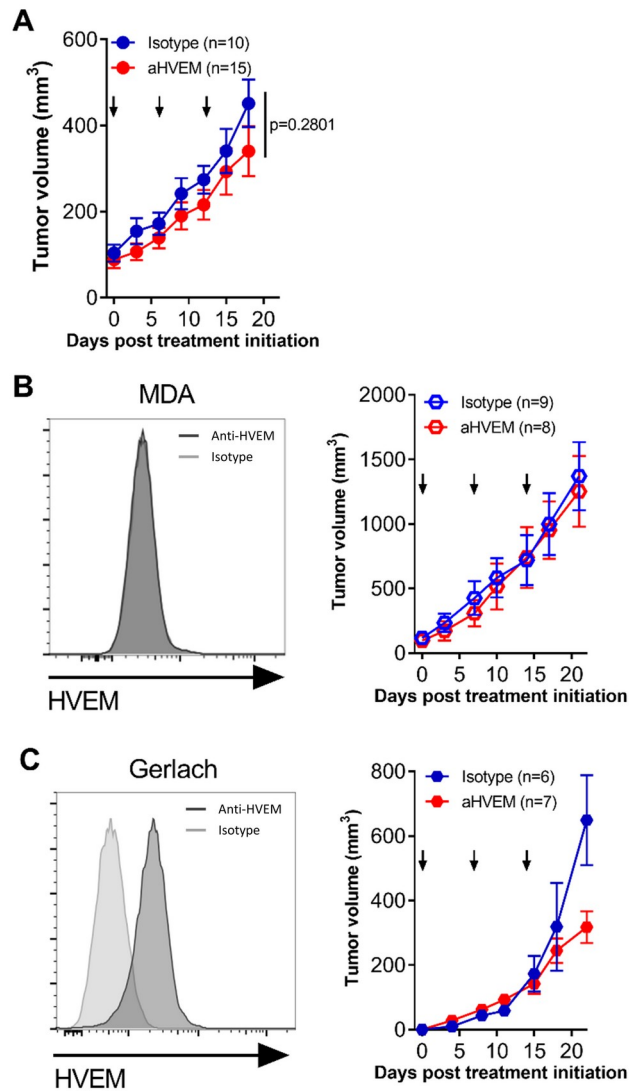
## References

- Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)]
- Mittal, D.; Gubin, M.M.; Schreiber, R.D.; Smyth, M.J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin. Immunol.* **2014**, *27*, 16–25. [[CrossRef](#)]
- Hargadon, K.M.; Johnson, C.E.; Williams, C.J. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *62*, 29–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kim, T.J.; Koo, K.C. Current status and future perspectives of checkpoint inhibitor immunotherapy for prostate cancer: A comprehensive review. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Havel, J.J.; Chowell, D.; Chan, T.A. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19*, 133. [[CrossRef](#)]
- Park, Y.-J.; Kuen, D.-S.; Chung, Y. Future prospects of immune checkpoint blockade in cancer: From response prediction to overcoming resistance. *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, 109. [[CrossRef](#)]
- Pasero, C.; Speiser, D.E.; Derré, L.; Olive, D. The HVEM network: New directions in targeting novel costimulatory/co-inhibitory molecules for cancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2012**, *12*, 478–485. [[CrossRef](#)]
- Ning, Z.; Liu, K.; Xiong, H. Roles of BTLA in Immunity and Immune Disorders. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 990. [[CrossRef](#)]
- Watanabe, N.; Gavrieli, M.; Sedy, J.R.; Yang, J.; Fallarino, F.; Loftin, S.K.; Hurchla, M.A.; Zimmerman, N.; Sim, J.; Zang, X.; et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat. Immunol.* **2003**, *4*, 670–679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cai, G.; Anumanthan, A.; Brown, J.A.; Greenfield, E.A.; Zhu, B.; Freeman, G.J. CD160 inhibits activation of human CD4<sup>+</sup> T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 176–185. [[CrossRef](#)]
- Tan, C.L.; Peluso, M.J.; Drijvers, J.M.; Mera, C.M.; Grande, S.M.; Brown, K.E.; Godec, J.; Freeman, G.J.; Sharpe, A.H. CD160 Stimulates CD8<sup>+</sup> T Cell Responses and Is Required for Optimal Protective Immunity to *Listeria monocytogenes*. *ImmunoHorizons* **2018**, *2*, 238–250. [[CrossRef](#)]
- Šedý, J.R.; Bjordahl, R.L.; Bekiaris, V.; Macauley, M.G.; Ware, B.C.; Norris, P.S.; Lurain, N.S.; Benedict, C.A.; Ware, C.F. CD160 Activation by Herpesvirus Entry Mediator Augments Inflammatory Cytokine Production and Cytolytic Function by NK Cells. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 828–836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Shaikh, R.B.; Santee, S.; Granger, S.W.; Butrovich, K.; Cheung, T.; Kronenberg, M.; Cheroutre, H.; Ware, C.F. Constitutive Expression of LIGHT on T Cells Leads to Lymphocyte Activation, Inflammation, and Tissue Destruction. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 6330–6337. [[CrossRef](#)]
- Harrop, J.A.; McDonnell, P.C.; Brigham-Burke, M.; Lyn, S.D.; Minton, J.; Tan, K.B.; Dede, K.; Spampanato, J.; Silverman, C.; Hensley, P.; et al. Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 27548–27556. [[CrossRef](#)]
- Cheung, T.C.; Steinberg, M.W.; Osborne, L.M.; Macauley, M.G.; Fukuyama, S.; Sanjo, H.; D’Souza, C.; Norris, P.S.; Pfeffer, K.; Murphy, K.M.; et al. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 6244–6249. [[CrossRef](#)]
- Inoue, T.; Sho, M.; Yasuda, S.; Nishiwada, S.; Nakamura, S.; Ueda, T.; Nishigori, N.; Kawasaki, K.; Obara, S.; Nakamoto, T.; et al. HVEM Expression Contributes to Tumor Progression and Prognosis in Human Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* **2015**, *35*, 1361–1367. [[PubMed](#)]

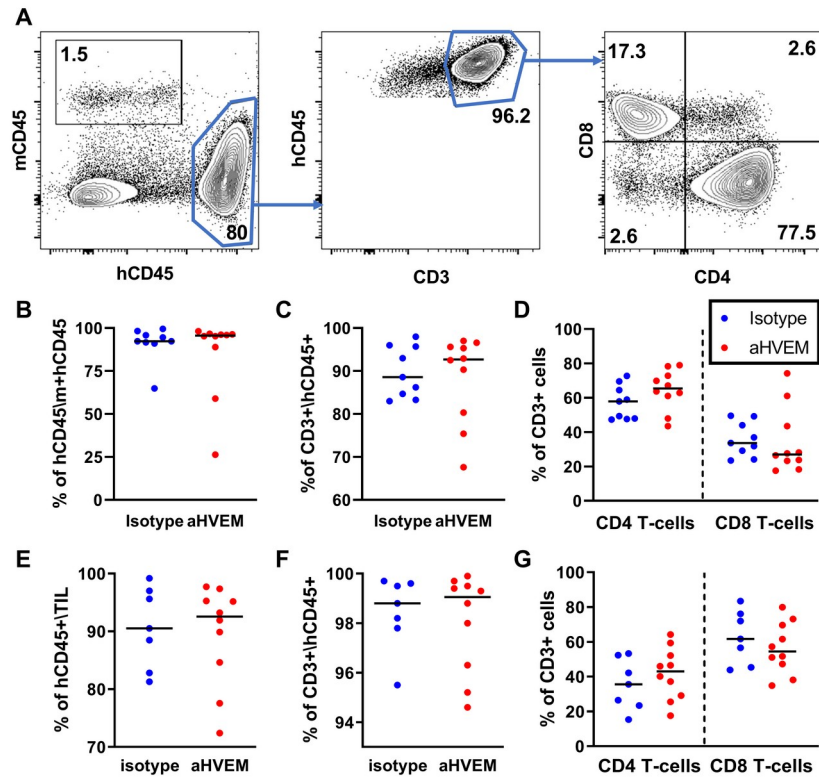
17. Malissen, N.; Macagno, N.; Granjeaud, S.; Granier, C.; Moutardier, V.; Gaudy-Marqueste, C.; Habel, N.; Mandavit, M.; Guillot, B.; Pasero, C.; et al. HVEM has a broader expression than PD-L1 and constitutes a negative prognostic marker and potential treatment target for melanoma. *Oncoimmunology* **2019**, *8*, e1665976. [[CrossRef](#)]
18. Migita, K.; Sho, M.; Shimada, K.; Yasuda, S.; Yamato, I.; Takayama, T.; Matsumoto, S.; Wakatsuki, K.; Hotta, K.; Tanaka, T.; et al. Significant involvement of herpesvirus entry mediator in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* **2014**, *120*, 808–817. [[CrossRef](#)]
19. Lan, X.; Li, S.; Gao, H.; Nanding, A.; Quan, L.; Yang, C.; Ding, S.; Xue, Y. Increased BTLA and HVEM in gastric cancer are associated with progression and poor prognosis. *OncoTargets Ther.* **2017**, *10*, 919–926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Hokuto, D.; Sho, M.; Yamato, I.; Yasuda, S.; Obara, S.; Nomi, T.; Nakajima, Y. Clinical impact of herpesvirus entry mediator expression in human hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Cancer* **2015**, *51*, 157–165. [[CrossRef](#)]
21. Tsang, J.Y.S.; Chan, K.-W.; Ni, Y.-B.; Hlaing, T.; Hu, J.; Chan, S.-K.; Cheung, S.-Y.; Tse, G.M. Expression and Clinical Significance of Herpes Virus Entry Mediator (HVEM) in Breast Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **2017**, *24*, 4042–4050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. M’Hidi, H.; Thibult, M.L.; Chetaille, B.; Rey, F.; Bouadallah, R.; Nicollas, R.; Olive, D.; Xerri, L. High expression of the inhibitory receptor BTLA in T-follicular helper cells and in B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* **2009**, *132*, 589–596. [[CrossRef](#)]
23. Wang, Q.; Ye, Y.; Yu, H.; Lin, S.-H.; Tu, H.; Liang, D.; Chang, D.W.; Huang, M.; Wu, X. Immune checkpoint-related serum proteins and genetic variants predict outcomes of localized prostate cancer, a cohort study. *Cancer Immunol. Immunother.* **2020**, *70*, 701–712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Park, J.-J.; Anand, S.; Zhao, Y.; Matsumura, Y.; Sakoda, Y.; Kuramasu, A.; Strome, S.E.; Chen, L.; Tamada, K. Expression of anti-HVEM single-chain antibody on tumor cells induces tumor-specific immunity with long-term memory. *Cancer Immunol. Immunother.* **2012**, *61*, 203–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Han, L.; Wang, W.; Fang, Y.; Feng, Z.; Liao, S.; Li, W.; Li, Y.; Li, C.; Maitituoheti, M.; Dong, H.; et al. Soluble B and T Lymphocyte Attenuator Possesses Antitumor Effects and Facilitates Heat Shock Protein 70 Vaccine-Triggered Antitumor Immunity against a Murine TC-1 Cervical Cancer Model In Vivo. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 7842–7850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Oguro, S.; Ino, Y.; Shimada, K.; Hatanaka, Y.; Matsuno, Y.; Esaki, M.; Nara, S.; Kishi, Y.; Kosuge, T.; Hiraoka, N. Clinical significance of tumor-infiltrating immune cells focusing on BTLA and Cbl-b in patients with gallbladder cancer. *Cancer Sci.* **2015**, *106*, 1750–1760. [[CrossRef](#)]
27. Quan, L.; Lan, X.; Meng, Y.; Guo, X.; Guo, Y.; Zhao, L.; Chen, X.; Liu, A. BTLA marks a less cytotoxic T cell subset in diffuse large B-cell lymphoma with high expression of checkpoints. *Exp. Hematol.* **2018**, *60*, 47–56. [[CrossRef](#)]
28. Derré, L.; Rivals, J.P.; Jandus, C.; Pastor, S.; Rimoldi, D.; Romero, P.; Michielin, O.; Olive, D.; Speiser, D.E. BTLA mediates inhibition of human tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells that can be partially reversed by vaccination. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 157–167. [[CrossRef](#)]
29. Shultz, L.D.; Schweitzer, P.A.; Christianson, S.W.; Gott, B.; Schweitzer, I.B.; Tennent, B.; McKenna, S.; Mobraaten, L.; Rajan, T.V.; Greiner, D.L. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol.* **1995**, *154*, 180–191.
30. DeRose, Y.S.; Wang, G.; Lin, Y.-C.; Bernard, P.S.; Buys, S.S.; Ebbert, M.T.W.; Factor, R.; Matsen, C.; Milash, B.A.; Nelson, E.; et al. Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1514–1520. [[CrossRef](#)]
31. Bankert, R.B.; Balu-Iyer, S.V.; Odunsi, K.; Shultz, L.D.; Kelleher, R.J.; Barnas, J.L.; Simpson-Abelson, M.; Parsons, R.; Yokota, S.J. Humanized mouse model of ovarian cancer recapitulates patient solid tumor progression, ascites formation, and metastasis. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e24420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Chen, X.; Shen, C.; Wei, Z.; Zhang, R.; Wang, Y.; Jiang, L.; Chen, K.; Qiu, S.; Zhang, Y.; Zhang, T.; et al. Patient-derived non-small cell lung cancer xenograft mirrors complex tumor heterogeneity. *Cancer Biol. Med.* **2021**, *18*, 184–198. [[CrossRef](#)]
33. Quintana, E.; Piskounova, E.; Shackleton, M.; Weinberg, D.; Eskiocak, U.; Fullen, D.R.; Johnson, T.M.; Morrison, S.J. Human melanoma metastasis in NSG mice correlates with clinical outcome in patients. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 159ra149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Rea, D.; Del Vecchio, V.; Palma, G.; Barbieri, A.; Falco, M.; Luciano, A.; De Biase, D.; Perdonà, S.; Facchini, G.; Arra, C. Mouse Models in Prostate Cancer Translational Research: From Xenograft to PDX. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*. [[CrossRef](#)]
35. De La Rochere, P.; Guil-Luna, S.; Decaudin, D.; Azar, G.; Sidhu, S.S.; Piaggio, E. Humanized Mice for the Study of Immunology. *Trends Immunol.* **2018**, *39*, 748–763. [[CrossRef](#)]
36. Wang, Y.; Singh, N.K.; Spear, T.T.; Hellman, L.M.; Piepenbrink, K.H.; McMahan, R.H.; Rosen, H.R.; Vander Kooi, C.W.; Nishimura, M.I.; Baker, B.M. How an alloreactive T cell receptor achieves peptide and MHC specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E4792–E4801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Felix, N.J.; Allen, P.M. Specificity of T cell alloreactivity. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 942–953. [[CrossRef](#)]
38. Kearney, C.J.; Vervoort, S.J.; Hogg, S.J.; Ramsbottom, K.M.; Freeman, A.J.; Lalaoui, N.; Pijpers, L.; Michie, J.; Brown, K.K.; Knight, D.A.; et al. Tumor immune evasion arises through loss of TNF sensitivity. *Sci. Immunol.* **2018**, *3*, eaar3451. [[CrossRef](#)]
39. Simoni, Y.; Becht, E.; Fehlings, M.; Loh, C.Y.; Koo, S.; Teng, K.W.W.; Yeong, J.P.S.; Nahar, R.; Zhang, T.; Kared, H.; et al. Bystander CD8<sup>+</sup> T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. *Nature* **2018**, *557*, 575–579. [[CrossRef](#)]



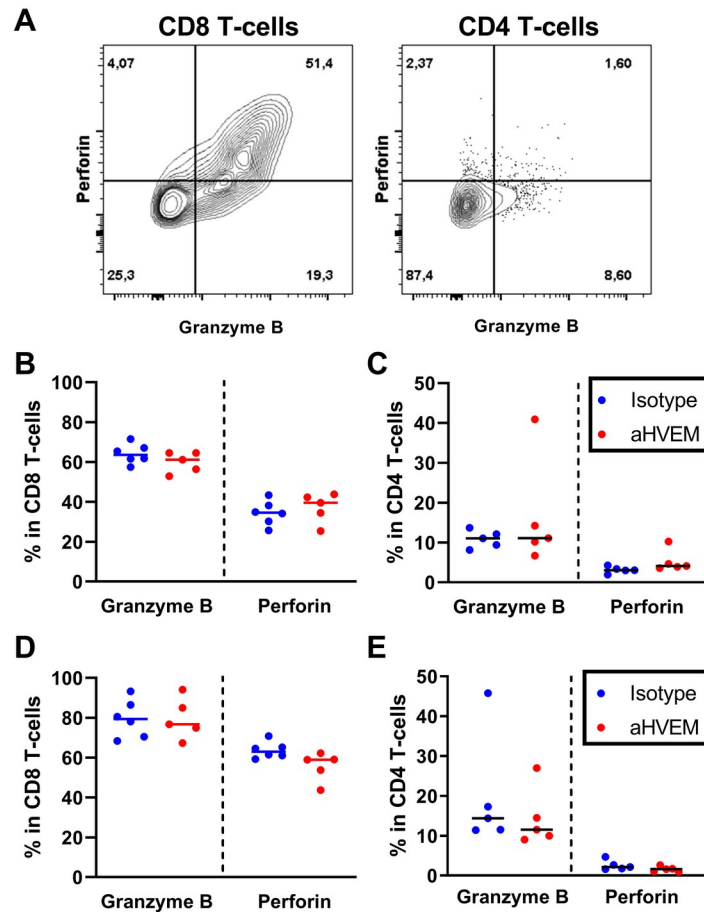
40. Roth, M.D.; Harui, A. Human tumor infiltrating lymphocytes cooperatively regulate prostate tumor growth in a humanized mouse model. *J. Immunother. Cancer* **2015**, *3*, 12. [[CrossRef](#)]
41. Jespersen, H.; Lindberg, M.F.; Donia, M.; Söderberg, E.M.V.; Andersen, R.; Keller, U.; Ny, L.; Svane, I.M.; Nilsson, L.M.; Nilsson, J.A. Clinical responses to adoptive T cell transfer can be modeled in an autologous immune-humanized mouse model. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1–10. [[CrossRef](#)]
42. Ali, N.; Flutter, B.; Rodriguez, R.S.; Sharif-Paghaleh, E.; Barber, L.D.; Lombardi, G.; Nestle, F.O. Xenogeneic Graft-versus-Host-Disease in NOD-scid IL-2R $\alpha$  Mice Display a T-Effector Memory Phenotype. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44219. [[CrossRef](#)]
43. Morel, Y.; Schiano de Colella, J.-M.; Harrop, J.; Deen, K.C.; Holmes, S.D.; Wattam, T.A.; Khandekar, S.S.; Truneh, A.; Sweet, R.W.; Gastaut, J.-A.; et al. Reciprocal Expression of the TNF Family Receptor Herpes Virus Entry Mediator and Its Ligand LIGHT on Activated T Cells: LIGHT Down-Regulates Its Own Receptor. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 4397–4404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Murphy, K.M.; Nelson, C.A.; Šedý, J.R. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 671–681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Sasaki, Y.; Hokuto, D.; Inoue, T.; Nomi, T.; Yoshikawa, T.; Matsuo, Y.; Koyama, F.; Sho, M. Significance of Herpesvirus Entry Mediator Expression in Human Colorectal Liver Metastasis. *Ann. Surg. Oncol.* **2019**, *26*, 3982–3989. [[CrossRef](#)]
46. Compaan, D.M.; Gonzalez, L.C.; Tom, I.; Loyet, K.M.; Eaton, D.; Hymowitz, S.G. Attenuating lymphocyte activity: The crystal structure of the BTLA-HVEM complex. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 39553–39561. [[CrossRef](#)]
47. Steinberg, M.W.; Cheung, T.C.; Ware, C.F. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. *Immunol. Rev.* **2011**, *244*, 169–187. [[CrossRef](#)]
48. Lasaro, M.O.; Sazanovich, M.; Giles-Davis, W.; Mrass, P.; Bunte, R.M.; Sewell, D.A.; Hussain, S.F.; Fu, Y.-X.; Weninger, W.; Paterson, Y.; et al. Active Immunotherapy Combined With Blockade of a Coinhibitory Pathway Achieves Regression of Large Tumor Masses in Cancer-prone Mice. *Mol. Ther.* **2011**, *19*, 1727–1736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Zhang, T.; Ye, L.; Han, L.; He, Q.; Zhu, J. Knockdown of HVEM, a Lymphocyte Regulator Gene, in Ovarian Cancer Cells Increases Sensitivity to Activated T Cells. *Oncol. Res.* **2016**, *24*, 189–196. [[CrossRef](#)]
50. Anderson, A.C.; Joller, N.; Kuchroo, V.K. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity* **2016**, *44*, 989–1004. [[CrossRef](#)]
51. De Sousa Lihares, A.; Leitner, J.; Grabmeier-Pfistershammer, K.; Steinberger, P. Not All Immune Checkpoints Are Created Equal. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1909. [[CrossRef](#)]
52. Wang, M.; Yao, L.C.; Cheng, M.; Cai, D.; Martinek, J.; Pan, C.X.; Shi, W.; Ma, A.H.; De Vere White, R.W.; Airhart, S.; et al. Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy. *FASEB J.* **2018**, *32*, 1537–1549. [[CrossRef](#)]
53. Petit, N.Y.; Baillou, C.; Burlion, A.; Dorgham, K.; Levacher, B.; Amiel, C.; Schneider, V.; Lemoine, F.M.; Gorochov, G.; Marodon, G. Gene transfer of two entry inhibitors protects CD4<sup>+</sup> T cell from HIV-1 infection in humanized mice. *Gene Ther.* **2016**, *23*, 144–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Petit, N.Y.; Lambert-Niclot, S.; Marcelin, A.-G.; Garcia, S.; Marodon, G. HIV Replication Is Not Controlled by CD8<sup>+</sup> T Cells during the Acute Phase of the Infection in Humanized Mice. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0138420. [[CrossRef](#)]
55. Schmitz, J.E.; Simon, M.A.; Kuroda, M.J.; Lifton, M.A.; Ollert, M.W.; Vogel, C.W.; Racz, P.; Tenner-Racz, K.; Scallon, B.J.; Dalesandro, M.; et al. A nonhuman primate model for the selective elimination of CD8<sup>+</sup> lymphocytes using a mouse-human chimeric monoclonal antibody. *Am. J. Pathol.* **1999**, *154*, 1923–1932. [[CrossRef](#)]
56. Gertner-Dardenne, J.; Fauriat, C.; Orlanducci, F.; Thibult, M.L.; Pastor, S.; Fitzgibbon, J.; Bouabdallah, R.; Xerri, L.; Olive, D. The co-receptor BTLA negatively regulates human V $\alpha$ 9V $\beta$ 2 T cell proliferation: A potential way of immune escape for lymphoma cells. *Blood* **2013**, *122*, 922–931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Xie, Z.; Bailey, A.; Kuleshov, M.V.; Clarke, D.J.B.; Evangelista, J.E.; Jenkins, S.L.; Lachmann, A.; Wojciechowicz, M.L.; Kropiwnicki, E.; Jagodnik, K.M.; et al. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. *Curr. Protoc.* **2021**, *1*, e90. [[CrossRef](#)]
58. Subramanian, A.; Kuehn, H.; Gould, J.; Tamayo, P.; Mesirov, J.P. GSEA-P: A desktop application for gene set enrichment analysis. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 3251–3253. [[CrossRef](#)]
59. Goldman, M.J.; Craft, B.; Hastie, M.; Repečka, K.; McDade, F.; Kamath, A.; Banerjee, A.; Luo, Y.; Rogers, D.; Brooks, A.N.; et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat. Biotechnol.* **2020**, *38*, 675–678. [[CrossRef](#)]



**Figure S1: Anti-HVEM therapy in humanized mice.** (A) Mean tumor volume ( $\pm$  SEM) of the PC3 prostate cancer cell line in non-humanized NSG mice at the indicated time after treatment initiation. Arrows indicates days of the injection of the anti-HVEM mAb. Number of mice are indicated in brackets. The p value is the result of a linear regression analysis testing the null hypothesis that the two slopes are identical. Results are compiled from 3 independent experiments. (B) Expression of HVEM on the MDA-MB-231 breast cancer cell line (MDA) by flow cytometry. Pale grey histogram is from the FMO control. Mean tumor volume ( $\pm$  SEM) of MDA-MB-231 cells in humanized mice treated at the indicated times with the anti-HVEM mAb (arrows). Number of mice included in the study are indicated in brackets. Results are compiled from 2 independent experiments. (C) Expression of HVEM on the Gerlach melanoma cell line by flow cytometry. Pale grey histogram is from the FMO control. Mean tumor volume ( $\pm$  SEM) of Gerlach cells in humanized mice treated at the indicated times with the anti-HVEM mAb (arrows). Number of mice included in the study are indicated in brackets. Results are compiled from 2 independent experiments.

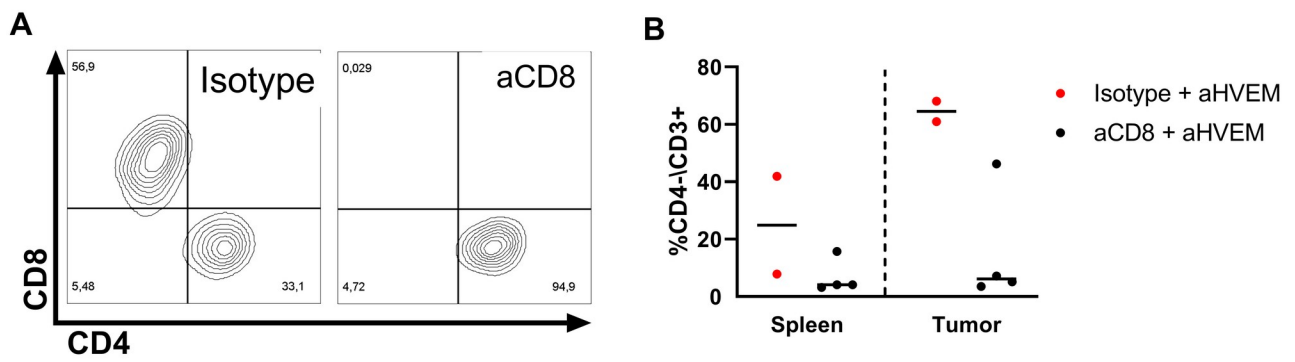


**Figure S2: Human cell reconstitution in spleen and PC3 tumor of humanized mice. (A)** Representative dot plot showing the gating strategy to determine the frequencies of human cells in the spleens of humanized mice. **(B)** Frequencies of human CD45<sup>+</sup> cells among total CD45<sup>+</sup> cells (murine + human (m+h)) from spleens of humanized mice **(C)** Frequencies of CD3<sup>+</sup> cells among human CD45<sup>+</sup> cells. **(D)** Frequencies of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells in CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells. Same results for **(E)** CD45<sup>+</sup>, **(F)** CD3<sup>+</sup>, **(G)** CD4 and CD8 T-cells from PC3 tumors are shown. Each dot is a mouse. Results were obtained at D24 after transfer of human PBMCs and are cumulative of 2 independent experiments.

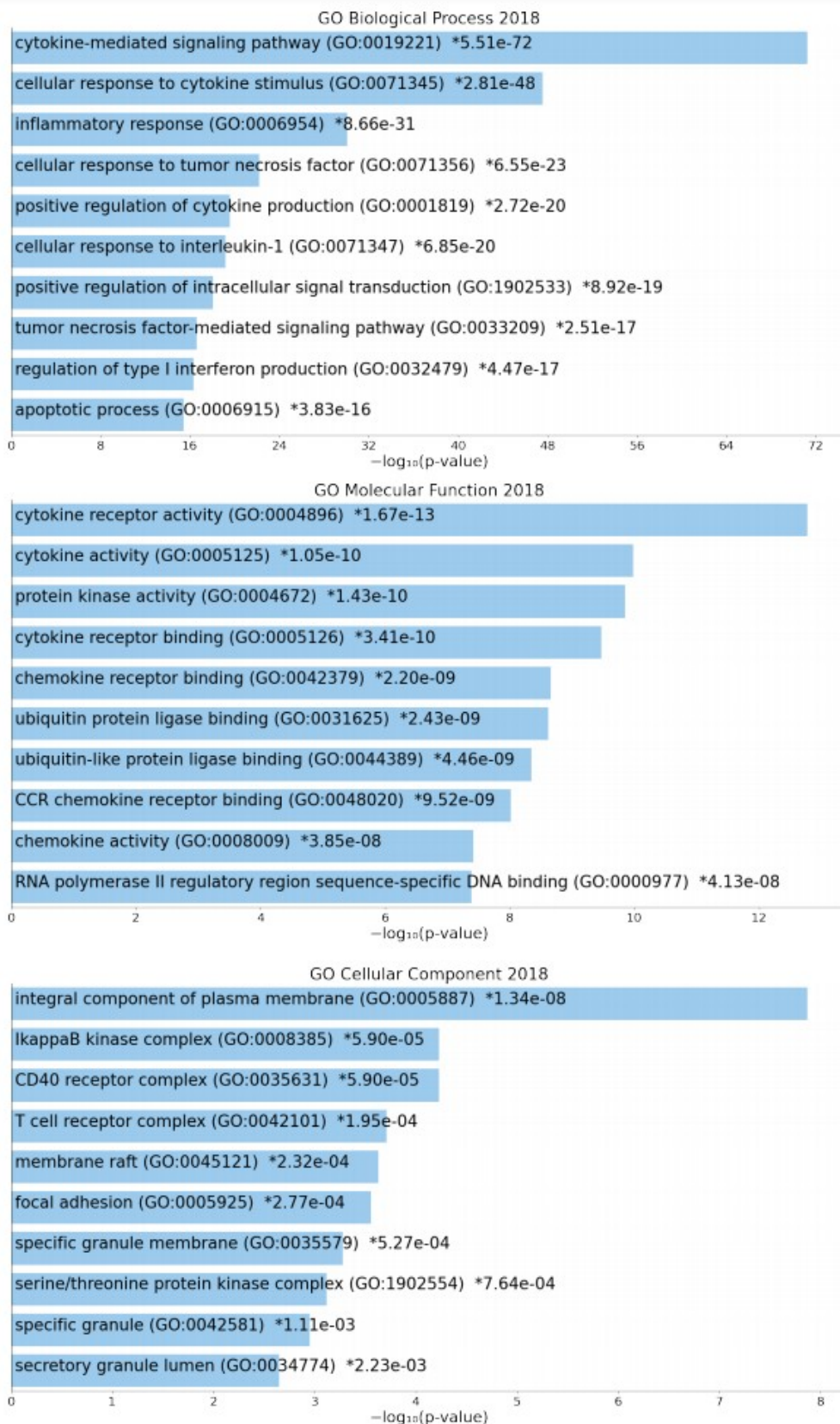


**Figure S3 : Granzyme B and Perforin expression and frequencies in T-cells of humanized mice.** (A) Representative contour plot of granzyme B and perforin expression in CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cells from PC3 tumor. (B-E) Cumulative frequencies of granzyme B and perforin without ex vivo stimulation in CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cells in spleens (B, C) or PC3 tumors (D, E) of humanized mice at day 21 after treatment initiation. Each dot is a mouse. Data are from one experiment.

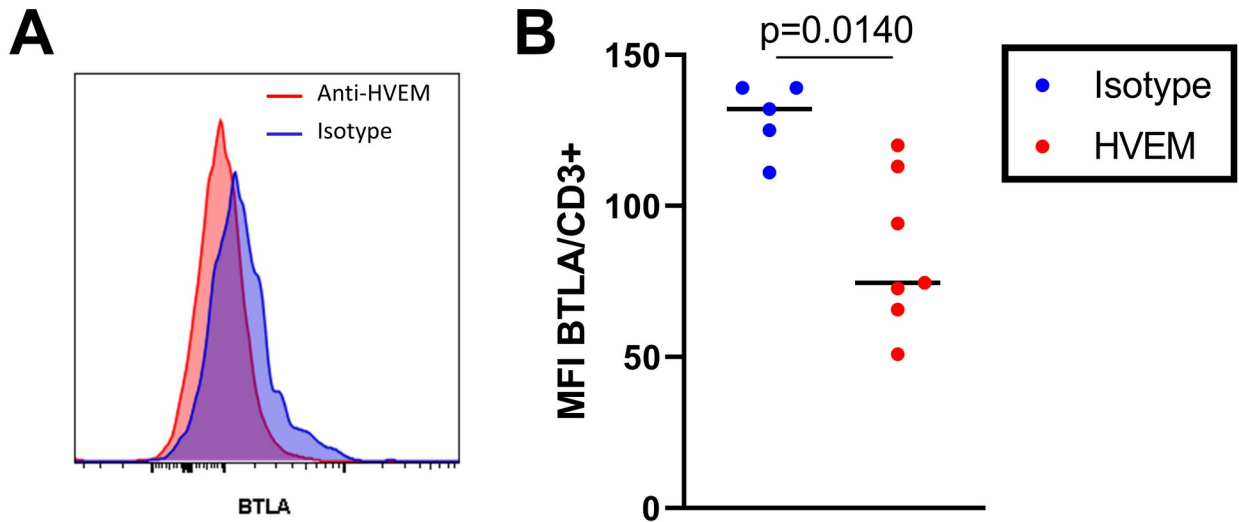




**Figure S4: CD8 depletion efficiency in humanized mice. (A)** Representative contour plot of CD4 and CD8 staining in CD45/CD3<sup>+</sup> T-cells from the spleen of humanized mice treated with isotype or anti CD8 depleting reagent (aCD8). **(B)** Frequencies of CD4<sup>-</sup> in CD3<sup>+</sup> T-cells in spleens and PC3 tumors of humanized mice at day 24 post CD8 depletion. All mice were treated with anti-HVEM (aHVEM). Each dot is a mouse. Data are from one representative experiment out of two.



**Figure S5: Enrichment analysis in TILs of anti-HVEM-treated mice.** A list of DEG up regulated by the antiHVEM treatment in CD45+ TILs was entered in Enrichr and analyzed with Apytyer. The top 10 ontologies in each of the indicated categories (Biological process, Molecular function and Cellular component) are represented according to their p value from an exact Fisher test embedded in the application. A star denotes an adjusted p value inferior to 0.05.



**Figure S6 : BTLA expression in CD3<sup>+</sup> TILs from PC3 tumors of humanized mice. (A)** Representative expression of BTLA expression in anti-HVEM- or isotype-treated mice. **(B)** Median fluorescence intensity (MFI) of BTLA at day 21 post-humanization. Each dot is a mouse. Data are from one representative experiment out of two. The p values are from a Mann-Whitney t test.

## II) Etude de l'impact de l'expression par la tumeur de ligands de molécules exprimées par les Treg sur la réponse immunitaire antitumorale

### a) Rôle d'ICOS-L exprimé par la tumeur dans un modèle de souris humanisée

#### *Contexte et Objectif*

Dans une étude antérieure, l'équipe a pu montrer que les Treg étaient les cellules, isolées de la tumeur, qui exprimaient le plus fortement ICOS chez les patientes atteintes d'un cancer du sein. Par ailleurs, une forte expression du gène *ICOSLG* au sein de la tumeur est associée à un mauvais pronostic. Plusieurs études ont montré un lien entre les pDC ICOS-L<sup>+</sup> et les Treg dans le cancer ; néanmoins, les interactions directes entre la tumeur et les cellules immunitaires restent largement inexplorées, qui plus est via ICOS-L et dans le cancer du sein. Or, des données suggèrent qu'ICOS-L est largement exprimé par les cellules tumorales. Ainsi, ce projet a pour objectif d'évaluer l'impact de l'expression d'ICOS-L par les cellules tumorales sur les Treg et la réponse immunitaire antitumorale.

#### *Méthode*

Nous avons généré une lignée déficiente pour *ICOSLG*, à partir de la lignée de cancer du sein triple négatif MDA-MB-231. Cette lignée ainsi qu'une lignée contrôle ont été implantées dans des souris immunodéficientes ou humanisées avec des cellules humaines CD34<sup>+</sup> afin d'en comparer les croissances. A partir des TIL isolés de ces tumeurs, nous avons réalisé une caractérisation de la réponse immunitaire par cytométrie spectrale.

#### *Résultats*

En souris immunodéficientes, l'absence d'ICOS-L exprimé par la tumeur n'a pas affecté la croissance tumorale. En revanche, en souris humanisées, cette déficience a été associée avec un meilleur contrôle de la tumeur. L'analyse des TIL isolés de ces tumeurs a mis en évidence une diminution de la fréquence des Treg, ainsi que des macrophages M2. Cette diminution était accompagnée d'une forte activation des lymphocytes T effecteurs.

#### *Conclusion*

En conclusion, la délétion d'ICOS-L au sein de la tumeur est associée à la baisse de la fréquence des cellules régulatrices, une augmentation de l'activation des cellules effectrices et, *in fine*, un meilleur contrôle de la croissance tumorale.

*Les résultats de ces travaux sont présentés sous la forme d'un article court qui n'a pas vocation à être soumis pour publication en l'état, une analyse par séquençage ARN sur cellules uniques étant en cours et quelques expériences in vitro devant être réalisées pour confirmer ou infirmer certaines hypothèses. Ces points seront détaillés plus amplement dans la section discussion de la thèse.*

# **The Inducible Costimulatory ligand expressed by tumor cells promotes tumor growth by modulation of regulatory T cells and M2-like macrophages in a model of triple-negative breast cancer in humanized mice**

Nicolas Aubert, Etienne Camenen, Mustapha Cherai, Aness Haddouche, Anne-Elodie Receveur, Makoto Miyara, Gilles Marodon

## **Abstract**

Hijacking of immune tolerance is one the main mechanism of cancer escape. Here, we evaluated how the expression of the Inducible COStimulatory ligand (ICOSLG) by tumor cells promotes tolerance and affects the anti-tumor immune response to breast cancer in a humanized mice model. To do so, we first analyzed the TCGA dataset and showed that ICOSLG expression is associated with reduced overall survival. Furthermore, suppressive cells (M2 and Tregs) are increased in breast cancer expressing high levels of *ICOSLG*, as shown by deconvolution analysis. Using CRISPR/Cas9, we generated an *ICOSLG* knock-out clone of MDA-MB-231, a triple negative breast cancer cell line. As a control, ICOSLG expression was restored by lentiviral transduction in the KO clone. We first show that deletion of *ICOSLG* has no intrinsic effect on tumor growth in immunocompromised mice. However, the growth of the KO clone is strongly reduced in mice humanized with CD34<sup>+</sup> human hematopoietic progenitors relative to the control clone. Using spectral flow cytometry, we show that this better immune control is associated with a reduction in frequencies and numbers of immunosuppressive cells, including M2 macrophages and Tregs, with a simultaneous increase of effector T-cells with an activated phenotype. Overall, our results suggest that high expression of ICOSLG by tumor cells promotes tumor growth by modulation of immunosuppressive cells.

## Introduction

Immune escape by tumor is one of the hallmarks of cancers<sup>1</sup>. Several mechanisms may explain how tumors co-opt natural tolerance, including loss of MHC expression, expression of co-inhibitory molecules or promotion of immune regulatory cells<sup>2</sup>. Therefore, targeting these regulatory cells is a possible strategy to improve tumor control<sup>3</sup>.

Regulatory T-cells (Tregs) and M2 macrophages are two major suppressive immune cell populations negatively associated with prognosis in many cancers including breast cancer<sup>4</sup>. These two subsets are linked together, as Tregs secrete cytokines such as IL-10 and TGF- $\beta$  that can polarize macrophages into M2 and macrophages are associated with Treg recruitment in the tumor by secreting of CCL20<sup>5-7</sup>. Therefore, targeting one of these population may also impact the other one.

In a previous work, our team showed that Tregs isolated from breast cancer patient tumors expressed high level of Inducible COStimulatory molecule (ICOS, CD278)<sup>8</sup>. Several studies in different cancer have showed that plasmacytoid DC expressing ICOS ligand (ICOS-L) are associated with accumulation of immunosuppressive CD4+ T-cells<sup>9-11</sup>. Recent data showed that, in melanoma, high level of MHC class II on the tumor was associated with an increase of tumor specific Treg supporting the hypothesis of direct interaction between tumor and Tregs<sup>12</sup>. Interestingly, according to the human protein atlas, ICOS-L is widely expressed in cancers, including breast cancer<sup>13,14</sup>. However, little is known about the direct interaction between tumor cells and immune infiltrating cells, even less, through ICOS-L expressed by the tumor. Therefore, one could ask if tumor-expressed ICOS-L may interact with ICOS on Tregs and promote their expansion and function *in situ* in breast cancer, as it was recently described in glioblastoma or melanoma<sup>12,15</sup>.

In this study, we explored the impact of deleting the expression of ICOS-L by the tumor on the immune response of NOD-*Prkdc<sup>scid</sup>-IL2rg<sup>Tm1</sup>*/Rj (NXG) mice humanized with CD34+ hematopoietic stem cells. To do so, we grafted humanized NXG mice with CRISPR/Cas9 modified triple negative breast cancer cell line, MDA-MB-231. This model allows to explore a wide variety of human cells including T- (effector and regulatory), B-, NK- and myeloid cells and to replicate some mechanism observed in patients such as production of IFN $\gamma$  by CD8 T-

cells and reduction of regulatory cells following treatment with immune checkpoint blockade antibodies<sup>16,17</sup>.

We show that the absence of tumor ICOS-L is associated with a marked reduction of tumor growth. We then performed spectral flow cytometry to quantify and characterize several immune subsets from the tumor. We show that Tregs, as well as M2-like macrophages, frequencies are significantly reduced in TIL and this is associated with a strong activation of effector T-cells.

## **Results & Discussion**

### *ICOSLG level is associated with variations in immune cells frequencies in breast cancer*

Using the TCGA (The Cancer Genome Atlas) BRCA (Breast Cancer) dataset, we showed that high level of expression of ICOSLG is associated with a decrease in overall survival<sup>18,19</sup> (Figure 1A). To compare the relative abundance of immune subsets, including B-, T-, NK- and myeloid-cells between high and low ICOSLG expressing tumors, we developed the R package *tcgaViz*<sup>20</sup>. This package allows the comparison of immune cells population deconvoluted from the TCGA with multiple algorithms in tumors of the patients stratified by the level of expression of a gene. In this study, we used the algorithm *cibersort\_ABS* which allows the comparison of 22 immune subsets<sup>21</sup>(Figure 1B). According to our analysis, high level of ICOSLG in the sample was associated with a significant increase in memory B-cells, macrophages (M1 and M2) resting DCs and NK-cells which have been shown to express ICOS-L<sup>22-24</sup>. More interestingly, Tregs, that only express ICOS, the receptor of ICOS-L, were also increased in ICOSLG high samples. Therefore, the increase in Tregs proportion may be the consequence of stimulation through ICOS-ICOSLG<sup>25</sup>, which may also explain the negative prognosis associated with high ICOSLG expression<sup>26</sup>. Moreover, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells, which also expressed ICOS upon activation, were significantly increased with ICOSLG level. However, given the high heterogeneity in tumors, we cannot exclude that high ICOSLG expression in the biopsy is not representative of the expression by the tumor itself but only the consequence of a biopsy in tertiary lymphoid structure rich region of the tumor with contains high density of B-cells<sup>27</sup>. Moreover, we have no clue of the spatial localization of the cells.

### *Absence of ICOSLG is associated with a better control of tumor growth in humanized mice*



To determine the impact of the expression of ICOSLG by the tumor itself on immune cells in the tumor environment, we generated an ICOSLG KO clone of the triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231 using CRISPR-Cas9 technology by deleting exon 4, leading to the deletion of the transmembrane region (Figure S1A). Efficacy of deletion was verified by flow cytometry (Figure S1B) and by sequencing of the gene of ICOSLG (Figure S1C). To ensure that our results were not an artifact of subcloning, we reinstalled the ICOSLG gene into the KO clone using a lentivirus vector leading to the control cell line. (Figure S1D). Then, we grafted these cell lines into immunodeficient NSG mice to exclude intrinsic differences between 3C1 and 3I10. The two cell lines grew similarly, showing that the absence of ICOSLG did not alter growth of our tumors (Figure 2A). Then, we moved to humanized mice generated by grafting of CD34<sup>+</sup> human hematopoietic stem cells. These mice possess a diversified and functional human immune system with T-, B-, NK- and myeloid cells<sup>8</sup>. In these humanized mice, we observed a significant reduction of tumor growth and tumor weight with ICOSLG-KO clone, showing that the human immune response was inhibited by tumor expression of ICOSLG (Figure 2B-D).

#### *Absence of ICOSLG increases activation of intratumor T-cells*

To characterize changes in TIL composition, we performed spectral flow cytometry on the *ex vivo* extracted TIL. We observe a strong shift to an activated phenotype of the T-cells from the ICOSLG-KO tumors (Figure 3A-B). In contrast to control tumor, almost 50% of CD8<sup>+</sup> T-cells (versus 5%) expressed the cytotoxic molecules granzyme B as well as several activation markers such as HLA DR, Ki67, PD1, TIGIT or Helios (Figure 3C). For CD4<sup>+</sup> T-cells, we observe a similar activation profile. Of note, most T-cells loose ICOS expression when the tumor expresses ICOSLG which is not the case in the periphery (Figure S2). These low levels of ICOS with the control cell line may be the consequence of a masking effect by tumor ICOSLG.

#### *Expression of ICOSLG by the tumor is associated with an accumulation of cells with regulatory phenotype*

Regarding regulatory cells, we show a tendency for a reduction of Treg proportion among CD4<sup>+</sup> T-cells in the absence of ICOSLG on the tumor (11,8% +/- 7,7 vs 28,8% +/- 15,2) (Figure 4A). Moreover, the main subset of Treg which seem to be affected was the TNFR2<sup>high</sup> which has been described to be highly suppressive in mouse<sup>28</sup> (cluster 4, Figure 3A). Consequently to this

drop in Treg frequencies, we observe a tendency for an increase of the CD8/Treg ratio (Figure 4B), reported as beneficial for antitumor immune response in several cancer<sup>29</sup>. Moreover, this reduction in the percentages of Treg is associated with a reduction in the density of these cells as well as most immune cells in the tumor (Figure 4C), suggesting that tumor ICOSLG induce a global activation of T-cells with a predominance of Treg, leading to inflammation and the recruitment of myeloid cells. Of note, we observed that around 50% of tumor cells expressed HLA-DR (Figure S3); supporting the idea of direct interaction between tumor and CD4<sup>+</sup> T-cells with TCR and costimulation through ICOS, similarly to what was observe in melanoma patients<sup>12</sup>. Interestingly, the level of expression of CD163, a marker of M2-like macrophages, is also decreased in ICOSLG-KO tumor (Figure 4D), suggesting that, with ICOSLG-expressing tumor, the activation of Treg through ICOS may lead to the polarization of macrophages into M2, favoring a global immunosuppression in the tumor microenvironment.

## **Conclusion**

We showed that the deletion of ICOSLG in tumor cells is associated with a reduction of tumor growth in humanized mice; behaving as an immune checkpoint. Rather than inhibiting the effectors, like PD-L1/PD-1, the mode of action of ICOS/ICOSLG may relate on promoting immunosuppressive cells in the tumor, with a subsequent decrease in effector T-cells activation. Thus, targeting ICOSLG may represent a novel therapeutic strategy for TN breast cancer.

## **Material & Methods**

### *Cell lines*

Parental MDA-MB-231 (human triple negative breast cancer) were purchased from ATCC. All cell lines were cultured in high-glucose DMEM complemented with FCS10%, glutamine and antibiotics (penicillin/streptomycin), Non Essential Amino Acids, Hepes and Sodium Pyruvate (All from ThermoFisher, Les Ulis, France).

To generate ICOSLG knock-out clone, 50000 MDA-MB-231 cells were seeded in a 24-well plate. Twenty-four hours later, cells were incubated with sgRNA complementary to exon 4 of ICOSLG (CGUGUACUGGAUCAUAAGA + scaffold, ACACCGUCUUCUUGAACAUG + scaffold, CAGCAGCCAAUGUUCACAUG + scaffold, TrueGuide synthetic guide RNAs, Invitrogen™, ThermoFisher), Cas9 nuclease (TrueCut™ Cas9 Protein v.2, Invitrogen™, ThermoFisher), and

Lipofectamine (Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Cas9 Transfection Reagent, Invitrogen™, ThermoFisher) according to the manufacturer instructions (TrueCut Cas9 Protein v.2 (27/09/2017)). After three days, the cells were cloned by limiting dilution in 96-well plates. Clones were screened for ICOSLG expression by flow cytometry using an anti-ICOSLG-PE (clone 2D3, Biolegend, Amsterdam, The Netherlands). For all low-expressing clone, presence of deletion at DNA level on all allele was confirmed by PCR using the following primers: CCGTG TACCCTCTGTTTCTTG and CTCCTTCCAACCACCTTTC. Clones that satisfied to the previous tests were sequenced by Eurofins Genomics using TCTACAATCTGTTTCCCTCC primer (Les Ulis, France).

Finally, the confirmed KO clone 3 was transduced using lentivirus vector containing ICOSLG (ratio 10:1) or a control one (ratio 1:1) (Origene, Rockville, MD, USA). After 3 days, transfected bulks were sorted on GFP-reporter using Aria II cell sorted (BD, Le Pont de Claix, France).

All cells were confirmed to be free of mycoplasmas using the MycoAlert detection kit (Lonza, Basel, Switzerland).

### *Mice*

NSG mice (stock #005557) purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Mice were bred in our animal facility under specific pathogen-free conditions following current European legislation. 18 to 28 weeks-old females NSG mice were injected subcutaneously with 2 to 5.10<sup>6</sup> tumor cells.

Female NXG mice humanized with CD34<sup>+</sup> human HSC from 3 different donors were purchased from Janvier labs (Le Genest-Saint-Isle, France). 24-31-weeks-old mice were injected subcutaneously with 5.10<sup>6</sup> tumor cells. General health status and body weight were monitored once-a-week to evaluate occurrence of GvHD. Mice with overt signs of GVHD, such as weight loss greater than 20% of their initial weight, hunched back, ruffled fur, and reduced mobility, were immediately sacrificed.

Tumor growth was monitored twice-a-week using an electronic caliper, and volumes were determined using the following formula: [(length × width<sup>2</sup>)/2].

All protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation Charles Darwin (Ce5/2012/025).

### *Phenotypic Analysis by Flow Cytometry*

Tumors were digested using enzymes from Tumor Dissociation Kit, mouse (Miltenyi Biotec, Paris, France) at recommended concentration for 60 min at 37°C with an intermediate flushing of the tissue. Cells were passed through a 70 µm cell strainer and suspended in PBS containing 3% FCS. To eliminate dead cells and debris, we isolated tumor cell suspensions using a Histopaque®-1077 gradient (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Rings were collected and washed, and cell pellets were suspended in PBS 3% FCS before counting on the LUNA™ Automated Cell Counter (Logos Biosystems, Villeneuve d'Ascq, France). Subsequently, up to  $2 \times 10^6$  live cells were stained with a viability dye (Fixable Blue Dead Cell Stain Kit, ThermoFisher) for 30 min at 4 °C. Fc receptor binding was blocked with human FcR Blocking Reagent (120-000-442, Miltenyi Biotec, Paris, France), anti-CD16/32 (clone 2.4G2) and CellBlox reagent (ThermoFisher) for 10 min. Then, cells were incubated with surface antibodies (Table S1) for 25 min at 4°C. For intracellular staining, Foxp3/transcription factor staining (eBioscience, ThermoFisher) was used during 1 hours before incubation with intracellular antibodies (Table S2) for 35 min à 4°C. Cells were washed with PBS 3%FCS before acquisition on Aurora cytometer (Cytek Biosciences, Fremont, CA, USA). Data were analyzed using SpectroFlow (Cytek), R software (v4.0.4) and FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR, USA).

#### *TCGA analysis*

The Cancer Genome Atlas (TCGA) database was analysed using the Xena browser provided by the University of California (Santa Cruz, CA, USA)<sup>30</sup> and tcgaViz R package<sup>20</sup>.

#### *Statistical Analysis*

All statistical tests were performed using Prism v.8 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA). The nature of the statistical test used to compare results is indicated in each figure legend. When necessary, the p-values of these tests are indicated in the figure panels. The statistical power of the analyses (alpha) was set arbitrarily at 0.05.

## References

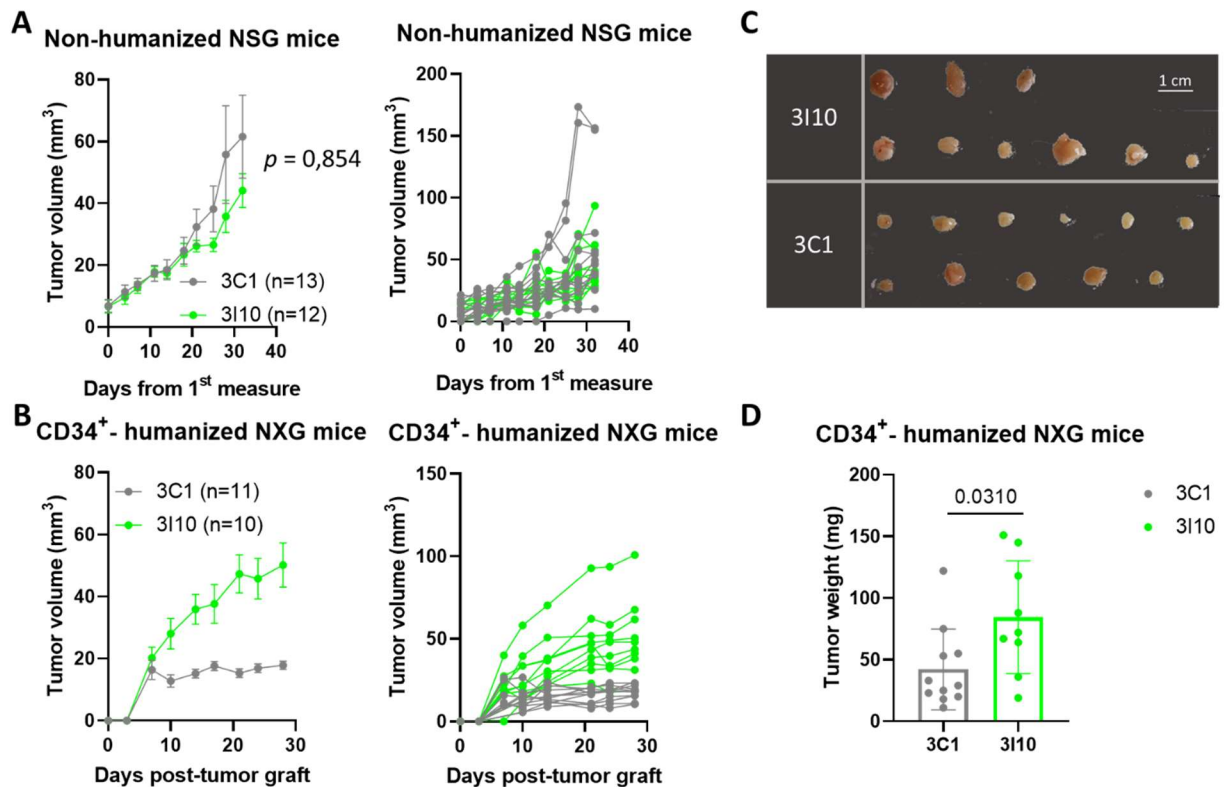
1. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **12**, 31–46 (2022).
2. Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin. Immunol.* **27**, 16–25 (2014).
3. Setlai, B. P. *et al.* Immunosuppressive Signaling Pathways as Targeted Cancer Therapies. *Biomedicines* **10**, 682 (2022).
4. Fridman, W. H., Zitvogel, L., Sautès-Fridman, C. & Kroemer, G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 717–734 (2017).
5. Liu, J. *et al.* Tumor-associated macrophages recruit CCR6+ regulatory T cells and promote the development of colorectal cancer via enhancing CCL20 production in mice. *PLoS One* **6**, e19495 (2011).
6. Silva, Z. E. V. da, Lehr, H.-A. & Velin, D. In vitro and in vivo Repair Activities of Undifferentiated and Classically and Alternatively Activated Macrophages. *Pathobiology* **81**, 86–93 (2014).
7. Sun, W. *et al.* A positive-feedback loop between tumour infiltrating activated Treg cells and type 2-skewed macrophages is essential for progression of laryngeal squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **117**, 1631–1643 (2017).
8. Burlion, A. *et al.* A novel combination of chemotherapy and immunotherapy controls tumor growth in mice with a human immune system. *Oncoimmunology* **8**, 1596005 (2019).
9. Ito, T. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J. Exp. Med.* **204**, 105–115 (2007).
10. Conrad, C. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells. *Cancer Res.* **72**, 5240–5249 (2012).
11. Faget, J. *et al.* ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4+ T cells. *Cancer Res.* **72**, 6130–6141 (2012).
12. Oliveira, G. *et al.* Landscape of helper and regulatory antitumour CD4+ T cells in melanoma. *Nature* **605**, 532–538 (2022).

13. Expression of ICOSLG in breast cancer - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000160223-ICOSLG/pathology/breast+cancer#>.
14. Pontén, F., Jirström, K. & Uhlen, M. The Human Protein Atlas—a tool for pathology. *J. Pathol.* **216**, 387–393 (2008).
15. Iwata, R. *et al.* ICOSLG-mediated regulatory T-cell expansion and IL-10 production promote progression of glioblastoma. *Neuro-Oncol.* **22**, 333–344 (2020).
16. Capasso, A. *et al.* Characterization of immune responses to anti-PD-1 mono and combination immunotherapy in hematopoietic humanized mice implanted with tumor xenografts. *J. Immunother. Cancer* **7**, 37 (2019).
17. Meraz, I. M. *et al.* An improved patient-derived xenograft humanized mouse model for evaluation of lung cancer immune responses. *Cancer Immunol. Res.* **7**, 1267–1279 (2019).
18. Li, T. *et al.* TIMER: A Web Server for Comprehensive Analysis of Tumor-Infiltrating Immune Cells. *Cancer Res.* **77**, e108–e110 (2017).
19. Sturm, G. *et al.* Comprehensive evaluation of transcriptome-based cell-type quantification methods for immuno-oncology. *Bioinformatics* **35**, i436–i445 (2019).
20. Camenen, E., Marodon, G. & Aubert, N. tcgaViz: Visualization Tool for the Cancer Genome Atlas Program (TCGA). (2022).
21. Newman, A. M. *et al.* Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry. *Nat. Biotechnol.* **37**, 773–782 (2019).
22. Zhang, Y. *et al.* The Clinical impact of ICOS signal in colorectal cancer patients. *Oncolimmunology* **5**, 00–00 (2016).
23. Martinez-Perez, A. G. *et al.* 4-1BBL as a Mediator of Cross-Talk between Innate, Adaptive, and Regulatory Immunity against Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 6210 (2021).
24. Roussel, L. *et al.* Loss of human ICOSL results in combined immunodeficiency. *J. Exp. Med.* **215**, jem.20180668 (2018).
25. Martin-Orozco, N. *et al.* Melanoma Cells Express ICOS Ligand to Promote the Activation and Expansion of T-Regulatory Cells. *Cancer Res.* **70**, 9581–9590 (2010).
26. Wang, B. *et al.* Expression of ICOSL is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *PeerJ* **7**, (2019).
27. Rodriguez, A. B. & Engelhard, V. H. Insights into Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures: Novel Targets for Antitumor Immunity and Cancer Immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.* **8**, 1338–1345 (2020).

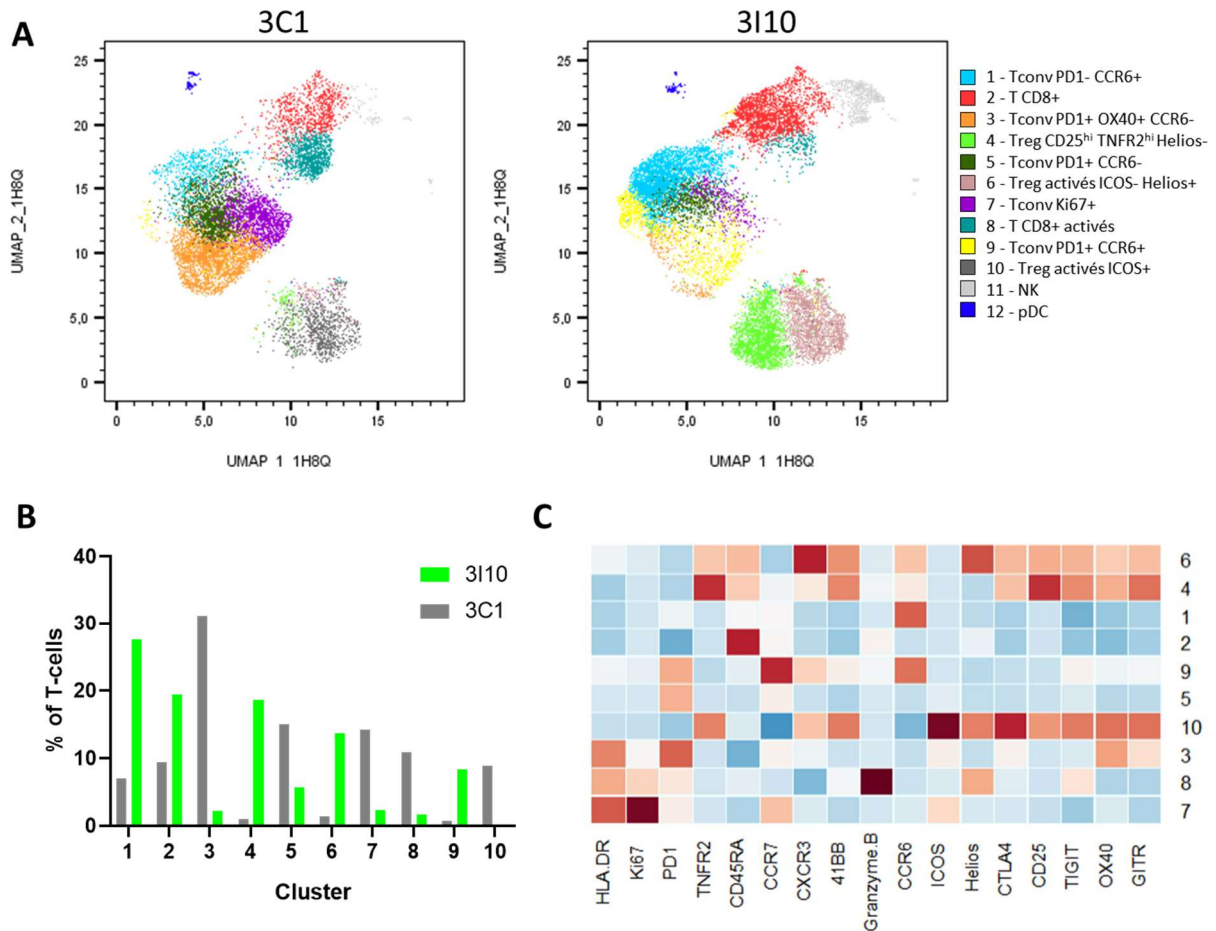
28. Chen, X. *et al.* Expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cells: applicability to tumor infiltrating T regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 6467–6471 (2008).
29. Nishikawa, H. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int. J. Cancer* **127**, 759–767 (2010).
30. Goldman, M. J. *et al.* Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat. Biotechnol.* **38**, 675–678 (2020).
31. Rujas, E., Cui, H., Sicard, T., Semesi, A. & Julien, J.-P. Structural characterization of the ICOS/ICOS-L immune complex reveals high molecular mimicry by therapeutic antibodies. *Nat. Commun.* **11**, 5066 (2020).



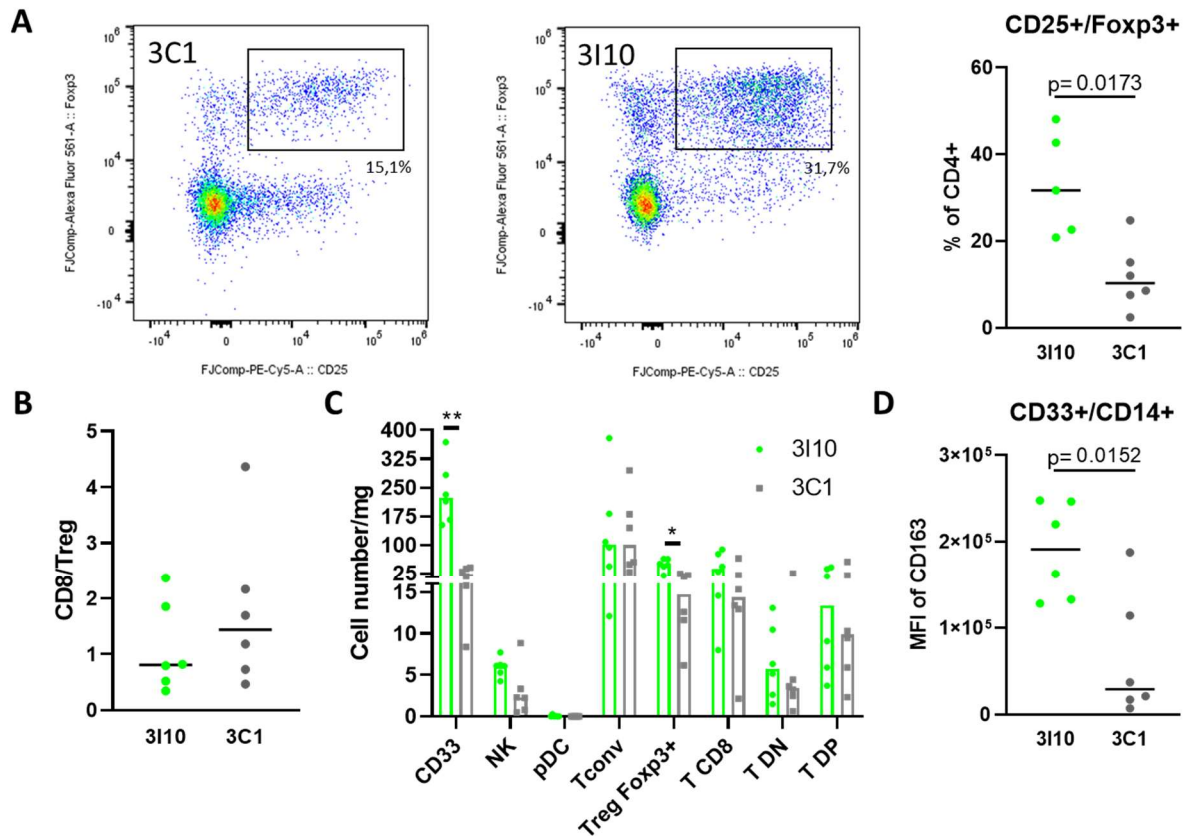




**Figure 2: Absence of ICOSLG is associated with a better control of tumor growth in humanized mice.** (A) Combined (top) or individual (bottom) growth curve of MDA-MB-231 ICOSLG-KO (grey) or control (green) in non-humanized NSG mice. The  $p$ -value on the graph tests the null hypothesis that one curve fits all the data with non-linear regression model (B) Combined (top) or individual (bottom) growth curve of MDA-MB-231 ICOSLG-KO (grey) or control (green) in humanized NXG mice with CD34<sup>+</sup> human hematopoietic stem cell. (C) Tumor extracted from humanized mice (D) Weight of tumors extracted from humanized mice. All data were generated in 2 independent experiments.  $P$ -value is calculated using Mann-Whitney  $t$ -test.



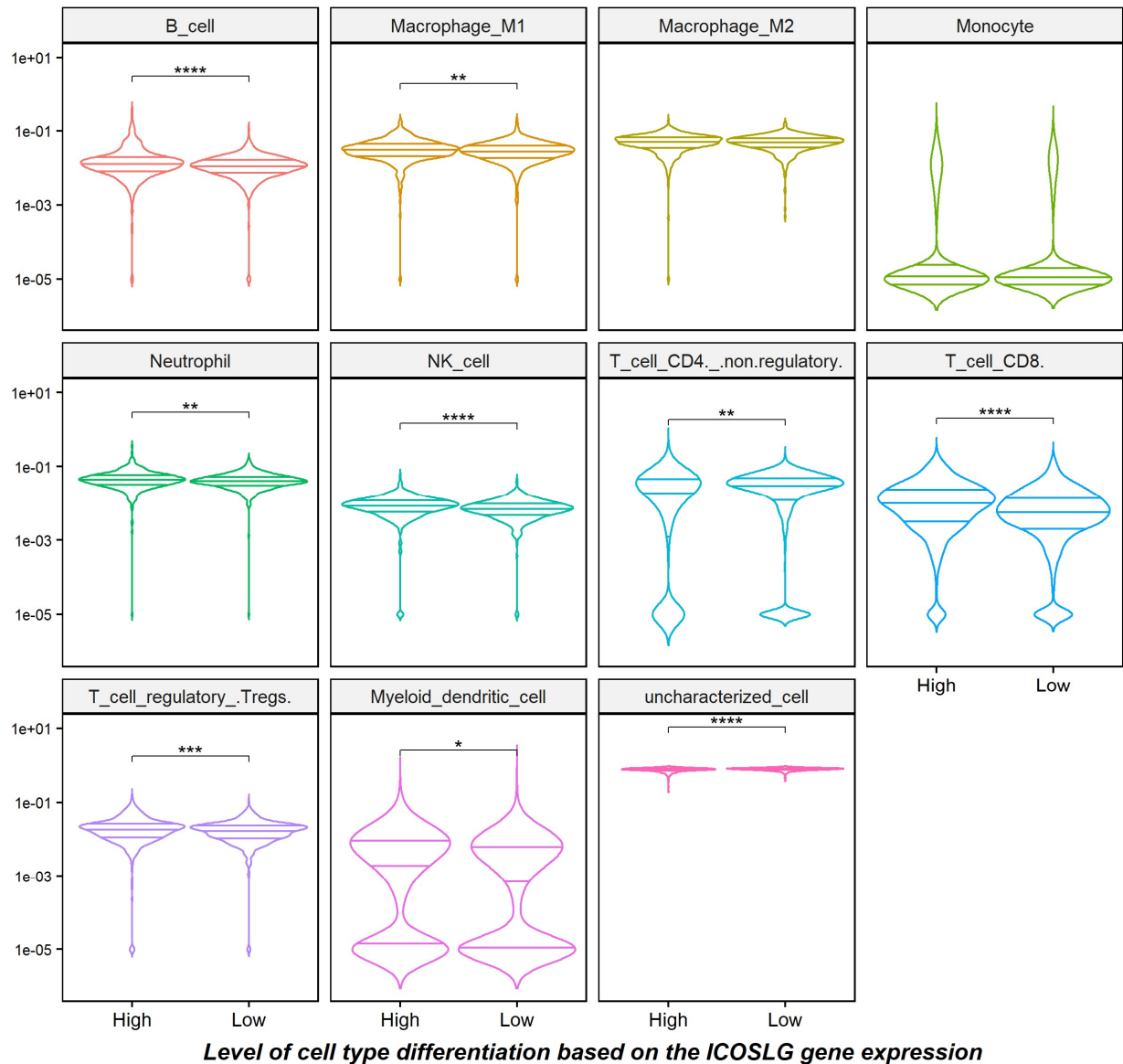
**Figure 3: Absence of ICOSLG increases activation of TIL.** (A) UMAP of TILs CD14<sup>-</sup> isolated from ICOSLG-KO and control tumor of humanized mice. Cells were analyzed by spectral flow cytometry and clustered with Phenograph algorithm. (B) Relative frequencies of cluster 1 to 10 among total T-cells in both groups. (C) Heatmap of MFI of several markers among cluster 1 to 10. MFI are normalized across each marker (red = high, blue = low). Heatmap was performed using ggplot R package.



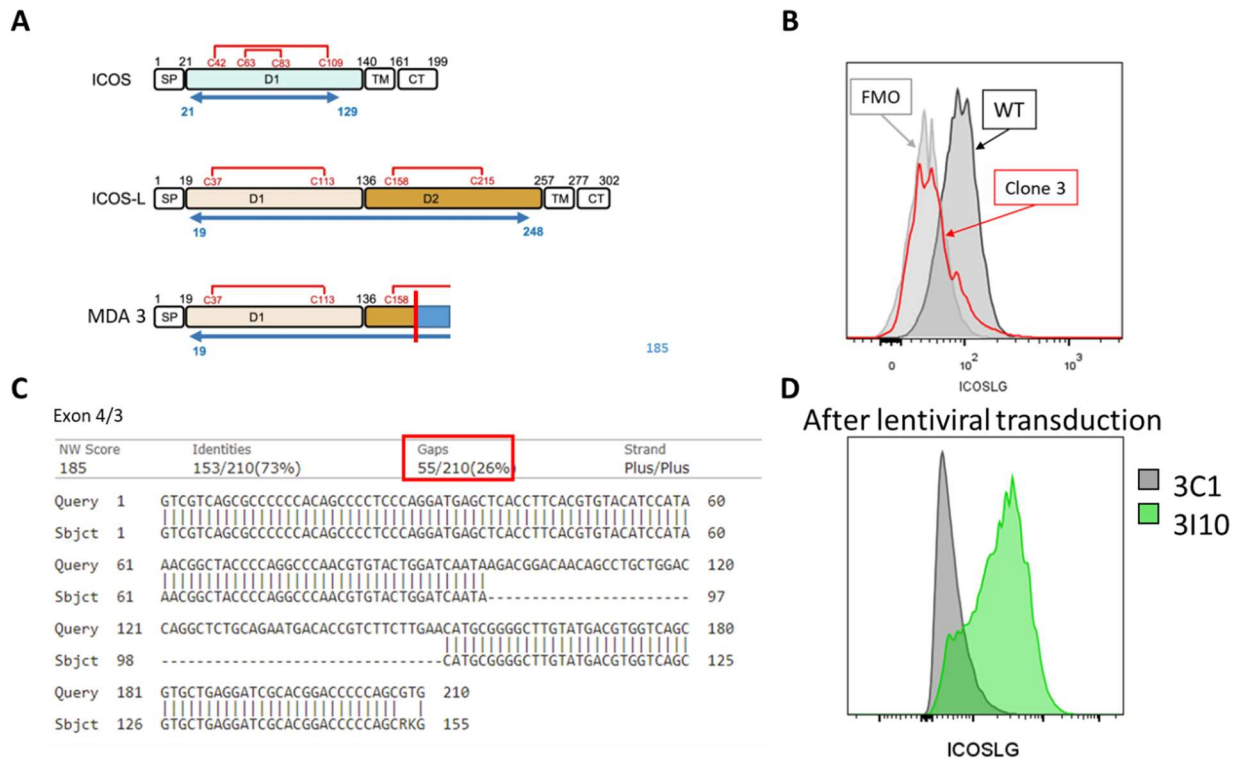
**Figure 4: Absence of ICOSLG by the tumor is associated with a decrease in cells with regulatory phenotype** (A) Representative flow cytometry profile of CD25 and Foxp3 expression in CD4<sup>+</sup> T cells. Frequencies of Treg CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> among CD4<sup>+</sup> T-cells. (B) Ratio of the frequencies of CD8 to Treg in the two conditions (C) Numbers of TILs normalized by tumor weight. *P*-value are calculated using 2-way ANOVA with Geisser-Greenhouse correction followed by multiple comparisons (\*\*=0.0093, \*=0.0244). (D) Median Fluorescence Intensity (MFI) of CD163 in CD33<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> macrophages. *P*-value are calculated using Mann-Whitney *t*-test.



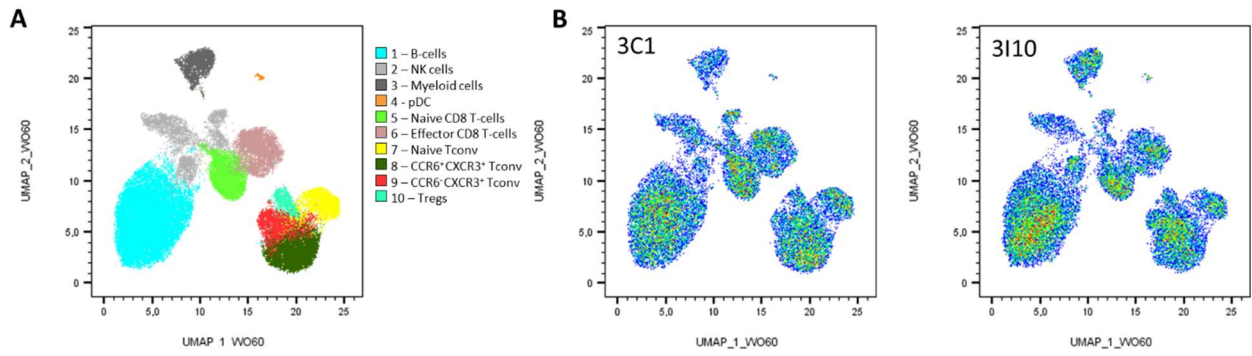
**Breast Invasive Carcinoma (BRCA; Primary Tumor)**  
**Student's t-test with Benjamini & Hochberg correction (n\_low = 553; n\_high = 553)**



**Figure S2: ICOSLG level is associated with enrichment in regulatory T-cells in breast cancer.** Relative frequencies of 10 immune subsets according to ICOSLG expression in Breast cancer patients. Frequencies of each subset were calculated using the deconvolution algorithm Quantiseq on primary tumor samples from the TCGA BRCA database. Patients are stratified according to the median of ICOSLG expression in all patients. *p*-values are calculated using Student *t*-test and corrected for multiple comparison. Indicated are the statistical test used and the number of patients in ICOSLG lo or high groups.

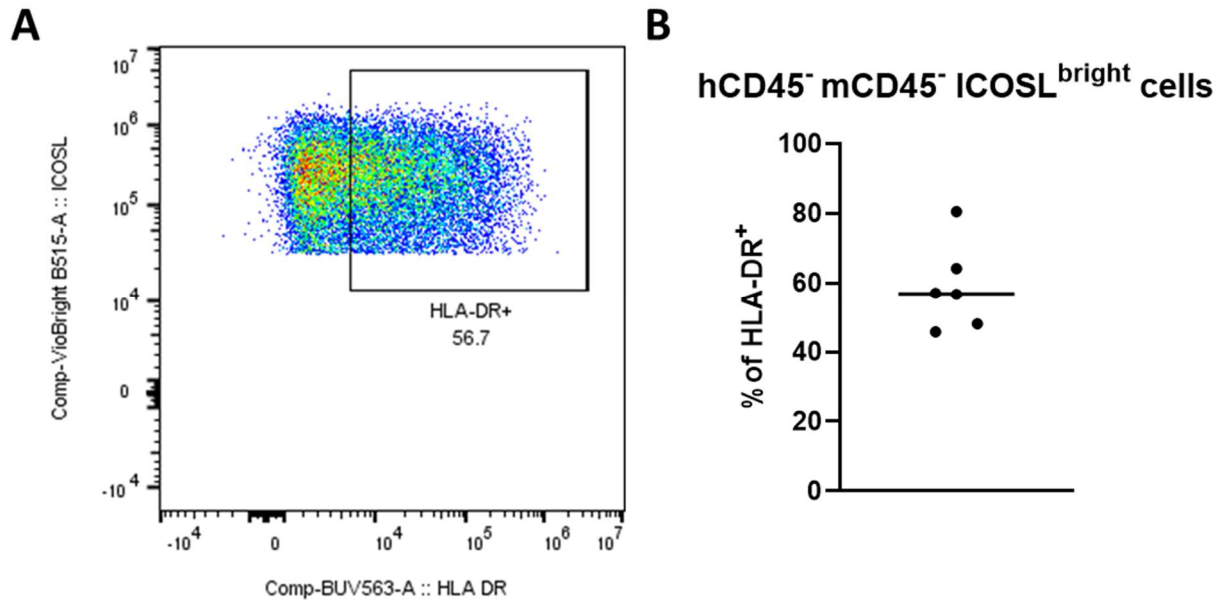


**Figure S3: Generation of ICOSLG KO and control MDA-MB-231 cell line.** (A) Theoretical structure of ICOSLG in the CRISPR-Cas9-generated clone 3 compared to WT MDA-MB-231 (Adapted from Rujas *et al.*<sup>429</sup>). (B) Expression of ICOSLG on clone 3 analyzed by flow cytometry. (C) Sequence alignment of clone 3 (Sbjct) versus ICOSLG reference gene (Query). (D) Expression of ICOSLG in ICOSLG-transduced clone 3 versus non-transduced.



**Figure S4: Absence of ICOSLG in tumor cells does not alter cell phenotypes in the spleens of the mice.** (A) UMAP of human cells isolated from spleens of humanized mice grafted with ICOSLG-KO and control tumor. Cells were analyzed by spectral flow cytometry and clustered with Phenograph algorithm (left). (B) Dot plots of pooled spleen from mice grafted with ICOSLG-KO and control tumor.





**Figure S5: HLA-DR expression by tumor cells.** (A) Representative dot plot of HLA-DR in hCD45<sup>-</sup>mCD45<sup>-</sup>ICOSL<sup>bright</sup> 3I10 tumor cells. (B) Frequencies of HLA-DR<sup>+</sup> tumor cells from mice grafted with control cell line.



	Fluorochrome	Clone	Provider
Viability dye	Live Dead Blue		Thermo
41BB	BUV661	4B4-1	BD
CCR6	BV480	11A9	BD
CCR7	APC-Fire 810	G043H7	Biolegend
CD123	BUV615	6H6	BD
CD14	NovaFluor Yellow 730	MEM-15	Thermo
CD163	APC Vio770	REA812	Miltenyi
CD20	BUV805	2H7	BD
CD25	PE-Cy5	BC96	Biolegend
CD3	Spark NIR685	SK7	Biolegend
CD33	R718	WM53	BD
CD4	BUV496	SK3	BD
CD40	BV650	5C3	Biolegend
CD45h	NovaFluor Blue 585	2D1	Thermo
CD45m	NovaFluor Blue 660-120S	30-F11	Thermo
CD45RA	BUV395	HI100	BD
CD8	NovaFluor Yellow 690	OKT8	Thermo
CXCR3	PerCP	G025H7	Biolegend
GITR	BV711	108-17	Biolegend
HLA DR	BUV563	L203	BD
ICOS	SB780	ISA-3	Thermo
ICOSL	Vio Bright B515	REA991	Miltenyi
NKp46	BV510	9E2	Biolegend
OX40	PE-CF594	ACT35	BD
PD1	BUV737	EH12.1	BD
TIGIT	BB700	741182	BD
TNFR2	BV421	hTNFR-M1	BD

**Table S1: Antibodies used for surface staining**

	Fluorochrome	Clone	Provider
Ki67	AF532	SolA15	Thermo

Foxp3	AF561	PCH101	Thermo
CTLA4	BV605	BNI3	Biolegend
Granzyme B	APC	GB11	Thermo
Helios	PE-Cy7	22F6	Biolegend

**Table S2: Antibodies used for intracellular staining**

## b) Rôle de 4-1BB-L exprimé par la tumeur dans un modèle murin

### *Contexte*

De nombreuses publications citent 4-1BB pour ces propriétés co-stimulatrices des lymphocytes T effecteurs, en particulier CD8<sup>+</sup>. Concernant les Tregs, les données de la littérature suggèrent plutôt un effet délétère<sup>430</sup>. Ces données sont appuyées par le fait que l'utilisation d'anticorps agoniste de 4-1BB est associé à un meilleur contrôle tumoral<sup>343,345</sup>. Dans le même temps, 4-1BB a récemment été proposé en tant que marqueur pan-Treg dans le cancer<sup>331</sup>, les agonistes de 4-1BB sont aussi bénéfiques dans un contexte d'autoimmunité<sup>431,432</sup> et des données de l'équipe montrent que la stimulation *in vitro* de Treg avec un anticorps agoniste est associé à une augmentation de la prolifération et de la survie des Treg via NFκB<sup>433</sup>. Par ailleurs, l'expression de 4-1BB-L a été rapporté à la surface de nombreuses tumeurs<sup>434</sup>.

### *Objectif*

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'impact de l'expression de 4-1BB-L par la tumeur sur la réponse immunitaire antitumorale.

### *Méthode*

Pour cela, nous avons généré des clones de la lignée MC38 (carcinome du colon murin) déficients pour 4-1BB-L ou contrôle par CRISPR-Cas9. Ces clones ont ensuite été implantés en souris immunodéficientes Rag<sup>-/-</sup> et immunocompétentes C57BL/6J.

### *Résultats*

Les clones déficients pour 4-1BB-L et contrôle ont une croissance similaire en souris immunodéficientes indiquant l'absence de différences intrinsèques. En souris immunocompétentes, la délétion de 4-1BB-L est associée à un meilleur contrôle de la croissance tumorale allant jusqu'au rejet total des tumeurs dans plus de la moitié des souris.

### *Conclusion*

4-1BB-L semble jouer un rôle majeur dans la réponse immunitaire antitumorale dans un hôte immunocompétent.

Dans un premier temps, nous avons comparé l'expression des gènes entre Tconv et Treg à partir des 11 jeux de données publiés (GSE7460, GSE15907, GSE17580, GSE24210, GSE37532, GSE40685, GSE42021, GSE50096, GSE10321, GSE13658 et GSE14308). L'ensemble de ces données ont été obtenues par microarray à partir de Tconv et de Treg purifiés d'organes lymphoïdes (rate ou ganglions) de souris WT. Nous avons sélectionné les gènes différentiellement exprimés ( $p=0,05$  ;  $\log_2FC > 1$ ) entre Tconv et Treg dans au moins 10 des 11 jeux de données. Les 25 gènes les plus différentiellement exprimés de notre analyse sont présentés dans la figure 13A.

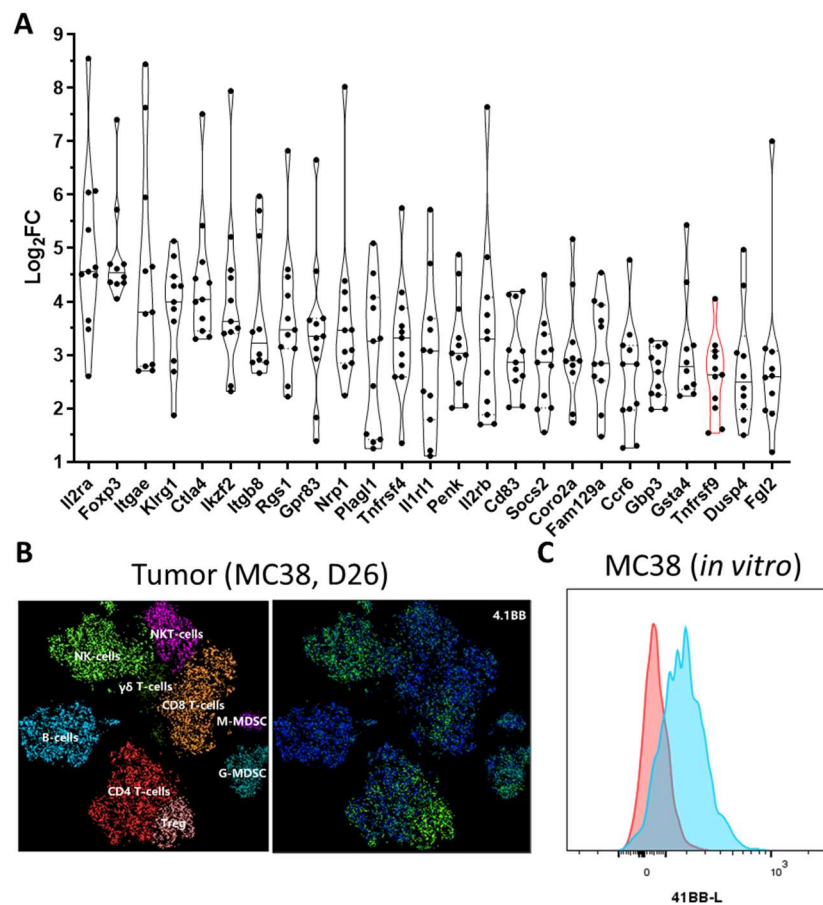


Figure 13 : Les lymphocytes T régulateurs murins expriment fortement 4-1BB. (A) Gènes les plus différentiellement exprimés entre Tconv et Treg murins isolés de la rate ou des ganglions de souris WT dans au moins 10 des 11 études analysées. (B) tSNE réalisé sur les cellules  $CD45^+$  isolés des tumeurs MC38 implantées en souris C57BL/6J. Identification des sous-populations (gauche) et expression de 4-1BB (droite, vert=forte expression). (C) Expression de 4-1BB-L par les cellules MC38 en culture (rouge = cellules non marquées, bleu = MC38 marquées)

Parmi ces gènes, on retrouve ceux de molécules connues pour être fortement exprimées par les Treg, dont *Foxp3*, *Ctla4*, *Il2ra* (CD25), *Ikzf2* (Helios) ou *Tnfrsf9* (4-1BB), mais aussi certains plus surprenant comme *Penk*, le gène de la proenképhaline. L'expression de 4-1BB ayant aussi été décrite sur les lymphocytes T effecteurs et les cellules NK, nous avons analysé

l'expression de 4-1BB au niveau protéique par les TIL isolés de souris implantées avec la lignée tumorale MC38 par cytométrie de masse (Figure 13B). Dans ces tumeurs, 4-1BB était plus fortement exprimée au sein des Treg comparés au Tconv, mais aussi aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et NK. Par ailleurs, nous avons aussi mis en évidence l'expression de 4-1BB-L par les cellules de la lignée MC38 (Figure 13C).

Sur la base de ces résultats, nous nous sommes demandés si l'expression de 4-1BB-L par la tumeur pouvait moduler la réponse immunitaire antitumorale et plus particulièrement les Tregs. Pour répondre à cette question, nous avons éliminé le gène de 4-1BB-L (*Tnfsf9*) au sein de la lignée MC38 en utilisant la technologie CRISPR-Cas9. L'absence d'expression de la protéine 4-1BB-L a été vérifiée par cytométrie en flux (Figure 14A) et la délétion complète du gène a été confirmée par PCR (Figure 14B).

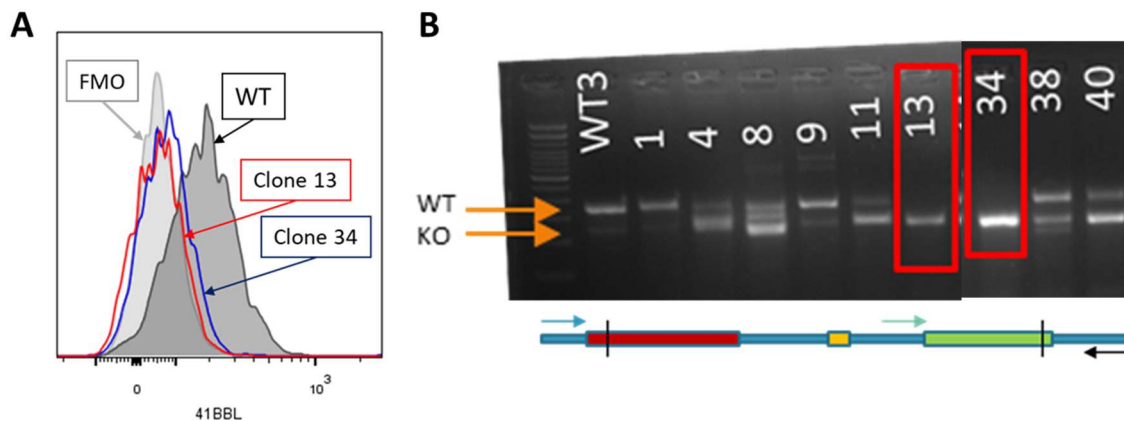


Figure 14 : Génération des clones de MC38 déficient pour 4-1BB-L et contrôle. (A) Expression de 4-1BB-L sur la lignée MC38 WT et les clones 4-1BB-L KO. (B) Validation par PCR du KO homozygote après migration par électrophorèse sur gel d'agarose. La bande supérieure correspond au gène complet (amorce verte sur l'exon 3 de la représentation schématique du gène *Tnfsf9*) et la bande inférieure est associée à une délétion complète du gène *Tnfsf9* (amorce bleue en amont de l'exon 1). Les barres verticales indiquent l'emplacement des sites de clivage de la Cas9.

Les clones ainsi générés ont ensuite été implantés dans des souris immunodéficientes Rag<sup>-/-</sup>, qui ne disposent pas de système immunitaire adaptatif, afin de déterminer si 4-1BB-L affecte intrinsèquement la croissance tumorale. Dans ces souris, les 2 clones KO avaient une croissance similaire au clone sauvage (Figure 15A). Pour la suite des expériences, nous avons décidé d'utiliser le clone 13, déficient pour 4-1BB-L. En souris immunocompétentes C57BL/6J, nous avons observé une réduction majeure de la croissance du clone 13 comparé au clone WT, allant jusqu'à un rejet total de la tumeur dans plus de la moitié des souris (Figure 15B-D). Enfin, nous avons voulu vérifier si ce rejet était associé à la mise en place d'une mémoire immunitaire. Après 2 mois, le clone sauvage a été réimplanté dans les animaux qui

avaient initialement rejeté la tumeur KO. 3 souris sur 4 n'ont pas développé de tumeur 3 semaines après l'implantation contre 0 sur 3 dans des souris contrôle (Figure 15E).

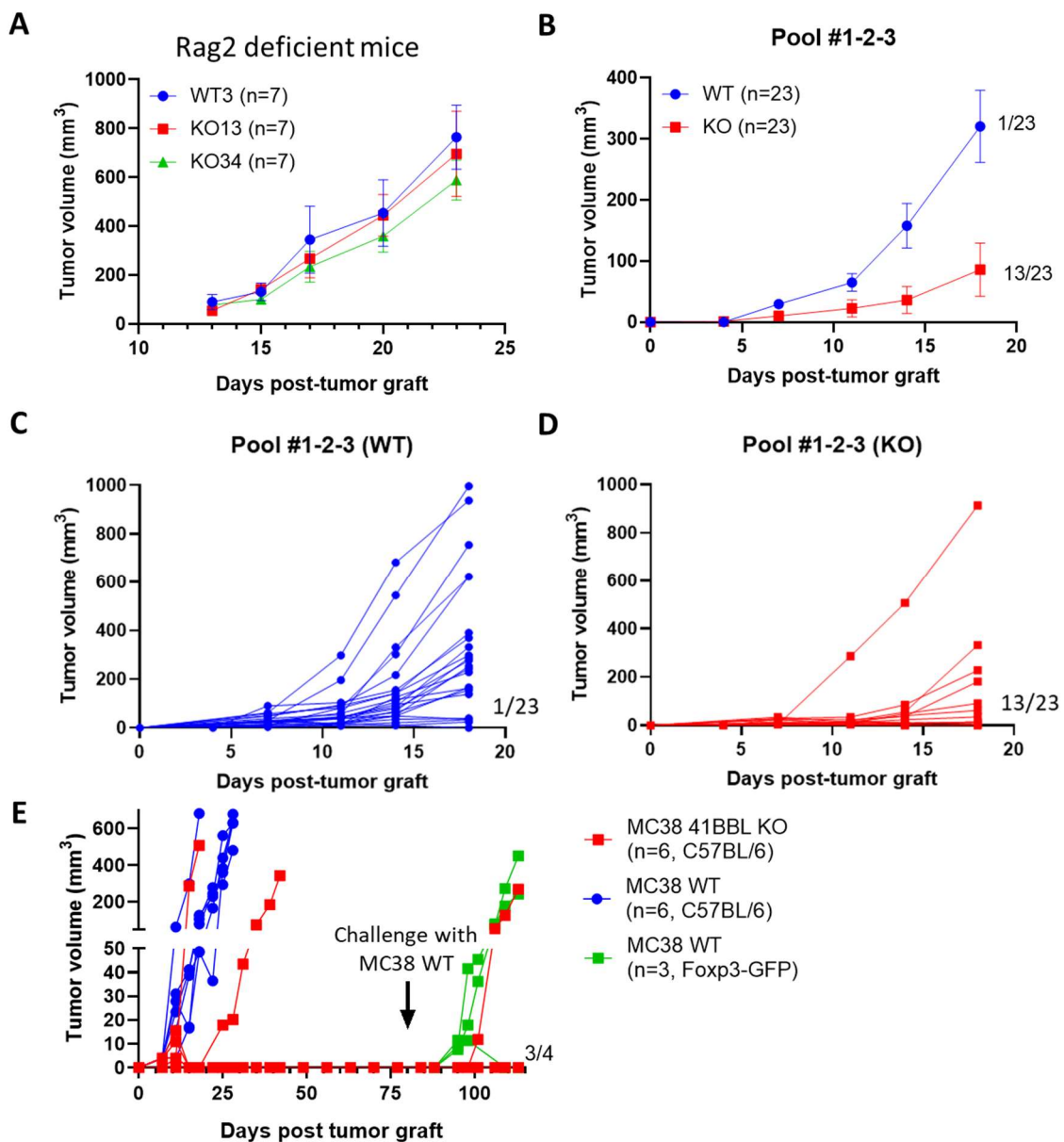


Figure 15 : La délétion de 4-1BB-L dans la tumeur améliore le contrôle de la croissance tumorale en souris immunocompétente. (A) Courbes de croissance tumorale des clones WT (bleu) et 4-1BB-L (vert et rouge) en souris immunodéficiente *Rag2*<sup>-/-</sup>. (B) Courbes de croissance du clone WT3 (bleu) et du clone 13, déficient pour *Tnfsf9* (rouge) en souris immunocompétentes C57BL/6J. Ces données ont été générées dans 3 expériences indépendantes. Le nombre de souris ayant totalement rejeté leur tumeur est indiqué à droite des courbes. (C-D) Courbes de croissance tumorale des souris individuelles de (B). (E) Courbes de croissance à long terme des souris ayant rejeté la tumeur déficiente pour 4-1BB-L et réimplanté avec le clone sauvage.

---

## **Discussion & Perspectives**

---

L'ensemble des données recueillies au cours de ma thèse appuie le rôle des ligands tumoraux dans la modulation de la réponse immunitaire antitumorale, non seulement via l'inhibition des cellules effectrices, mais aussi, en stimulant les cellules régulatrices, en particulier les Treg, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles options thérapeutiques potentielles.

- **HVEM**

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence le rôle d'HVEM tumoral en tant que point de contrôle de l'immunité via son interaction avec le ligand inhibiteur BTLA. Nous avons aussi validé avec succès une stratégie thérapeutique visant à bloquer cette interaction avec un anticorps monoclonal en souris humanisée avec des PBMC.

Une des limites de ce travail repose sur le fait que ce modèle est composé majoritairement de lymphocytes T, qui plus est, fortement activés<sup>435</sup>. Cette forte activation peut aussi expliquer pourquoi nous n'avons pas retrouvé les propriétés agonistes de l'anticorps observées *in vitro* et suggérées par des données de la littérature. En effet, Park *et al.* ont montré qu'en faisant exprimer un scFv agoniste d'HVEM à la surface des cellules tumorales, le contrôle tumoral était amélioré et que cela s'associait à la prolifération des lymphocytes T et à une production augmentée d'IL-2 et d'IFN $\gamma$  par ces cellules<sup>436</sup>. De plus, les expressions d'HVEM et BTLA sur les lymphocytes T sont modulées au cours de l'activation avec une tendance à la diminution du récepteur activateur HVEM et une augmentation du ligand inhibiteur BTLA, augmentant ainsi leur susceptibilité à l'inhibition exercée via HVEM tumoral<sup>437,438</sup>. Ainsi, les effets observés dans notre modèle sont susceptibles d'être différents chez l'Homme, notamment selon le sous-type cellulaire touché. En effet, HVEM a été décrit comme étant exprimé sur les lymphocytes T et B, les NK et les cellules myéloïdes.

Néanmoins, nos résultats restent cohérents avec les travaux de la littérature visant à inhiber l'expression d'HVEM par la tumeur ou à bloquer les interactions avec ces ligands dans des modèles murins. En effet, l'injection d'un plasmide codant pour la forme soluble de BTLA (pour entrer en compétition avec BTLA membranaire) a été associée à l'augmentation de la sécrétion de cytokines inflammatoires par les TIL<sup>328</sup>. De la même manière, un protocole de vaccination avec des antigènes tumoraux s'est montré plus efficace s'il était associé au blocage d'HVEM par la protéine gD d'HSV1<sup>439</sup>. Enfin, l'utilisation de siRNA pour inhiber l'expression d'HVEM dans des modèles de carcinome colique chez la souris et de cancer de l'ovaire humain *in vitro* ont été associés à la prolifération des lymphocytes T et à la production de cytokines inflammatoires<sup>313,440</sup>.



De manière intéressante, nous avons observé que, dans notre modèle, l'absence d'expression par la tumeur d'HVEM reproduisait les résultats obtenus avec l'anticorps en souris humanisées, et ce, malgré des croissances tumorales similaires en souris non humanisées. Ces résultats mettent en évidence le rôle d'HVEM tumoral en tant que point de contrôle de l'immunité antitumorale T et la pertinence du modèle pour valider de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques pour l'immunothérapie du cancer. Néanmoins, les cellules effectrices ne sont pas les seules à pouvoir être modulées par la tumeur pour inhiber la réponse immunitaire antitumorale. Ainsi, dans la seconde partie de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence que l'expression, par la tumeur, de ligands de molécules exprimées majoritairement par les Treg pouvait, elle aussi, favoriser le développement tumoral.

- **ICOS-L**

Nous avons montré que l'expression d'ICOS-L par la tumeur jouait un rôle important dans la réponse immunitaire antitumorale chez la souris humanisée. En effet, la croissance d'une lignée ICOS-L KO, implantée en souris humanisée avec des CSH humaines, était ralentie comparée à celle d'une lignée contrôle. Ce résultat, associé à l'absence de différence de croissance en souris immunodéficiente non humanisée, démontre que le système immunitaire est un acteur primordial de l'échappement tumoral via ICOS-L. Ainsi, le rôle d'ICOS-L peut dépendre de la stimulation directe des cellules immunitaires, en particulier régulatrices ou être indirect via un rétro-signal sur les cellules tumorales, qui va induire l'expression de molécules qui pourront favoriser la migration, la fonction ou le maintien des cellules régulatrices *in situ*.

Nos premières données obtenues par cytométrie spectrale montrent que la perte d'ICOS-L tumoral est associée à une forte activation des cellules immunitaires effectrices. Ce résultat suggère qu'ICOS-L stimule préférentiellement les cellules régulatrices, dont les Treg qui sont la principale population immunitaire exprimant ICOS au sein des tumeurs mammaires<sup>107,410</sup>. Au cours des dernières années, le rôle des pDC a régulièrement été mis en avant dans plusieurs cancers dont le cancer du sein avec des données montrant que ces cellules promouvaient les Treg dans la tumeur via ICOS/ICOS-L<sup>107,441,442</sup>. Dans nos tumeurs, nous avons observé un nombre extrêmement réduit de pDC suggérant un rôle limité de ces cellules dans notre modèle. Néanmoins, la possibilité de reconnaissance de la tumeur par des clones de Treg a récemment été décrite dans le mélanome par Oliveira *et al.*<sup>359</sup>. Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence, dans des tumeurs exprimant le CMH de classe II (comme celles dérivées de nos lignées de MDA-MB-231), la présence de clones de Treg spécifiques des antigènes tumoraux

présentés directement par la tumeur. Par opposition, dans les tumeurs n'exprimant pas le CMH de classe II, la présentation des antigènes tumoraux se ferait de manière indirecte, donc potentiellement par les pDC.

Une autre étude, publiée en 2020 dans le glioblastome, a mis en évidence que l'inhibition de l'expression d'ICOSLG par la tumeur au moyen d'un shRNA s'associait à une augmentation de la survie des souris dans un modèle murin immunocompétent, et ce, sans différence significative en absence de lymphocytes T<sup>360</sup>. Dans cette étude, les auteurs ont pu observer une diminution significative de la fréquence des Treg au sein de coupes tumorales, cette diminution s'accompagnant d'une réduction de l'expression de l'ARN de l'IL-10 d'un facteur 5 par rapport au contrôle. Néanmoins, dans ce modèle, les auteurs observent aussi une augmentation des nombres de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en l'absence d'ICOS-L contrairement à nos données, qui suggèrent des nombres stables pour les cellules lymphoïdes non Treg. Dans cette étude, les cellules myéloïdes n'ont pas été étudiées. L'augmentation du nombre de cellules lymphoïdes a aussi été observée suite à l'injection d'un virus de la maladie Newcastle, modifié pour forcer l'expression tumorale d'ICOS-L dans des modèles murins<sup>361</sup>. Dans cette étude, contrairement à ce que nous avons observé, cette augmentation affectait préférentiellement les cellules effectrices. Cette différence pourrait s'expliquer par l'insertion tardive du vecteur (J10) permettant la mise en place de la réponse initiale en absence d'ICOS-L tumoral, l'immunogénicité intrinsèque du virus couplé au signal de co-stimulation apporté par ICOS-L et l'action cytolytique de celui-ci.

Au-delà de l'effet sur les Treg, nous avons aussi observé une accumulation importante de macrophages M2-like exprimant le marqueur CD163. Ces cellules n'exprimant pas le récepteur ICOS, cela suggère que leur recrutement accru est une conséquence de phénomènes consécutifs aux interactions entre des cellules exprimant ICOS (ou une autre molécule) et ICOS-L exprimé par la tumeur, possiblement via un rétrocontrôle sur la tumeur qui va alors pouvoir sécréter diverses cytokines et chimiokines. Ces macrophages néo-recrutés pourront alors être polarisés en M2 sous l'action de cytokines sécrétées par les Treg, comme cela a pu être décrit *in vitro*<sup>443</sup>.

Globalement, nos résultats suggèrent que l'expression d'ICOS-L permet l'activation préférentielle des Treg au sein de la tumeur aboutissant à la polarisation *in situ* des macrophages et à la suppression de l'activation des cellules effectrices. Néanmoins, le mécanisme associé à l'accumulation des macrophages au sein de la tumeur reste indéterminé. L'analyse par

séquençage ARN sur cellules unique, en cours, sur le second lot d'animaux devraient permettre d'apporter certains éléments de réponses quant aux mécanismes suppresseurs et cytotoxiques impliqués, et possiblement, de fournir des hypothèses pour expliquer l'afflux de macrophages au sein de la tumeur exprimant ICOS-L.

Par ailleurs, notre modèle, impliquant l'utilisation d'un clone KO dans lequel est réintroduit le gène d'intérêt, présente des avantages, mais n'est pas exempt de limites. Parmi les avantages, on peut citer l'expression continue et relativement forte du gène sous la dépendance du promoteur CMV qui peut permettre d'exacerber un phénomène biologique, ou la limitation des différences entre les lignées sauvage et KO du fait de l'absence d'une étape de sous-clonage<sup>444</sup>. Cependant, ce processus génère de potentiels biais en raison de cette expression continue et potentiellement, à des niveaux supraphysiologiques qui pourraient, au contraire, faire apparaître un phénotype qui n'existerait avec une expression « physiologique ». Enfin, l'insertion aléatoire du vecteur lentiviral peut aboutir à la dérégulation d'autres gènes, responsables du phénotype observé. Néanmoins, ce phénomène est en partie contrôlé par l'utilisation d'une lignée transduite avec un lentivirus contrôlé.

- **4-1BB-L**

La plupart des études suggèrent que l'utilisation d'un anticorps agoniste pour 4-1BB est suffisant pour améliorer le contrôle de la croissance tumorale, notamment, de par la stimulation des lymphocytes T effecteurs<sup>343,345</sup>. De plus, 4-1BB exprimé par les Tregs a été décrit comme délétère pour ces cellules<sup>430,445,446</sup>. Néanmoins, dans une étude menée dans un modèle murin de myélome multiple, les auteurs montrent que les anticorps ciblant 4-1BB activent aussi les Tregs et que la déplétion de ces cellules permet d'améliorer la réponse au traitement<sup>447</sup>. Ces résultats sont appuyés par des données obtenues dans une autre étude démontrant que la déplétion des Treg en utilisant des anticorps ciblant 4-1BB et pourvu de fonctions effectrices dépendant du Fc (IgG2a) est plus efficace que l'utilisation d'un agoniste dépourvu de ces fonctions (IgG1) pour améliorer le contrôle de la croissance tumorale<sup>375</sup>.

A ce jour, peu d'études se sont intéressées à la relation entre le ligand de 4-1BB exprimé par la tumeur et les cellules de la réponse immunitaire antitumorale exprimant 4-1BB. Une étude menée dans le cancer du poumon a montré que l'expression de 4-1BB-L par des lignées tumorales pouvait promouvoir la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Cette expression d'IFN s'associait à une expression de PD-L1 par la tumeur<sup>448</sup>. Une autre étude réalisée à partir de la lignée de carcinome hépatocellulaire HepG2.2.15 a mis en évidence que

la stimulation de 4-1BB-L par 4-1BB induisait la production d'IL-8 par ces cellules<sup>449</sup>. Enfin, en co-cultivant des cellules tumorales de pancréas et des macrophages dérivés de la lignée U937, Wu *et al.* ont suggéré que l'expression de 4-1BB-L par la tumeur était associée à la polarisation des macrophages vers un profil M2<sup>450</sup>.

Nos résultats suggèrent l'existence d'interactions directes entre la tumeur et les cellules de l'immunité antitumorale via 4-1BB/4-1BB-L et que celles-ci se feraient plutôt sur les cellules régulatrices exprimant 4-1BB, donc vraisemblablement les Treg.

En 2017, les travaux de Kang *et al.* ont montré une forte inhibition de la croissance tumorale dans des souris 4-1BB KO greffées avec la lignée CT26 comparée à des souris sauvages. Cet effet était associé à une augmentation de la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Dans cette même étude, les auteurs ont mis en évidence dans un modèle de transfert adoptif de Treg sauvages dans une souris 4-1BB KO, que les Treg sont associés à l'accumulation intratumorale de macrophages avec un phénotype M2<sup>451</sup>. Récemment, Swatler *et al.* ont mis en évidence dans un modèle de leucémie, que la présence de vésicules extracellulaires, sécrétées par les cellules tumorales et contenant 4-1BB-L, favorisait la prise de greffe et promouvaient les Treg effecteurs<sup>452</sup>. L'ensemble de ces données suggèrent que la voie 4-1BB/4-1BB-L est importante pour la mise en place précoce d'un environnement suppresseur permettant la croissance tumorale.

Néanmoins, faute d'avoir pu réaliser d'étude phénotypique sur les TIL en raison de problèmes techniques, nous ne disposons pas de données pouvant appuyer ou réfuter ces hypothèses. De plus, malgré l'équivalence de croissance *in vitro* et *in vivo* en souris immunodéficientes, l'existence d'un rétro-signal exercé par 4-1BB-L sur les cellules tumorales reste possible comme décrit dans plusieurs études<sup>453</sup>. Néanmoins, celui-ci reste peu probable, les cellules myéloïdes et NK pouvant exprimer 4-1BB étant présente dans le modèle Rag<sup>-/-</sup>. Enfin, nous ne pouvons pas exclure que les sous-clones sélectionnés diffèrent par autre chose que 4-1BB-L. Pour lever ce doute, on peut envisager l'utilisation du second clone KO ou la réintroduction du gène au sein du premier, avec les mêmes biais potentiels que décrits avec ICOS-L.

Par ailleurs, nous avons montré que le rejet initial de la tumeur 4-1BB-L KO permettait la mise en place d'une immunité stérilisante contre la lignée sauvage, suggérant que le mécanisme de régulation peut être pris de vitesse en cas d'existence d'une réponse mémoire. Cet élément appuie le fait que le système de régulation immunitaire impliqué dans la phase

d'initiation de la croissance tumorale se met en place très précocement, dans les premiers jours suivant l'implantation de la tumeur, avant l'apparition d'une réponse adaptative cytotoxique efficace.

### **Considérations thérapeutiques**

Malgré des résultats positifs chez l'animal, les études menées chez l'Homme avec les anticorps agonistes ciblant ICOS et 4-1BB sont décevantes. Les résultats obtenus au cours de ma thèse permettent de proposer des hypothèses pour expliquer cette inefficacité.

La faible efficacité obtenue jusqu'à présent chez l'Homme avec les agonistes anti-ICOS en monothérapie pourrait s'expliquer par le fait que ces anticorps exercent leur propriété sur l'ensemble des lymphocytes T. Or, les Treg étant les cellules avec la forte expression d'ICOS, ceux-ci seraient donc ciblés préférentiellement, à l'instar de ce qui peut exister avec la lignée exprimant ICOS-L où la proportion de Treg est augmentée et associée à une plus faible activation des cellules effectrices. Ainsi, l'utilisation d'un agoniste augmente le nombre global de TIL, sans modifier le ratio effecteurs/régulateurs, avec le risque que la balance penche vers les Treg. Cette hypothèse est appuyée par l'efficacité, en souris humanisées, de la combinaison de l'agoniste anti-ICOS et de la cyclophosphamide à faible dose<sup>410</sup>. En effet, dans ce modèle, les Treg étant déplétés par la cyclophosphamide<sup>150</sup>, l'anticorps peut exercer ces propriétés agonistes préférentiellement sur les lymphocytes T effecteurs et ainsi, faire basculer la balance effecteurs/régulateur en faveur des effecteurs, favorisant le contrôle de la croissance tumorale.

Concernant les anti-4-1BB, la situation est assez similaire avec une nuance : suivant l'affinité de l'anticorps, les données suggèrent que l'action sur les effecteurs, en particulier les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> pourrait être préférentielle, mais au prix d'une toxicité hépatique<sup>454</sup>. Néanmoins, l'effet agoniste semble aussi existé sur les Tregs ce qui pourrait expliquer la faible efficacité de l'utolimumab, un agoniste faible, en monothérapie<sup>346</sup>.

### **Perspectives**

Pour le projet relatif à l'expression d'ICOS-L par la tumeur et son impact sur la réponse immunitaire antitumorale, nous envisageons de :

- Evaluer un anticorps thérapeutique ciblant ICOS-L dans le cancer du sein en souris humanisée

Face à l'importance du phénotype observé en souris humanisées avec les tumeurs ICOS-L KO et contrôle, nous allons évaluer l'utilisation d'un anticorps monoclonal humanisé dans notre

modèle afin de déterminer si ICOS-L pourrait représenter une cible pour l'immunothérapie du cancer. L'anticorps que nous envisageons d'utiliser est le prezalumab (IgG2 humaine) qui a été évalué en clinique chez l'Homme jusqu'en phase 2 dans le traitement des maladies auto-immunes (syndrome de Sjögren/lupus/psoriasis). A ce jour, le développement clinique est interrompu. Par ailleurs, au-delà de l'aspect immunitaire, une étude a mis en évidence le rôle de l'interaction ostéopontine/ICOSL dans l'angiogenèse et le processus de métastase dans un modèle murin de cancer du sein<sup>455</sup>, ce mécanisme pourrait éventuellement être aussi affecté par l'utilisation d'un anticorps thérapeutique, renforçant l'intérêt de la cible.

- Caractériser *in vitro* l'interaction entre les Treg et la lignée exprimant ICOS-L

En parallèle de l'évaluation du prezalumab, nous envisageons d'effectuer des expériences de coculture *in vitro* entre des Treg humains et nos lignées tumorales afin d'essayer de mieux caractériser l'interaction entre la tumeur et les Treg (tests de prolifération, tests fonctionnels, microscopie, ...)

Concernant 4-1BB-L, les perspectives intègrent le projet de thèse d'une future doctorante dans l'équipe et visent à :

- Valider les données souris dans un modèle de cancer du rein en souris humanisée avec des CSH

Chez l'Homme, dans le cancer du rein, les Treg sont associés avec un mauvais pronostic<sup>137</sup>. Par ailleurs, 4-1BB-L est largement exprimé par les tumeurs rénales avec un impact délétère sur le pronostic clinique<sup>456</sup>. Ainsi, nous souhaitons reproduire les données obtenues en souris dans un modèle de souris humanisées et dans un cancer cliniquement pertinent.

- L'évaluation d'un anticorps monoclonal ciblant 4-1BB-L humain en souris humanisée

Toujours, dans une optique thérapeutique, nous envisageons d'évaluer un anticorps monoclonal ciblant 4-1BB-L humain dans le même modèle que ci-dessus. Cet anticorps sera développé au sein du laboratoire, est déjà financé par Inserm transfert et sera susceptible de faire l'objet d'un brevet. L'étude sera faite directement avec l'anticorps ciblant 4-1BB-L humain du fait de la faible homologie entre les protéines 4-1BB-L humaines et murines en particulier dans leur domaine d'interaction avec 4-1BB, ceci étant associé à des affinités différentes et possiblement des effets associés modifiés<sup>457</sup>.

- La réalisation d'expériences de « vaccination » avec la lignée 4-1BB-L KO

Au vu de la mémoire immunitaire développée chez la souris et des difficultés à capturer le phénotype des TIL des tumeurs KO pour 4-1BB-L, nous envisageons de réaliser des

expériences de pseudo-vaccination en co-implantant les tumeurs WT et KO (mélange 50:50, injection au flanc opposé) afin d'observer un éventuel rejet de la tumeur WT lors de la réponse primaire.

A plus long terme, on peut envisager d'appliquer notre modèle de tumeur KO en souris humanisée pour effectuer un criblage pour déterminer de nouvelles cibles d'intérêt pour l'immunothérapie du cancer.

---

## **Conclusion**

---



Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux 2 aspects de la modulation de la réponse immunitaire antitumorale que sont l'inhibition des cellules effectrices, avec HVEM et la promotion des cellules régulatrices, via ICOS-L et 4-1BB-L, et ce, du point de vue de la tumeur. Au cours des dernières années, l'accent a été mis sur la promotion des cellules effectrices avec les inhibiteurs de points de contrôle (anti-PD-1, anti-CTLA-4) et l'utilisation d'anticorps agonistes.

Mes travaux recentrent la question autour de la tumeur et des moyens à sa disposition pour forger un microenvironnement immunitaire favorable à son développement. Cela passe notamment par l'inhibition des cellules effectrices via l'expression de ligands de molécules de co-inhibition et la promotion des Treg/cellules régulatrices avec l'expression de ligands de leurs molécules de co-stimulation. Au cours de ma thèse, j'ai montré que l'expression par la tumeur d'HVEM, une molécule de co-inhibition, était associée à une moins bonne efficacité de la réponse immunitaire antitumorale, ce phénomène étant réversible avec l'utilisation d'un anticorps bloquant l'interaction entre HVEM et la molécule de co-inhibition BTLA. J'ai aussi montré que les expressions tumorales d'ICOS-L et 4-1BB-L, deux ligands de molécules de co-stimulation, limitaient, elles aussi, le contrôle de la croissance tumorale, probablement via la promotion directe des cellules régulatrices. Ce dernier point va dans le sens de travaux émergents sur les interactions directes entre la tumeur et les Treg.

Ainsi, nous proposons un nouveau modèle permettant l'évaluation *in vivo* de l'impact de l'expression de certaines molécules par la tumeur sur le système immunitaire. Ce modèle, basé sur l'utilisation de souris humanisées, bien que plus contraignant et coûteux que les modèles murins conventionnels a l'avantage de se rapprocher de la physiopathologie humaine et donc de passer outre une grande partie de la variabilité inter espèce. A terme, ce modèle devrait permettre la validation de nouvelles cibles potentielles et pertinente pour l'immunothérapie du cancer chez l'Homme.

---

## **Bibliographie**

---

1. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **71**, 209–249 (2021).
2. Allemani, C. *et al.* Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *The Lancet* **391**, 1023–1075 (2018).
3. Marant-Micallef, C. *et al.* Nombre et fractions de cancers attribuables au mode de vie et à l'environnement en France métropolitaine en 2015 : résultats principaux. *Bull Epidemiol Hebd.* 442–448 (2018).
4. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* **12**, 31–46 (2022).
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
6. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
7. Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A. & Moses, H. L. TGF- $\beta$  signaling deficient fibroblasts enhance Hepatocyte Growth Factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res* **6**, 1521–1533 (2008).
8. Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949–954 (2002).
9. Campisi, J. Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer* **3**, 339–349 (2003).
10. Curto, M., Cole, B. K., Lallemand, D., Liu, C.-H. & McClatchey, A. I. Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J Cell Biol* **177**, 893–903 (2007).

11. Okada, T., Lopez-Lago, M. & Giancotti, F. G. Merlin/NF-2 mediates contact inhibition of growth by suppressing recruitment of Rac to the plasma membrane. *J Cell Biol* **171**, 361–371 (2005).
12. Partanen, J. I., Nieminen, A. I. & Klefstrom, J. 3D view to tumor suppression: Lkb1, polarity and the arrest of oncogenic c-Myc. *Cell Cycle* **8**, 716–724 (2009).
13. Blasco, M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* **6**, 611–622 (2005).
14. Kim, N. W. *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**, 2011–2015 (1994).
15. Kopf, M., Bachmann, M. F. & Marsland, B. J. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 703–718 (2010).
16. Ji, Z., He, L., Regev, A. & Struhl, K. Inflammatory regulatory network mediated by the joint action of NF- $\kappa$ B, STAT3, and AP-1 factors is involved in many human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 9453–9462 (2019).
17. Becker, C. *et al.* TGF- $\beta$  Suppresses Tumor Progression in Colon Cancer by Inhibition of IL-6 trans-Signaling. *Immunity* **21**, 491–501 (2004).
18. Bollrath, J. *et al.* gp130-Mediated Stat3 Activation in Enterocytes Regulates Cell Survival and Cell-Cycle Progression during Colitis-Associated Tumorigenesis. *Cancer Cell* **15**, 91–102 (2009).
19. Campregher, C., Luciani, M. G. & Gasche, C. Activated neutrophils induce an hMSH2-dependent G2/M checkpoint arrest and replication errors at a (CA)<sub>13</sub>-repeat in colon epithelial cells. *Gut* **57**, 780–787 (2008).

20. Endo, Y. *et al.* Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation and the development of colitis-associated colorectal cancers. *Gastroenterology* **135**, 889–898, 898.e1–3 (2008).
21. Komori, J. *et al.* Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. *Hepatology* **47**, 888–896 (2008).
22. Takai, A. *et al.* A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations. *Oncogene* **28**, 469–478 (2009).
23. Sullivan, N. J. *et al.* Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* **28**, 2940–2947 (2009).
24. Voronov, E. *et al.* IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2645–2650 (2003).
25. Lugano, R., Ramachandran, M. & Dimberg, A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 1745–1770 (2020).
26. Bergers, G. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* **2**, 737–744 (2000).
27. Nagy, J. A., Chang, S.-H., Shih, S.-C., Dvorak, A. M. & Dvorak, H. F. Heterogeneity of the Tumor Vasculature. *Semin Thromb Hemost* **36**, 321–331 (2010).
28. Bogenrieder, T. & Herlyn, M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* **22**, 6524–6536 (2003).
29. Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 220–228 (2010).
30. Kandoth, C. *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **502**, 333–339 (2013).

31. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* **140**, 883–899 (2010).
32. Sakurai, T. *et al.* Hepatocyte Necrosis Induced by Oxidative Stress and IL-1 $\alpha$  Release Mediate Carcinogen-Induced Compensatory Proliferation and Liver Tumorigenesis. *Cancer Cell* **14**, 156–165 (2008).
33. Xu, X. D. *et al.* Warburg Effect or Reverse Warburg Effect? A Review of Cancer Metabolism. *ORT* **38**, 117–122 (2015).
34. Lunt, S. Y. & Vander Heiden, M. G. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**, 441–464 (2011).
35. Yuan, S., Norgard, R. J. & Stanger, B. Z. Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discovery* **9**, 837–851 (2019).
36. Thienpont, B. *et al.* Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity. *Nature* **537**, 63–68 (2016).
37. Torres, C. M. *et al.* The linker histone H1.0 generates epigenetic and functional intratumor heterogeneity. *Science* **353**, aaf1644 (2016).
38. Corces, M. R. *et al.* The chromatin accessibility landscape of primary human cancers. *Science* **362**, eaav1898 (2018).
39. Thomas, S. *et al.* The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. *Cancer Research* **77**, 1783–1812 (2017).
40. Sears, C. L. & Garrett, W. S. Microbes, Microbiota, and Colon Cancer. *Cell Host & Microbe* **15**, 317–328 (2014).
41. Nejman, D. *et al.* The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science* **368**, 973–980 (2020).

42. Gopalakrishnan, V. *et al.* Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* **359**, 97–103 (2018).
43. Routy, B. *et al.* Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* **359**, 91–97 (2018).
44. Faget, D. V., Ren, Q. & Stewart, S. A. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat Rev Cancer* **19**, 439–453 (2019).
45. Ehrlich, P. Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **42**, 17–47 (1909).
46. Foley, E. J. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res* **13**, 835–837 (1953).
47. van der Bruggen, P. *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**, 1643–1647 (1991).
48. Burnet, F. M. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* **13**, 1–27 (1970).
49. Kaplan, D. H. *et al.* Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7556–7561 (1998).
50. Shankaran, V. *et al.* IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111 (2001).
51. Gatti, R. A. & Good, R. A. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* **28**, 89–98 (1971).
52. Penn, I., Halgrimson, C. G. & Starzl, T. E. De novo malignant tumors in organ transplant recipients. *Transplant Proc* **3**, 773–778 (1971).
53. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 329–360 (2004).

54. Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annual Review of Immunology* **29**, 235–271 (2011).
55. López-Soto, A., Huergo-Zapico, L., Acebes-Huerta, A., Villa-Alvarez, M. & Gonzalez, S. NKG2D signaling in cancer immunosurveillance. *Int J Cancer* **136**, 1741–1750 (2015).
56. Wu, D. Y., Segal, N. H., Sidobre, S., Kronenberg, M. & Chapman, P. B. Cross-presentation of Disialoganglioside GD3 to Natural Killer T Cells. *Journal of Experimental Medicine* **198**, 173–181 (2003).
57. Gober, H.-J. *et al.* Human T Cell Receptor  $\gamma\delta$  Cells Recognize Endogenous Mevalonate Metabolites in Tumor Cells. *Journal of Experimental Medicine* **197**, 163–168 (2003).
58. Bromberg, J. F., Horvath, C. M., Wen, Z., Schreiber, R. D. & Darnell, J. E. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7673–7678 (1996).
59. Kumar, A., Commane, M., Flickinger, T. W., Horvath, C. M. & Stark, G. R. Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* **278**, 1630–1632 (1997).
60. Qin, Z. *et al.* A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer Res* **63**, 4095–4100 (2003).
61. Zamai, L. *et al.* Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* **188**, 2375–2380 (1998).
62. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
63. Boon, T. & van der Bruggen, P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* **183**, 725–729 (1996).



64. Vigneron, N. Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *Biomed Res Int* **2015**, 948501 (2015).
65. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* **331**, 1565–1570 (2011).
66. Wylie, B., Macri, C., Mintern, J. D. & Waithman, J. Dendritic Cells and Cancer: From Biology to Therapeutic Intervention. *Cancers (Basel)* **11**, 521 (2019).
67. Sautès-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J. & Fridman, W. H. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **19**, 307–325 (2019).
68. Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B. & Lawrence, T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J* **33**, 1104–1116 (2014).
69. Franciszkiwicz, K., Boissonnas, A., Boutet, M., Combadière, C. & Mami-Chouaib, F. Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Shaping the Effector Phase of the Antitumor Immune Response. *Cancer Research* **72**, 6325–6332 (2012).
70. Palucka, A. K. & Coussens, L. M. The Basis of Oncoimmunology. *Cell* **164**, 1233–1247 (2016).
71. Rosenthal, R. *et al.* Neoantigen-directed immune escape in lung cancer evolution. *Nature* **567**, 479–485 (2019).
72. Wang, Y., Hays, E., Rama, M. & Bonavida, B. Cell-mediated immune resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance* **3**, 232–251 (2020).
73. Romero, I. *et al.* MHC Intratumoral Heterogeneity May Predict Cancer Progression and Response to Immunotherapy. *Front Immunol* **9**, 102 (2018).

74. Schrörs, B. *et al.* HLA class I loss in metachronous metastases prevents continuous T cell recognition of mutated neoantigens in a human melanoma model. *Oncotarget* **8**, 28312–28327 (2017).
75. Dhatchinamoorthy, K., Colbert, J. D. & Rock, K. L. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Front Immunol* **12**, 636568 (2021).
76. Johnsen, A. K., Templeton, D. J., Sy, M. & Harding, C. V. Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis. *J. Immunol.* **163**, 4224–4231 (1999).
77. Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hicklin, D. J. & Ferrone, S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.* **74**, 181–273 (2000).
78. Qian, J. *et al.* TLR2 Promotes Glioma Immune Evasion by Downregulating MHC Class II Molecules in Microglia. *Cancer Immunol Res* **6**, 1220–1233 (2018).
79. Rimsza, L. M. *et al.* Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood* **103**, 4251–4258 (2004).
80. Bardhan, K., Anagnostou, T. & Boussiotis, V. A. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol* **7**, 550 (2016).
81. Tauriello, D. V. F. *et al.* TGF $\beta$  drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature* **554**, 538–543 (2018).
82. Liu, V. C. *et al.* Tumor evasion of the immune system by converting CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells into CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol* **178**, 2883–2892 (2007).

83. Ito, S.-E., Shirota, H., Kasahara, Y., Saijo, K. & Ishioka, C. IL-4 blockade alters the tumor microenvironment and augments the response to cancer immunotherapy in a mouse model. *Cancer Immunol Immunother* **66**, 1485–1496 (2017).
84. Gabrilovich, D. I. *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* **2**, 1096–1103 (1996).
85. Facciabene, A. *et al.* Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* **475**, 226–230 (2011).
86. Curiel, T. J. *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* **10**, 942–949 (2004).
87. Li, B.-H., Garstka, M. A. & Li, Z.-F. Chemokines and their receptors promoting the recruitment of myeloid-derived suppressor cells into the tumor. *Molecular Immunology* **117**, 201–215 (2020).
88. Bronte, V. *et al.* Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* **7**, 12150 (2016).
89. Veglia, F., Sanseviero, E. & Gabrilovich, D. I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat Rev Immunol* **21**, 485–498 (2021).
90. Gabrilovich, D. I. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunology Research* **5**, 3–8 (2017).
91. Wang, Y., Ding, Y., Guo, N. & Wang, S. MDSCs: Key Criminals of Tumor Pre-metastatic Niche Formation. *Front Immunol* **10**, 172 (2019).
92. Li, P. *et al.* Lung mesenchymal cells elicit lipid storage in neutrophils that fuel breast cancer lung metastasis. *Nat Immunol* **21**, 1444–1455 (2020).
93. Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* **11**, 889–896 (2010).

94. Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M. & Mantovani, A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* **177**, 7303–7311 (2006).
95. Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* **27**, 16–25 (2014).
96. Silva, Z. E. V. da, Lehr, H.-A. & Velin, D. In vitro and in vivo Repair Activities of Undifferentiated and Classically and Alternatively Activated Macrophages. *PAT* **81**, 86–93 (2014).
97. Liu, J. *et al.* Tumor-associated macrophages recruit CCR6<sup>+</sup> regulatory T cells and promote the development of colorectal cancer via enhancing CCL20 production in mice. *PLoS One* **6**, e19495 (2011).
98. Yeo, E.-J. *et al.* Myeloid WNT7b mediates the angiogenic switch and metastasis in breast cancer. *Cancer Res* **74**, 2962–2973 (2014).
99. Liu, C.-Y. *et al.* M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. *Lab Invest* **93**, 844–854 (2013).
100. Liguori, M., Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A. & Allavena, P. Tumor-Associated Macrophages as Incessant Builders and Destroyers of the Cancer Stroma. *Cancers (Basel)* **3**, 3740–3761 (2011).
101. Granot, Z. *et al.* Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell* **20**, 300–314 (2011).
102. Gerrard, T. L., Cohen, D. J. & Kaplan, A. M. Human Neutrophil-Mediated Cytotoxicity to Tumor Cells. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **66**, 483–488 (1981).

103. Welch, D. R., Schissel, D. J., Howrey, R. P. & Aeed, P. A. Tumor-elicited polymorphonuclear cells, in contrast to 'normal' circulating polymorphonuclear cells, stimulate invasive and metastatic potentials of rat mammary adenocarcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 5859–5863 (1989).
104. Casbon, A.-J. *et al.* Invasive breast cancer reprograms early myeloid differentiation in the bone marrow to generate immunosuppressive neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, E566–E575 (2015).
105. Nozawa, H., Chiu, C. & Hanahan, D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 12493–12498 (2006).
106. Karthaus, N., Torensma, R. & Tel, J. Deciphering the Message Broadcast by Tumor-Infiltrating Dendritic Cells. *The American Journal of Pathology* **181**, 733–742 (2012).
107. Faget, J. *et al.* ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4<sup>+</sup> T cells. *Cancer Res* **72**, 6130–6141 (2012).
108. Laoui, D. *et al.* The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity. *Nat Commun* **7**, 13720 (2016).
109. Spary, L. K. *et al.* Tumor stroma-derived factors skew monocyte to dendritic cell differentiation toward a suppressive CD14<sup>+</sup> PD-L1<sup>+</sup> phenotype in prostate cancer. *Oncoimmunology* **3**, e955331 (2014).
110. 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.* **155**, 1151–1164 (1995).
111. Shevach, E. M. & Thornton, A. M. tTregs, pTregs, and iTregs: Similarities and Differences. *Immunol Rev* **259**, 88–102 (2014).
112. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057–1061 (2003).
113. 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* **155**, 1151–1164 (1995).
114. Miyara, M. *et al.* Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* **30**, 899–911 (2009).
115. Tada, Y. *et al.* Targeting VEGFR2 with Ramucirumab strongly impacts effector/ activated regulatory T cells and CD8+ T cells in the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer* **6**, 106 (2018).
116. Togashi, Y., Shitara, K. & Nishikawa, H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **16**, 356–371 (2019).
117. Takeuchi, Y. & Nishikawa, H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *International Immunology* **28**, 401–409 (2016).
118. Ohue, Y. & Nishikawa, H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci.* **110**, 2080–2089 (2019).
119. Takahashi, T. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* **10**, 1969–1980 (1998).

120. Uyttenhove, C. *et al.* Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* **9**, 1269–1274 (2003).
121. Maj, T. *et al.* Oxidative stress controls regulatory T cell apoptosis and suppressor activity and PD-L1-blockade resistance in tumor. *Nat Immunol* **18**, 1332–1341 (2017).
122. Qureshi, O. S. *et al.* Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell extrinsic function of CTLA-4. *Science* **332**, 600–603 (2011).
123. Ping, Q. *et al.* Cancer-associated fibroblasts: overview, progress, challenges, and directions. *Cancer Gene Ther* **28**, 984–999 (2021).
124. Goulet, C. R. *et al.* Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through paracrine IL-6 signalling. *BMC Cancer* **19**, 137 (2019).
125. Ren, Y. *et al.* Paracrine and epigenetic control of CAF-induced metastasis: the role of HOTAIR stimulated by TGF- $\beta$ 1 secretion. *Mol Cancer* **17**, 5 (2018).
126. Mondini, M. *et al.* CCR2-Dependent Recruitment of Tregs and Monocytes Following Radiotherapy Is Associated with TNF $\alpha$ -Mediated Resistance. *Cancer Immunol Res* **7**, 376–387 (2019).
127. Feig, C. *et al.* Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 20212–20217 (2013).
128. Joyce, J. A. & Fearon, D. T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* **348**, 74–80 (2015).
129. Lakins, M. A., Ghorani, E., Munir, H., Martins, C. P. & Shields, J. D. Cancer-associated fibroblasts induce antigen-specific deletion of CD8 + T Cells to protect tumour cells. *Nat Commun* **9**, 948 (2018).

130. Gorchs, L. *et al.* Human Pancreatic Carcinoma-Associated Fibroblasts Promote Expression of Co-inhibitory Markers on CD4+ and CD8+ T-Cells. *Front Immunol* **10**, 847 (2019).
131. Georganaki, M. *et al.* Tumor endothelial cell up-regulation of IDO1 is an immunosuppressive feed-back mechanism that reduces the response to CD40-stimulating immunotherapy. *Oncoimmunology* **9**, 1730538 (2020).
132. De Sanctis, F., Ugel, S., Facciante, J. & Facciabene, A. The dark side of tumor-associated endothelial cells. *Semin Immunol* **35**, 35–47 (2018).
133. Hegde, P. S., Karanikas, V. & Evers, S. The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clinical Cancer Research* **22**, 1865–1874 (2016).
134. Samstein, R. M. *et al.* Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet* **51**, 202–206 (2019).
135. Pagès, F. *et al.* International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *The Lancet* **391**, 2128–2139 (2018).
136. Galon, J. *et al.* Towards the introduction of the ‘Immunoscore’ in the classification of malignant tumours. *J Pathol* **232**, 199–209 (2014).
137. Fridman, W. H., Zitvogel, L., Sautès-Fridman, C. & Kroemer, G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol* **14**, 717–734 (2017).
138. Giraldo, N. A. *et al.* Tumor-Infiltrating and Peripheral Blood T-cell Immunophenotypes Predict Early Relapse in Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* **23**, 4416–4428 (2017).



139. Wargo, J. A., Reuben, A., Cooper, Z. A., Oh, K. S. & Sullivan, R. J. Immune Effects of Chemotherapy, Radiation, and Targeted Therapy and Opportunities for Combination With Immunotherapy. *Seminars in Oncology* **42**, 601–616 (2015).
140. Lomax, M. E., Folkes, L. K. & O’Neill, P. Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clinical Oncology* **25**, 578–585 (2013).
141. Apetoh, L. *et al.* Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* **13**, 1050–1059 (2007).
142. El-Saghire, H., Michaux, A., Thierens, H. & Baatout, S. Low doses of ionizing radiation induce immune-stimulatory responses in isolated human primary monocytes. *Int J Mol Med* **32**, 1407–1414 (2013).
143. Reits, E. A. *et al.* Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med* **203**, 1259–1271 (2006).
144. Hareyama, M. *et al.* Effect of radiation on the expression of carcinoembryonic antigen of human gastric adenocarcinoma cells. *Cancer* **67**, 2269–2274 (1991).
145. Dy, G. K. & Adjei, A. A. Systemic cancer therapy: Evolution over the last 60 years. *Cancer* **113**, 1857–1887 (2008).
146. Dickens, E. & Ahmed, S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery (Oxford)* **36**, 134–138 (2018).
147. Bhullar, K. S. *et al.* Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Mol Cancer* **17**, 48 (2018).
148. Kurzrock, R., Kantarjian, H. M., Druker, B. J. & Talpaz, M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med* **138**, 819–830 (2003).

149. Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F. & Kroemer, G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* **8**, 59–73 (2008).
150. Ghiringhelli, F. *et al.* Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 641–648 (2007).
151. COLEY, W. B. The Treatment of Sarcoma with the Mixed Toxins of Erysipelas and Bacillus Prodigiosus. *The Boston Medical and Surgical Journal* **158**, 175–182 (1908).
152. Old, L. J., Clarke, D. A. & Benacerraf, B. Effect of Bacillus Calmette-Guerin infection on transplanted tumours in the mouse. *Nature* **184(Suppl 5)**, 291–292 (1959).
153. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
154. Oiseth, S. J. & Aziz, M. S. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* **3**, 250–261 (2017).
155. Conlon, K. C., Miljkovic, M. D. & Waldmann, T. A. Cytokines in the Treatment of Cancer. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **39**, 6–21 (2019).
156. Trepiaikas, R., Pedersen, A. E., Met, Ö. & Svane, I. M. Addition of interferon-alpha to a standard maturation cocktail induces CD38 up-regulation and increases dendritic cell function. *Vaccine* **27**, 2213–2219 (2009).
157. Basham, T. Y., Bourgeade, M. F., Creasey, A. A. & Merigan, T. C. Interferon increases HLA synthesis in melanoma cells: interferon-resistant and -sensitive cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **5** (1982).

158. Jewett, A. & Bonavida, B. Interferon- $\alpha$  activates cytotoxic function but inhibits interleukin-2-mediated proliferation and tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion by immature human natural killer cells. *J Clin Immunol* **15**, 35–44 (1995).
159. Wagner, T. C. *et al.* Interferon receptor expression regulates the antiproliferative effects of interferons on cancer cells and solid tumors. *International Journal of Cancer* **111**, 32–42 (2004).
160. Marchisone, C., Benelli, R., Albini, A., Santi, L. & Noonan, D. M. Inhibition of angiogenesis by type I interferons in models of Kaposi's sarcoma. *Int J Biol Markers* **14**, 257–262 (1999).
161. Jiang, T., Zhou, C. & Ren, S. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **5**, e1163462 (2016).
162. Ahmadzadeh, M. & Rosenberg, S. A. IL-2 administration increases CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in cancer patients. *Blood* **107**, 2409–2414 (2006).
163. Sim, G. C. *et al.* IL-2 therapy promotes suppressive ICOS<sup>+</sup> Treg expansion in melanoma patients. *J Clin Invest* **124**, 99–110 (2014).
164. Parato, K. A., Senger, D., Forsyth, P. A. J. & Bell, J. C. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer* **5**, 965–976 (2005).
165. Hoggan, M. D., Rowe, W. P., Black, P. H. & Huebner, R. J. PRODUCTION OF "TUMOR-SPECIFIC" ANTIGENS BY ONCOGENIC VIRUSES DURING ACUTE CYTOLYTIC INFECTIONS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **53**, 12–19 (1965).
166. Nguyen, H.-M., Guz-Montgomery, K. & Saha, D. Oncolytic Virus Encoding a Master Pro-Inflammatory Cytokine Interleukin 12 in Cancer Immunotherapy. *Cells* **9**, 400 (2020).
167. Kontermann, R. E., Ungerechts, G. & Nettelbeck, D. M. Viro-antibody therapy: engineering oncolytic viruses for genetic delivery of diverse antibody-based biotherapeutics. *MAbs* **13**, 1982447.

168. Aghi, M. & Martuza, R. L. Oncolytic viral therapies – the clinical experience. *Oncogene* **24**, 7802–7816 (2005).
169. Andtbacka, R. H. I. *et al.* Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *JCO* **33**, 2780–2788 (2015).
170. Morse, M. A., Gwin, W. R. & Mitchell, D. A. Vaccine Therapies for Cancer: Then and Now. *Targ Oncol* **16**, 121–152 (2021).
171. Hawiger, D. *et al.* Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* **194**, 769–779 (2001).
172. Paston, S. J., Brentville, V. A., Symonds, P. & Durrant, L. G. Cancer Vaccines, Adjuvants, and Delivery Systems. *Front Immunol* **12**, 627932 (2021).
173. Rohaan, M. W., Wilgenhof, S. & Haanen, J. B. A. G. Adoptive cellular therapies: the current landscape. *Virchows Arch* **474**, 449–461 (2019).
174. Ishikawa, E. *et al.* Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res* **24**, 1861–1871 (2004).
175. Miller, J. S. *et al.* Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* **105**, 3051–3057 (2005).
176. Spiess, P. J., Yang, J. C. & Rosenberg, S. A. In vivo antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes expanded in recombinant interleukin-2. *J Natl Cancer Inst* **79**, 1067–1075 (1987).
177. Rosenberg, S. A., Spiess, P. & Lafreniere, R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* **233**, 1318–1321 (1986).

178. Gattinoni, L. *et al.* Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J Exp Med* **202**, 907–912 (2005).
179. Rosenberg, S. A. *et al.* Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* **17**, 4550–4557 (2011).
180. Andersen, R. *et al.* T-cell Responses in the Microenvironment of Primary Renal Cell Carcinoma-Implications for Adoptive Cell Therapy. *Cancer Immunol Res* **6**, 222–235 (2018).
181. Lee, H. J. *et al.* Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes and their potential for application as adoptive cell transfer therapy in human breast cancer. *Oncotarget* **8**, 113345–113359 (2017).
182. Hall, M. *et al.* Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) from human pancreatic tumors. *J Immunother Cancer* **4**, 61 (2016).
183. Fujita, K. *et al.* Prolonged disease-free period in patients with advanced epithelial ovarian cancer after adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes. *Clin Cancer Res* **1**, 501–507 (1995).
184. Ben-Avi, R. *et al.* Establishment of adoptive cell therapy with tumor infiltrating lymphocytes for non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* **67**, 1221–1230 (2018).
185. Lauss, M. *et al.* Mutational and putative neoantigen load predict clinical benefit of adoptive T cell therapy in melanoma. *Nat Commun* **8**, 1738 (2017).
186. Alexandrov, L. B. *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415–421 (2013).

187. Clay, T. M. *et al.* Efficient Transfer of a Tumor Antigen-Reactive TCR to Human Peripheral Blood Lymphocytes Confers Anti-Tumor Reactivity. *The Journal of Immunology* **163**, 507–513 (1999).
188. Morgan, R. A. *et al.* Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science* **314**, 126–129 (2006).
189. Chen, Y. T. *et al.* Serological analysis of Melan-A(MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5915–5919 (1996).
190. Robbins, P. F. *et al.* Tumor Regression in Patients With Metastatic Synovial Cell Sarcoma and Melanoma Using Genetically Engineered Lymphocytes Reactive With NY-ESO-1. *J Clin Oncol* **29**, 917–924 (2011).
191. Morgan, R. A. *et al.* Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother* **36**, 133–151 (2013).
192. Draper, L. M. *et al.* Targeting of HPV-16+ Epithelial Cancer Cells by TCR Gene Engineered T Cells Directed against E6. *Clin Cancer Res* **21**, 4431–4439 (2015).
193. Klebanoff, C. A. *et al.* Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9571–9576 (2005).
194. Linnemann, C., Schumacher, T. N. M. & Bendle, G. M. T-Cell Receptor Gene Therapy: Critical Parameters for Clinical Success. *Journal of Investigative Dermatology* **131**, 1806–1816 (2011).
195. June, C. H., O'Connor, R. S., Kawalekar, O. U., Ghassemi, S. & Milone, M. C. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* **359**, 1361–1365 (2018).

196. Gross, G., Waks, T. & Eshhar, Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 10024–10028 (1989).
197. Chmielewski, M. & Abken, H. CAR T Cells Releasing IL-18 Convert to T-Bethigh FoxO1low Effectors that Exhibit Augmented Activity against Advanced Solid Tumors. *Cell Rep* **21**, 3205–3219 (2017).
198. Brentjens, R. J. *et al.* CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* **5**, 177ra38 (2013).
199. Garfall, A. L. *et al.* Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* **373**, 1040–1047 (2015).
200. Deng, H. *et al.* Efficacy of Humanized Anti-BCMA CAR T Cell Therapy in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma Patients With and Without Extramedullary Disease. *Front Immunol* **12**, 720571 (2021).
201. Ahmed, N. *et al.* Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) -Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J Clin Oncol* **33**, 1688–1696 (2015).
202. Lamers, C. H. *et al.* Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. *Mol Ther* **21**, 904–912 (2013).
203. Feng, K. *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of patients with EGFR-expressing advanced relapsed/refractory non-small cell lung cancer. *Sci China Life Sci* **59**, 468–479 (2016).

204. Louis, C. U. *et al.* Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor–positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* **118**, 6050–6056 (2011).
205. Maude, S. L. *et al.* Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* **378**, 439–448 (2018).
206. Park, J. H. *et al.* Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* **378**, 449–459 (2018).
207. Shah, N. N. & Fry, T. J. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **16**, 372–385 (2019).
208. Hay, K. A. *et al.* Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor–modified T-cell therapy. *Blood* **130**, 2295–2306 (2017).
209. Kailayangiri, S., Altvater, B., Wiebel, M., Jamitzky, S. & Rossig, C. Overcoming Heterogeneity of Antigen Expression for Effective CAR T Cell Targeting of Cancers. *Cancers (Basel)* **12**, 1075 (2020).
210. Chmielewski, M., Kopecky, C., Hombach, A. A. & Abken, H. IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively Muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. *Cancer Res* **71**, 5697–5706 (2011).
211. Salmon, H. *et al.* Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest* **122**, 899–910 (2012).
212. Hille, F. & Charpentier, E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **371**, 20150496 (2016).
213. Freen-van Heeren, J. J. Using CRISPR to enhance T cell effector function for therapeutic applications. *Cytokine: X* **3**, 100049 (2021).



214. Jung, I.-Y. *et al.* CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of DGK Improves Antitumor Activities of Human T Cells. *Cancer Research* **78**, 4692–4703 (2018).
215. Anderson, W., Thorpe, J., Long, S. A. & Rawlings, D. J. Efficient CRISPR/Cas9 Disruption of Autoimmune-Associated Genes Reveals Key Signaling Programs in Primary Human T Cells. *The Journal of Immunology* **203**, 3166–3178 (2019).
216. Tang, N. *et al.* TGF- $\beta$  inhibition via CRISPR promotes the long-term efficacy of CAR T cells against solid tumors. *JCI Insight* **5**, e133977 (2020).
217. Zhang, Y. *et al.* CRISPR-Cas9 mediated LAG-3 disruption in CAR-T cells. *Front Med* **11**, 554–562 (2017).
218. Shi, L. *et al.* CRISPR knock out CTLA-4 enhances the anti-tumor activity of cytotoxic T lymphocytes. *Gene* **636**, 36–41 (2017).
219. Zhao, Z. *et al.* CRISPR knock out of programmed cell death protein 1 enhances anti-tumor activity of cytotoxic T lymphocytes. *Oncotarget* **9**, 5208–5215 (2017).
220. Marotte, L. *et al.* Increased antitumor efficacy of PD-1-deficient melanoma-specific human lymphocytes. *J Immunother Cancer* **8**, e000311 (2020).
221. Stadtmauer, E. A. *et al.* CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science* **367**, eaba7365 (2020).
222. Lu, Y. *et al.* Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer. *Nat Med* **26**, 732–740 (2020).
223. Paintaud, G., Lejarre, F., Ternant, D., Goupille, P. & Watier, H. Les anticorps monoclonaux : une avancée thérapeutique récente et majeure. *Therapies* **64**, 1–7 (2009).
224. Jefferis, R. Antibody therapeutics:: isotype and glycoform selection. *Expert Opinion on Biological Therapy* **7**, 1401–1413 (2007).

225. Gogesch, P., Dudek, S., van Zandbergen, G., Waibler, Z. & Anzaghe, M. The Role of Fc Receptors on the Effectiveness of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Int J Mol Sci* **22**, 8947 (2021).
226. Segal, D. M., Taurog, J. D. & Metzger, H. Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 2993–2997 (1977).
227. Sharp, T. H. *et al.* Insights into IgM-mediated complement activation based on in situ structures of IgM-C1-C4b. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 11900–11905 (2019).
228. Nicholson, R. I., Gee, J. M. & Harper, M. E. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* **37 Suppl 4**, S9-15 (2001).
229. Ng, M. & Cunningham, D. Cetuximab (Erbix) – an emerging targeted therapy for epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *International Journal of Clinical Practice* **58**, 970–976 (2004).
230. Zhao, J., Mohan, N., Nussinov, R., Ma, B. & Wu, W. J. Trastuzumab Blocks the Receiver Function of HER2 Leading to the Population Shifts of HER2-Containing Homodimers and Heterodimers. *Antibodies (Basel)* **10**, 7 (2021).
231. Chen, S., Li, X., Chen, R., Yin, M. & Zheng, Q. Cetuximab intensifies the ADCC activity of adoptive NK cells in a nude mouse colorectal cancer xenograft model. *Oncol Lett* **12**, 1868–1876 (2016).
232. Petricevic, B. *et al.* Trastuzumab mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and phagocytosis to the same extent in both adjuvant and metastatic HER2/neu breast cancer patients. *J Transl Med* **11**, 307 (2013).
233. Sitohy, B., Nagy, J. A. & Dvorak, H. F. Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: Reassessing the target. *Cancer Res* **72**, 1909–1914 (2012).

234. Reymond, N. *et al.* Nectin4/PRR4, a New Afadin-associated Member of the Nectin Family That Trans-interacts with Nectin1/PRR1 through V Domain Interaction\*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 43205–43215 (2001).
235. Challita-Eid, P. M. *et al.* Enfortumab Vedotin Antibody–Drug Conjugate Targeting Nectin-4 Is a Highly Potent Therapeutic Agent in Multiple Preclinical Cancer Models. *Cancer Res* **76**, 3003–3013 (2016).
236. Shah, N., Chari, A., Scott, E., Mezzi, K. & Usmani, S. Z. B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches. *Leukemia* **34**, 985–1005 (2020).
237. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* **13**, 227–242 (2013).
238. Russick, J. *et al.* Natural killer cells in the human lung tumor microenvironment display immune inhibitory functions. *J Immunother Cancer* **8**, e001054 (2020).
239. Brunet, J.-F. *et al.* A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature* **328**, 267–270 (1987).
240. Linsley, P. S. *et al.* CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *Journal of Experimental Medicine* **174**, 561–569 (1991).
241. Linsley, P. S. *et al.* Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* **1**, 793–801 (1994).
242. Tivol, E. A. *et al.* Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* **3**, 541–547 (1995).

243. Takahashi, T. *et al.* Immunologic Self-Tolerance Maintained by Cd25+Cd4+Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte–Associated Antigen 4. *J Exp Med* **192**, 303–310 (2000).
244. Wing, K. *et al.* CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* **322**, 271–275 (2008).
245. Linsley, P. S. *et al.* Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* **4**, 535–543 (1996).
246. Qureshi, O. S. *et al.* Constitutive Clathrin-mediated Endocytosis of CTLA-4 Persists during T Cell Activation. *J Biol Chem* **287**, 9429–9440 (2012).
247. Thompson, C. B. & Allison, J. P. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity* **7**, 445–450 (1997).
248. Schneider, H., Prasad, K. V., Shoelson, S. E. & Rudd, C. E. CTLA-4 binding to the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *J Exp Med* **181**, 351–355 (1995).
249. Marengère, L. E. M. *et al.* Regulation of T Cell Receptor Signaling by Tyrosine Phosphatase SYP Association with CTLA-4. *Science* **272**, 1170–1173 (1996).
250. Chuang, E. *et al.* The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity* **13**, 313–322 (2000).
251. Bachmann, M. F., Köhler, G., Ecabert, B., Mak, T. W. & Kopf, M. Cutting edge: lymphoproliferative disease in the absence of CTLA-4 is not T cell autonomous. *J Immunol* **163**, 1128–1131 (1999).
252. Chen, W., Jin, W. & Wahl, S. M. Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells. *J Exp Med* **188**, 1849–1857 (1998).

253. Mellor, A. L. *et al.* Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Int Immunol* **16**, 1391–1401 (2004).
254. Yang, Y. F. *et al.* Enhanced induction of antitumor T-cell responses by cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 blockade: the effect is manifested only at the restricted tumor-bearing stages. *Cancer Res* **57**, 4036–4041 (1997).
255. Kwon, E. D. *et al.* Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 8099–8103 (1997).
256. Shrikant, P., Khoruts, A. & Mescher, M. F. CTLA-4 Blockade Reverses CD8+ T Cell Tolerance to Tumor by a CD4+ T Cell– and IL-2-Dependent Mechanism. *Immunity* **11**, 483–493 (1999).
257. Sotomayor, E. M., Borrello, I., Tubb, E., Allison, J. P. & Levitsky, H. I. In vivo blockade of CTLA-4 enhances the priming of responsive T cells but fails to prevent the induction of tumor antigen-specific tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 11476–11481 (1999).
258. Leach, D. R., Krummel, M. F. & Allison, J. P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* **271**, 1734–1736 (1996).
259. Hurwitz, A. A., Yu, T. F.-Y., Leach, D. R. & Allison, J. P. CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte– macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 10067–10071 (1998).

260. Mokyry, M. B., Kalinichenko, T., Gorelik, L. & Bluestone, J. A. Realization of the therapeutic potential of CTLA-4 blockade in low-dose chemotherapy-treated tumor-bearing mice. *Cancer Res* **58**, 5301–5304 (1998).
261. Phan, G. Q. *et al.* Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8372–8377 (2003).
262. Beck, K. E. *et al.* Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J Clin Oncol* **24**, 2283–2289 (2006).
263. Schadendorf, D. *et al.* Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* **33**, 1889–1894 (2015).
264. Eroglu, Z. *et al.* Long term Survival with CTLA-4 blockade Using Tremelimumab. *Eur J Cancer* **51**, 2689–2697 (2015).
265. Robert, C. *et al.* Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* **364**, 2517–2526 (2011).
266. Hodi, F. S. *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* **363**, 711–723 (2010).
267. Ribas, A. *et al.* Phase III randomized clinical trial comparing tremelimumab with standard-of-care chemotherapy in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol* **31**, 616–622 (2013).
268. Hong, M. M. Y. & Maleki Vareki, S. Addressing the Elephant in the Immunotherapy Room: Effector T-Cell Priming versus Depletion of Regulatory T-Cells by Anti-CTLA-4 Therapy. *Cancers* **14**, 1580 (2022).

269. Freeman, G. J. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* **192**, 1027–1034 (2000).
270. Sheppard, K.-A. *et al.* PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 $\zeta$  signalosome and downstream signaling to PKC $\theta$ . *FEBS Letters* **574**, 37–41 (2004).
271. Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T. & Honjo, T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 13866–13871 (2001).
272. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141–151 (1999).
273. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* **11**, 3887–3895 (1992).
274. Blackburn, S. D. *et al.* Coregulation of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* **10**, 29–37 (2009).
275. Huang, X. *et al.* PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 6303–6308 (2009).
276. Terme, M. *et al.* IL-18 Induces PD-1–Dependent Immunosuppression in Cancer. *Cancer Research* **71**, 5393–5399 (2011).

277. Velu, V. *et al.* Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* **458**, 206–210 (2009).
278. Francisco, L. M. *et al.* PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* **206**, 3015–3029 (2009).
279. Kumagai, S. *et al.* The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies. *Nat Immunol* **21**, 1346–1358 (2020).
280. Tan, C. L. *et al.* PD-1 restraint of regulatory T cell suppressive activity is critical for immune tolerance. *Journal of Experimental Medicine* **218**, e20182232 (2020).
281. Keir, M. E. *et al.* Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 883–895 (2006).
282. Wang, X., Teng, F., Kong, L. & Yu, J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther* **9**, 5023–5039 (2016).
283. Hirano, F. *et al.* Blockade of B7-H1 and PD-1 by Monoclonal Antibodies Potentiates Cancer Therapeutic Immunity. *Cancer Research* **65**, 1089–1096 (2005).
284. Gellrich, F. F., Schmitz, M., Beissert, S. & Meier, F. Anti-PD-1 and Novel Combinations in the Treatment of Melanoma—An Update. *J Clin Med* **9**, 223 (2020).
285. Michot, J. M. *et al.* Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *European Journal of Cancer* **54**, 139–148 (2016).
286. Upadhaya, S., Neftelinov, S. T., Hodge, J. & Campbell, J. Challenges and opportunities in the PD1/PDL1 inhibitor clinical trial landscape. *Nat Rev Drug Discov* **21**, 482–483 (2022).
287. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).



288. Im, S. J. *et al.* Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature* **537**, 417–421 (2016).
289. Gubin, M. M. *et al.* High-Dimensional Analysis Delineates Myeloid and Lymphoid Compartment Remodeling during Successful Immune-Checkpoint Cancer Therapy. *Cell* **175**, 1014-1030.e19 (2018).
290. Upadhaya, S., Neftelinov, S. T., Hodge, J. & Campbell, J. Challenges and opportunities in the PD1/PDL1 inhibitor clinical trial landscape. *Nature Reviews Drug Discovery* (2022) doi:10.1038/d41573-022-00030-4.
291. Curran, M. A., Montalvo, W., Yagita, H. & Allison, J. P. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4275–4280 (2010).
292. Rotte, A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **38**, 255 (2019).
293. Sznol, M. *et al.* Pooled Analysis Safety Profile of Nivolumab and Ipilimumab Combination Therapy in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol* **35**, 3815–3822 (2017).
294. Woo, S.-R. *et al.* Immune Inhibitory Molecules LAG-3 and PD-1 Synergistically Regulate T-cell Function to Promote Tumoral Immune Escape. *Cancer Research* **72**, 917–927 (2012).
295. Long, G. V. *et al.* Relatlimab and nivolumab versus nivolumab in previously untreated metastatic or unresectable melanoma: Overall survival and response rates from RELATIVITY-047 (CA224-047). *JCO* **40**, 360385–360385 (2022).
296. Yi, M. *et al.* Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions. *Molecular Cancer* **21**, 28 (2022).

297. Šedý, J. R. & Ramezani-Rad, P. HVEM network signaling in cancer. *Adv Cancer Res* **142**, 145–186 (2019).
298. Ward-Kavanagh, L. K., Lin, W. W., Šedý, J. R. & Ware, C. F. The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses. *Immunity* **44**, 1005–1019 (2016).
299. Cheung, T. C. *et al.* T Cell Intrinsic Heterodimeric Complexes between HVEM and BTLA Determine Receptivity to the Surrounding Microenvironment. *The Journal of Immunology* **183**, 7286–7296 (2009).
300. Marsters, S. *et al.* Herpesvirus Entry Mediator, a Member of the Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR) Family, Interacts with Members of the TNFR-associated Factor Family and Activates the Transcription Factors NF- $\kappa$ B and AP-1. *The Journal of biological chemistry* **272**, 14029–32 (1997).
301. Soroosh, P. *et al.* Herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) regulates the persistence of T helper memory cell populations. *Journal of Experimental Medicine* **208**, 797–809 (2011).
302. Watanabe, N. *et al.* BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol* **4**, 670–679 (2003).
303. Xu, X. *et al.* PD-1 and BTLA regulate T cell signaling differentially and only partially through SHP1 and SHP2. *Journal of Cell Biology* **219**, e201905085 (2020).
304. Gavrieli, M. & Murphy, K. M. Association of Grb-2 and PI3K p85 with phosphotyrosine peptides derived from BTLA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **345**, 1440–1445 (2006).
305. Rabot, M. *et al.* CD160-activating NK cell effector functions depend on the phosphatidylinositol 3-kinase recruitment. *International Immunology* **19**, 401–409 (2007).

306. Giustiniani, J., Bensussan, A. & Marie-Cardine, A. Identification and Characterization of a Transmembrane Isoform of CD160 (CD160-TM), a Unique Activating Receptor Selectively Expressed upon Human NK Cell Activation. *The Journal of Immunology* **182**, 63–71 (2009).
307. Cai, G. *et al.* CD160 inhibits activation of human CD4<sup>+</sup> T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nature Immunology* **9**, 176–185 (2008).
308. Giustiniani, J., Marie-Cardine, A. & Bensussan, A. A Soluble Form of the MHC Class I-Specific CD160 Receptor Is Released from Human Activated NK Lymphocytes and Inhibits Cell-Mediated Cytotoxicity. *The Journal of Immunology* **178**, 1293–1300 (2007).
309. del Rio, M.-L., Schneider, P., Fernandez-Renedo, C., Perez-Simon, J.-A. & Rodriguez-Barbosa, J.-I. LIGHT/HVEM/LT $\beta$ R Interaction as a Target for the Modulation of the Allogeneic Immune Response in Transplantation. *American Journal of Transplantation* **13**, 541–551 (2013).
310. Battin, C. *et al.* BTLA inhibition has a dominant role in the cis-complex of BTLA and HVEM. *Frontiers in Immunology* **13**, (2022).
311. Expression of TNFRSF14 in cancer - Summary - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000157873-TNFRSF14/pathology>.
312. Pontén, F., Jirström, K. & Uhlen, M. The Human Protein Atlas—a tool for pathology. *The Journal of Pathology* **216**, 387–393 (2008).
313. Migita, K. *et al.* Significant involvement of herpesvirus entry mediator in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* **120**, 808–817 (2014).
314. Inoue, T. *et al.* HVEM Expression Contributes to Tumor Progression and Prognosis in Human Colorectal Cancer. *Anticancer Res* **35**, 1361–1367 (2015).

315. Lan, X. *et al.* Increased BTLA and HVEM in gastric cancer are associated with progression and poor prognosis. *Onco Targets Ther* **10**, 919–926 (2017).
316. Sideras, K. *et al.* Tumor cell expression of immune inhibitory molecules and tumor-infiltrating lymphocyte count predict cancer-specific survival in pancreatic and ampullary cancer. *International Journal of Cancer* **141**, 572–582 (2017).
317. Tsang, J. Y. S. *et al.* Expression and Clinical Significance of Herpes Virus Entry Mediator (HVEM) in Breast Cancer. *Ann Surg Oncol* **24**, 4042–4050 (2017).
318. Hokuto, D. *et al.* Clinical impact of herpesvirus entry mediator expression in human hepatocellular carcinoma. *European Journal of Cancer* **51**, 157–165 (2015).
319. Sideras, K. *et al.* PD-L1, Galectin-9 and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes are associated with survival in hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology* **6**, e1273309 (2017).
320. Yi, Y. *et al.* Clinical significance of herpes virus entry mediator expression in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* **20**, 19 (2020).
321. Ma, B. *et al.* High expression of HVEM is associated with improved prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncol Lett* **21**, 69 (2021).
322. Zhu, Y.-D. & Lu, M.-Y. Increased expression of TNFRSF14 indicates good prognosis and inhibits bladder cancer proliferation by promoting apoptosis. *Mol Med Rep* **18**, 3403–3410 (2018).
323. Ren, S. *et al.* The immune checkpoint, HVEM may contribute to immune escape in non-small cell lung cancer lacking PD-L1 expression. *Lung Cancer* **125**, 115–120 (2018).
324. Tang, M. *et al.* High expression of herpes virus entry mediator is associated with poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Cancer Res* **9**, 975–987 (2019).

325. Sasaki, Y. *et al.* Significance of Herpesvirus Entry Mediator Expression in Human Colorectal Liver Metastasis. *Ann Surg Oncol* **26**, 3982–3989 (2019).
326. Malissen, N. *et al.* HVEM has a broader expression than PD-L1 and constitutes a negative prognostic marker and potential treatment target for melanoma. *Oncolimmunology* **0**, 1665976 (2019).
327. Derré, L. *et al.* BTLA mediates inhibition of human tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells that can be partially reversed by vaccination. *J Clin Invest* **120**, 157–167 (2010).
328. Han, L. *et al.* Soluble B and T Lymphocyte Attenuator Possesses Antitumor Effects and Facilitates Heat Shock Protein 70 Vaccine-Triggered Antitumor Immunity against a Murine TC-1 Cervical Cancer Model In Vivo. *The Journal of Immunology* **183**, 7842–7850 (2009).
329. Chen, Y.-L. *et al.* BTLA blockade enhances Cancer therapy by inhibiting IL-6/IL-10-induced CD19<sup>high</sup> B lymphocytes. *J Immunother Cancer* **7**, 313 (2019).
330. Cheuk, A. T. C., Mufti, G. J. & Guinn, B. Role of 4-1BB:4-1BB ligand in cancer immunotherapy. *Cancer Gene Ther* **11**, 215–226 (2004).
331. Freeman, Z. T. *et al.* A conserved intratumoral regulatory T cell signature identifies 4-1BB as a pan-cancer target. *J Clin Invest* **130**, 1405–1416 (2020).
332. Zhang, H. *et al.* Tumor Expression of 4-1BB Ligand Sustains Tumor Lytic T Cells. *Cancer Biology & Therapy* **2**, 579–586 (2003).
333. Shuford, W. W. *et al.* 4-1BB Costimulatory Signals Preferentially Induce CD8<sup>+</sup> T Cell Proliferation and Lead to the Amplification In Vivo of Cytotoxic T Cell Responses. *Journal of Experimental Medicine* **186**, 47–55 (1997).
334. Lee, H.-W. *et al.* 4-1BB Promotes the Survival of CD8<sup>+</sup> T Lymphocytes by Increasing Expression of Bcl-xL and Bfl-1. *The Journal of Immunology* **169**, 4882–4888 (2002).

335. Ju, S.-W. *et al.* A Functional Anti-Human 4-1BB Ligand Monoclonal Antibody that Enhances Proliferation of Monocytes by Reverse Signaling of 4-1BBL. *Hybridoma and Hybridomics* **22**, 333–338 (2003).
336. Tu, T. H. *et al.* 4-1BBL signaling promotes cell proliferation through reprogramming of glucose metabolism in monocytes/macrophages. *The FEBS Journal* **282**, 1468–1480 (2015).
337. Söllner, L., Kwajah, M. M. S., Wu, J. T. & Schwarz, H. Signal transduction mechanisms of CD137 ligand in human monocytes. *Cellular Signalling* **19**, 1899–1908 (2007).
338. Eun, S.-Y., Lee, S.-W., Xu, Y. & Croft, M. 4-1BB Ligand Signaling to T Cells Limits T Cell Activation. *The Journal of Immunology* **194**, 134–141 (2015).
339. Ding, Z. *et al.* CD137L and CD4 T cells limit BCL6-expressing pre-germinal center B cell expansion and BCL6-driven B cell malignancy. *Immunology & Cell Biology* **100**, 705–717 (2022).
340. Qian, Y. *et al.* CD137 ligand-mediated reverse signaling inhibits proliferation and induces apoptosis in non-small cell lung cancer. *Med Oncol* **32**, 44 (2015).
341. Gullo, C. *et al.* Inhibition of Proliferation and Induction of Apoptosis in Multiple Myeloma Cell Lines by CD137 Ligand Signaling. *PLOS ONE* **5**, e10845 (2010).
342. Ge, Y. *et al.* Nuclear-localized costimulatory molecule 4-1BBL promotes colon cancer cell proliferation and migration by regulating nuclear Gsk3 $\beta$ , and is linked to the poor outcomes associated with colon cancer. *Cell Cycle* **19**, 577–591 (2020).
343. Melero, I. *et al.* Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* **3**, 682–685 (1997).

344. Wilcox, R. A. *et al.* Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors. *J Clin Invest* **109**, 651–659 (2002).
345. Weigelin, B. *et al.* Focusing and sustaining the antitumor CTL effector killer response by agonist anti-CD137 mAb. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 7551–7556 (2015).
346. Etxeberria, I., Glez-Vaz, J., Teijeira, Á. & Melero, I. New emerging targets in cancer immunotherapy: CD137/4-1BB costimulatory axis. *ESMO Open* **4**, e000733 (2019).
347. Swallow, M. M., Wallin, J. J. & Sha, W. C. B7h, a Novel Costimulatory Homolog of B7.1 and B7.2, Is Induced by TNF $\alpha$ . *Immunity* **11**, 423–432 (1999).
348. Amatore, F., Gorvel, L. & Olive, D. Role of Inducible Co-Stimulator (ICOS) in cancer immunotherapy. *Expert Opinion on Biological Therapy* **20**, 141–150 (2020).
349. Klingenberg, R. *et al.* Endothelial inducible costimulator ligand expression is increased during human cardiac allograft rejection and regulates endothelial cell-dependent allo-activation of CD8<sup>+</sup> T cells in vitro. *Eur J Immunol* **35**, 1712–1721 (2005).
350. Fos, C. *et al.* ICOS ligation recruits the p50 $\alpha$  PI3K regulatory subunit to the immunological synapse. *J Immunol* **181**, 1969–1977 (2008).
351. van Berkel, M. E. A. T. & Oosterwegel, M. A. CD28 and ICOS: Similar or separate costimulators of T cells? *Immunology Letters* **105**, 115–122 (2006).
352. Bauquet, A. T. *et al.* The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol* **10**, 167–175 (2009).

353. Warnatz, K. *et al.* Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* **107**, 3045–3052 (2006).
354. G, T. *et al.* Reverse signaling using an inducible costimulator to enhance immunogenic function of dendritic cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **66**, (2009).
355. Wallin, J. J., Liang, L., Bakardjiev, A. & Sha, W. C. Enhancement of CD8+ T Cell Responses by ICOS/B7h Costimulation. *The Journal of Immunology* **167**, 132–139 (2001).
356. Burmeister, Y. *et al.* ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol* **180**, 774–782 (2008).
357. Zhang, Y. *et al.* The Clinical impact of ICOS signal in colorectal cancer patients. *Oncol Immunology* **5**, 00–00 (2016).
358. Martin-Orozco, N. *et al.* Melanoma Cells Express ICOS Ligand to Promote the Activation and Expansion of T-Regulatory Cells. *Cancer Res* **70**, 9581–9590 (2010).
359. Oliveira, G. *et al.* Landscape of helper and regulatory antitumour CD4+ T cells in melanoma. *Nature* **605**, 532–538 (2022).
360. Iwata, R. *et al.* ICOSLG-mediated regulatory T-cell expansion and IL-10 production promote progression of glioblastoma. *Neuro Oncol* **22**, 333–344 (2020).
361. Zamarin, D. *et al.* Intratumoral modulation of the inducible co-stimulator ICOS by recombinant oncolytic virus promotes systemic anti-tumour immunity. *Nat Commun* **8**, 14340 (2017).
362. Fan, X., Quezada, S. A., Sepulveda, M. A., Sharma, P. & Allison, J. P. Engagement of the ICOS pathway markedly enhances efficacy of CTLA-4 blockade in cancer immunotherapy. *J Exp Med* **211**, 715–725 (2014).



363. Quaratino, S. *et al.* A first-in-human study of KY1044, a fully human anti-ICOS IgG1 antibody as monotherapy and in combination with atezolizumab in patients with selected advanced malignancies. *JCO* **37**, TPS2644–TPS2644 (2019).
364. Hedvat, M. *et al.* Abstract 2784: Simultaneous checkpoint-checkpoint or checkpoint-costimulatory receptor targeting with bispecific antibodies promotes enhanced human T cell activation. *Cancer Research* **78**, 2784–2784 (2018).
365. Arce Vargas, F. *et al.* Fc Effector Function Contributes to the Activity of Human Anti-CTLA-4 Antibodies. *Cancer Cell* **33**, 649–663.e4 (2018).
366. De Cicco, P., Ercolano, G. & Ianaro, A. The New Era of Cancer Immunotherapy: Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Overcome Immune Evasion. *Front Immunol* **11**, 1680 (2020).
367. Liu, T. *et al.* Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol* **12**, 1–15 (2019).
368. Onizuka, S. *et al.* Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* **59**, 3128–3133 (1999).
369. Yu, P. *et al.* Intratumor depletion of CD4<sup>+</sup> cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *Journal of Experimental Medicine* **201**, 779–791 (2005).
370. Fisher, S. A. *et al.* Transient Treg depletion enhances therapeutic anti-cancer vaccination. *Immun Inflamm Dis* **5**, 16–28 (2016).
371. Saito, T. *et al.* Two FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat Med* **22**, 679–684 (2016).
372. Rech, A. J. *et al.* CD25 Blockade Depletes and Selectively Reprograms Regulatory T Cells in Concert with Immunotherapy in Cancer Patients. *Sci Transl Med* **4**, 134ra62 (2012).

373. Sugiyama, D. *et al.* Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 17945–17950 (2013).
374. Schoenhals, J. E. *et al.* Anti-glucocorticoid-induced Tumor Necrosis Factor-Related Protein (GITR) Therapy Overcomes Radiation-Induced Treg Immunosuppression and Drives Abscopal Effects. *Front Immunol* **9**, 2170 (2018).
375. Buchan, S. L. *et al.* Antibodies to Costimulatory Receptor 4-1BB Enhance Anti-tumor Immunity via T Regulatory Cell Depletion and Promotion of CD8 T Cell Effector Function. *Immunity* **49**, 958-970.e7 (2018).
376. Satoh, K. *et al.* Novel anti-GARP antibody DS-1055a augments anti-tumor immunity by depleting highly suppressive GARP+ regulatory T cells. *International Immunology* **33**, 435–446 (2021).
377. Amoozgar, Z. *et al.* Targeting Treg cells with GITR activation alleviates resistance to immunotherapy in murine glioblastomas. *Nat Commun* **12**, 2582 (2021).
378. de Streeel, G. *et al.* Selective inhibition of TGF- $\beta$ 1 produced by GARP-expressing Tregs overcomes resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer. *Nat Commun* **11**, 4545 (2020).
379. Perrot, I. *et al.* Blocking Antibodies Targeting the CD39/CD73 Immunosuppressive Pathway Unleash Immune Responses in Combination Cancer Therapies. *Cell Reports* **27**, 2411-2425.e9 (2019).
380. Dao, T. *et al.* Depleting T regulatory cells by targeting intracellular Foxp3 with a TCR mimic antibody. *Oncoimmunology* **8**, 1570778 (2019).
381. Sinclair, C. *et al.* Abstract 2713: Discovery and characterization of AZD8701, a high affinity antisense oligonucleotide targeting FOXP3 to relieve immunosuppression in cancer. *Cancer Research* **79**, 2713 (2019).

382. Sato, K. *et al.* Spatially selective depletion of tumor-associated regulatory T cells with near-infrared photoimmunotherapy. *Science Translational Medicine* **8**, 352ra110-352ra110 (2016).
383. Pai, C.-C. S. *et al.* Tumor-conditional anti-CTLA4 uncouples antitumor efficacy from immunotherapy-related toxicity. *J Clin Invest* **129**, 349–363 (2019).
384. Dees, S., Ganesan, R., Singh, S. & Grewal, I. S. Regulatory T cell targeting in cancer: Emerging strategies in immunotherapy. *European Journal of Immunology* **51**, 280–291 (2021).
385. Mestas, J. & Hughes, C. C. W. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology* **172**, 2731–2738 (2004).
386. Lenschow, D. J., Walunas, T. L. & Bluestone, J. A. Cd28/B7 System of T Cell Costimulation. *Annual Review of Immunology* **14**, 233–258 (1996).
387. Barnaba, V., Watts, C., de Boer, M., Lane, P. & Lanzavecchia, A. Professional presentation of antigen by activated human T cells. *European Journal of Immunology* **24**, 71–75 (1994).
388. Arrowsmith, J. & Miller, P. Phase II and Phase III attrition rates 2011–2012. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 569–569 (2013).
389. Vudattu, N. K. *et al.* Humanized mice as a model for aberrant responses in human T cell immunotherapy. *J Immunol* **193**, 587–596 (2014).
390. Adam, K., Iuga, A., Tocheva, A. S. & Mor, A. A novel mouse model for checkpoint inhibitor-induced adverse events. *PLoS One* **16**, e0246168 (2021).
391. Tian, H., Lyu, Y., Yang, Y.-G. & Hu, Z. Humanized Rodent Models for Cancer Research. *Front Oncol* **10**, 1696 (2020).

392. Chen, Q., Khoury, M. & Chen, J. Expression of human cytokines dramatically improves reconstitution of specific human-blood lineage cells in humanized mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 21783–21788 (2009).
393. Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Baird, S. M. & Wilson, D. B. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* **335**, 256–259 (1988).
394. King, M. A. *et al.* Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. *Clinical & Experimental Immunology* **157**, 104–118 (2009).
395. Moser, J. *et al.* Distinct Differences on Neointima Formation in Immunodeficient and Humanized Mice after Carotid or Femoral Arterial Injury. *Sci Rep* **6**, 35387 (2016).
396. Sanmamed, M. F. *et al.* Nivolumab and Urelumab Enhance Antitumor Activity of Human T Lymphocytes Engrafted in Rag2<sup>-/-</sup> IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> Immunodeficient Mice. *Cancer Res* **75**, 3466–3478 (2015).
397. Verma, B. & Wesa, A. Establishment of Humanized Mice from Peripheral Blood Mononuclear Cells or Cord Blood CD34+ Hematopoietic Stem Cells for Immune-Oncology Studies Evaluating New Therapeutic Agents. *Current Protocols in Pharmacology* **89**, e77 (2020).
398. Cogels, M. M. *et al.* Humanized Mice as a Valuable Pre-Clinical Model for Cancer Immunotherapy Research. *Front Oncol* **11**, 784947 (2021).
399. Melkus, M. W. *et al.* Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. *Nat Med* **12**, 1316–1322 (2006).

400. Tonomura, N., Habiro, K., Shimizu, A., Sykes, M. & Yang, Y.-G. Antigen-specific human T-cell responses and T cell-dependent production of human antibodies in a humanized mouse model. *Blood* **111**, 4293–4296 (2008).
401. De La Rochere, P. *et al.* Humanized Mice for the Study of Immuno-Oncology. *Trends in Immunology* **39**, 748–763 (2018).
402. Capasso, A. *et al.* Characterization of immune responses to anti-PD-1 mono and combination immunotherapy in hematopoietic humanized mice implanted with tumor xenografts. *j. immunotherapy cancer* **7**, 37 (2019).
403. Meraz, I. M. *et al.* An improved patient-derived xenograft humanized mouse model for evaluation of lung cancer immune responses. *Cancer Immunol Res* **7**, 1267–1279 (2019).
404. Ny, L. *et al.* Supporting clinical decision making in advanced melanoma by preclinical testing in personalized immune-humanized xenograft mouse models. *Annals of Oncology* **31**, 266–273 (2020).
405. Cogels, M. M. *et al.* Humanized Mice as a Valuable Pre-Clinical Model for Cancer Immunotherapy Research. *Frontiers in Oncology* **11**, (2021).
406. Guil-Luna, S., Sedlik, C. & Piaggio, E. Humanized Mouse Models to Evaluate Cancer Immunotherapeutics. *Annual Review of Cancer Biology* **5**, 119–136 (2021).
407. Yin, L., Wang, X.-J., Chen, D.-X., Liu, X.-N. & Wang, X.-J. Humanized mouse model: a review on preclinical applications for cancer immunotherapy. *Am J Cancer Res* **10**, 4568–4584 (2020).
408. Setlai, B. P. *et al.* Immunosuppressive Signaling Pathways as Targeted Cancer Therapies. *Biomedicines* **10**, 682 (2022).

409. Sun, W. *et al.* A positive-feedback loop between tumour infiltrating activated Treg cells and type 2-skewed macrophages is essential for progression of laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* **117**, 1631–1643 (2017).
410. Burlion, A. *et al.* A novel combination of chemotherapy and immunotherapy controls tumor growth in mice with a human immune system. *Oncoimmunology* **8**, 1596005 (2019).
411. Ito, T. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* **204**, 105–115 (2007).
412. Conrad, C. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells. *Cancer Res* **72**, 5240–5249 (2012).
413. Expression of ICOSLG in breast cancer - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000160223-ICOSLG/pathology/breast+cancer#>.
414. Li, T. *et al.* TIMER: A Web Server for Comprehensive Analysis of Tumor-Infiltrating Immune Cells. *Cancer Res* **77**, e108–e110 (2017).
415. Sturm, G. *et al.* Comprehensive evaluation of transcriptome-based cell-type quantification methods for immuno-oncology. *Bioinformatics* **35**, i436–i445 (2019).
416. Camenen, E., Marodon, G. & Aubert, N. tcgaViz: Visualization Tool for the Cancer Genome Atlas Program (TCGA). (2022).
417. Newman, A. M. *et al.* Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry. *Nat Biotechnol* **37**, 773–782 (2019).
418. Martinez-Perez, A. G. *et al.* 4-1BBL as a Mediator of Cross-Talk between Innate, Adaptive, and Regulatory Immunity against Cancer. *Int J Mol Sci* **22**, 6210 (2021).

419. Roussel, L. *et al.* Loss of human ICOSL results in combined immunodeficiency. *The Journal of Experimental Medicine* **215**, jem.20180668 (2018).
420. Finotello, F. *et al.* Molecular and pharmacological modulators of the tumor immune contexture revealed by deconvolution of RNA-seq data. *Genome Medicine* **11**, 34 (2019).
421. Wang, B. *et al.* Expression of ICOSL is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *PeerJ* **7**, e6903 (2019).
422. Rodriguez, A. B. & Engelhard, V. H. Insights into Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures: Novel Targets for Antitumor Immunity and Cancer Immunotherapy. *Cancer Immunology Research* **8**, 1338–1345 (2020).
423. Germain, C. *et al.* Tertiary Lymphoid Structure-B Cells Narrow Regulatory T Cells Impact in Lung Cancer Patients. *Front Immunol* **12**, 626776 (2021).
424. Hegde, P. S., 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* **22**, 1865–1874 (2016).
425. Aragonese-Fenoll, L. *et al.* Role of endocytosis and trans-endocytosis in ICOS costimulator-induced downmodulation of the ICOS Ligand. *Journal of Leukocyte Biology* **110**, 867–884 (2021).
426. Chen, X. *et al.* Expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cells: applicability to tumor infiltrating T regulatory cells. *J Immunol* **180**, 6467–6471 (2008).
427. Nishikawa, H. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in tumor immunity. *International Journal of Cancer* **127**, 759–767 (2010).
428. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. (2021).

429. Rujas, E., Cui, H., Sicard, T., Semesi, A. & Julien, J.-P. Structural characterization of the ICOS/ICOS-L immune complex reveals high molecular mimicry by therapeutic antibodies. *Nat Commun* **11**, 5066 (2020).
430. Smith, S. E., Hoelzinger, D. B., Dominguez, A. L., Van Snick, J. & Lustgarten, J. Signals through 4-1BB inhibit T regulatory cells by blocking IL-9 production enhancing antitumor responses. *Cancer Immunol. Immunother.* **60**, 1775–1787 (2011).
431. Sun, Y. *et al.* Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **168**, 1457–1465 (2002).
432. Kocak, E. *et al.* Combination therapy with anti-CTL antigen-4 and anti-4-1BB antibodies enhances cancer immunity and reduces autoimmunity. *Cancer Res* **66**, 7276–7284 (2006).
433. Lubrano di Ricco, M. *et al.* Tumor necrosis factor receptor family costimulation increases regulatory T-cell activation and function via NF- $\kappa$ B. *Eur. J. Immunol.* (2020) doi:10.1002/eji.201948393.
434. Salih, H. *et al.* Constitutive Expression of Functional 4-1BB (CD137) Ligand on Carcinoma Cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **165**, 2903–10 (2000).
435. Ali, N. *et al.* Xenogeneic Graft-versus-Host-Disease in NOD-scid IL-2R $\gamma$ null Mice Display a T-Effector Memory Phenotype. *PLoS One* **7**, e44219 (2012).
436. Park, J.-J. *et al.* Expression of anti-HVEM single-chain antibody on tumor cells induces tumor-specific immunity with long-term memory. *Cancer Immunol Immunother* **61**, 203–214 (2012).



437. Morel, Y. *et al.* Reciprocal Expression of the TNF Family Receptor Herpes Virus Entry Mediator and Its Ligand LIGHT on Activated T Cells: LIGHT Down-Regulates Its Own Receptor. *The Journal of Immunology* **165**, 4397–4404 (2000).
438. Murphy, K. M., Nelson, C. A. & Šedý, J. R. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nature Reviews Immunology* **6**, 671 (2006).
439. Lasaro, M. O. *et al.* Active immunotherapy combined with blockade of a coinhibitory pathway achieves regression of large tumor masses in cancer-prone mice. *Mol Ther* **19**, 1727–1736 (2011).
440. Zhang, T., Ye, L., Han, L., He, Q. & Zhu, J. Knockdown of HVEM, a Lymphocyte Regulator Gene, in Ovarian Cancer Cells Increases Sensitivity to Activated T Cells. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics* **24**, 189–196 (2016).
441. Conrad, C. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells. *Cancer Res* **72**, 5240–5249 (2012).
442. Liu, X. *et al.* Plasmacytoid Dendritic Cells and ICOS+ Regulatory T Cells Predict Poor Prognosis in Gastric Cancer: A Pilot Study. *J Cancer* **10**, 6711–6715 (2019).
443. Tiemessen, M. M. *et al.* CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 19446–19451 (2007).
444. Tharmalingam, T. *et al.* Characterization of phenotypic and genotypic diversity in subclones derived from a clonal cell line. *Biotechnol Prog* **34**, 613–623 (2018).
445. Choi, B. K. *et al.* 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4+CD25+ T cells. *J Leukoc Biol* **75**, 785–791 (2004).

446. Madireddi, S. *et al.* Correction: SA-4-1BBL Costimulation Inhibits Conversion of Conventional CD4+ T Cells into CD4+FoxP3+ T Regulatory Cells by Production of IFN- $\gamma$ . *PLOS ONE* **7**, 10.1371/annotation/88b557df (2012).
447. Guillerey, C. *et al.* Chemotherapy followed by anti-CD137 mAb immunotherapy improves disease control in a mouse myeloma model. *JCI Insight* **5**, 125932 (2019).
448. Wang, H. *et al.* CD137 ligand feedback upregulates PD-L1 expression on lung cancer via T cell production of IFN- $\gamma$ . *Thorac Cancer* **10**, 2225–2235 (2019).
449. Wang, Q. *et al.* Analysis of CD137 and CD137L Expression in Human Primary Tumor Tissues. *Croat Med J* **49**, 192–200 (2008).
450. Wu, J. *et al.* TNFSF9 promotes metastasis of pancreatic cancer through Wnt/Snail signaling and M2 polarization of macrophages. *Aging* **13**, 21571–21586 (2021).
451. Kang, S. W. *et al.* Anti-CD137 Suppresses Tumor Growth by Blocking Reverse Signaling by CD137 Ligand. *Cancer Res* **77**, 5989–6000 (2017).
452. Swatler, J. *et al.* 4-1BBL-containing leukemic extracellular vesicles promote immunosuppressive effector regulatory T cells. *Blood Advances* **6**, 1879–1894 (2022).
453. Wu, J. & Wang, Y. Role of TNFSF9 bidirectional signal transduction in antitumor immunotherapy. *European Journal of Pharmacology* **928**, 175097 (2022).
454. Bartkowiak, T. *et al.* Activation of 4-1BB on liver myeloid cells triggers hepatitis via an interleukin-27 dependent pathway. *Clin Cancer Res* **24**, 1138–1151 (2018).
455. Raineri, D. *et al.* Inducible T-Cell Costimulator Ligand Plays a Dual Role in Melanoma Metastasis upon Binding to Osteopontin or Inducible T-Cell Costimulator. *Biomedicines* **10**, 51 (2021).

456. Tronik-Le Roux, D. *et al.* Comprehensive landscape of immune-checkpoints uncovered in clear cell renal cell carcinoma reveals new and emerging therapeutic targets. *Cancer Immunol Immunother* **69**, 1237–1252 (2020).
457. Bitra, A. *et al.* Crystal structure of murine 4-1BB and its interaction with 4-1BBL support a role for galectin-9 in 4-1BB signaling. *J Biol Chem* **293**, 1317–1329 (2018).

---

## **Annexes**

---

# Characterization of a regulatory T cells molecular meta-signature identifies the pro-enkephalin gene as a novel marker in mice

Nicolas Aubert, Benoit L. Salomon, Gilles Marodon

*Preprint*

doi : <https://doi.org/10.1101/638072>

## Abstract:

Regulatory T cells (Treg) are crucial in the proper balance of the immune system. A better characterization of Treg-specific genes should extend our knowledge on their complex biology. However, to date there is no consensual Treg signature in the literature. Here, we extracted a molecular Treg meta-signature relative to CD4<sup>+</sup> conventional T cell from 8 different but comparable publicly available microarray datasets. We confirmed the validity of our result using the much larger but less stringent Immuno-Navigator database. However, many genes of the Treg meta-signature were also expressed at the protein level by other immune cell subsets, as assessed by mass cytometry, with the noticeable exceptions of *Il2ra*, *Ctla4*, and *Tnfrsf9*. Surprisingly, the proenkephalin (*Penk*) gene was a prominent member of this restricted Treg meta-signature. Further analysis of public datasets and of our own RNA sequencing experiments confirms that *Penk* was over expressed by Treg in various murine tissues, including thymic Treg. Interestingly, *Penk* expression was increased in intra tumoral Treg whereas it was down modulated in the central nervous system of mice suffering from EAE. Finally, we propose a mechanistic model linking TNFR signaling and the transcription factor *Batf* in the regulation of *Penk* expression in Treg. Altogether, our results provide the first Treg meta-signature in mice and identifies *Penk* as a novel and unexpected Treg marker.

## Résumé :

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont primordiaux pour le maintien de l'équilibre du système immunitaire. Une meilleure caractérisation des gènes spécifiques des Treg devrait permettre d'accroître les connaissances sur leur biologie. Néanmoins, à ce jour, il n'existe pas de signature consensuelle dans la littérature. Dans le cadre de cette étude, nous avons extrait une méta-signature moléculaire pour les Treg en les comparant aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels à partir de 8 jeux de données de microarray publiés. Nous avons ensuite validé ces résultats avec la base de données Immuno-Navigator. Cependant, nous avons montré par cytométrie de masse que plusieurs gènes de la méta-signature s'avèrent aussi exprimés au niveau protéique par d'autres sous-types cellulaires, à quelques exceptions près, notamment

*Il2ra*, *Ctla4* et *Tnfrsf9*. Étonnamment, le gène de la proenképhaline (*Penk*) faisait partie de la liste des gènes les plus différentiellement exprimés entre Tconv et Treg. Des analyses complémentaires de données publiées et de données générées au sein du laboratoire confirment la surexpression de *Penk* par les Treg de nombreux tissus dont le thymus. De plus, l'expression de *Penk* était augmentée au sein des Treg intratumoraux alors qu'elle était diminuée dans ceux du système nerveux central de souris atteintes d'EAE. Enfin, nous proposons un mécanisme associant la signalisation TNFR et le facteur de transcription Batf dans la régulation de l'expression de *Penk* par les Treg. Nos résultats fournissent la première méta-signature des Treg murins et identifient *Penk* comme un marqueur nouveau et inattendu de Treg.

#### Contribution au projet :

Pour ce projet, j'ai participé à la recherche et la comparaison des jeux de données publiés afin d'établir la liste des gènes différentiellement exprimés entre Tconv et Treg (résultats présentés dans la figure 13A du manuscrit). Par la suite, j'ai vérifié la spécificité de l'expression protéique des gènes identifiés, en conditions physiologique et pathologique (cancer) par cytométrie de masse. Par ailleurs, j'ai aussi validé l'expression de *Penk* dans les Treg, notamment en condition inflammatoire, par cytométrie en flux. Enfin, j'ai mené diverses expériences fonctionnelles pour tenter de déterminer la fonction associée à cette expression, en utilisant des modèles murins déficient pour *Penk* dans le système immunitaire. Ces souris ont été générées à partir de souris immunodéficientes dans lesquelles des moelles de souris *Penk* KO ont été transférées. Les résultats obtenus (non présentés dans le préprint) avec ces modèles étant peu convaincants, nous générons un modèle plus « propre » à partir de souris avec un KO conditionnel de *Penk* dans les Treg. Ces souris seront utilisées pour évaluer le rôle de cette protéine exprimée par les Treg dans divers modèles incluant un modèle de douleur (modèle de constriction du nerf sciatique).

## **Exogenous fucosylation enhances T cell anti-tumor cytotoxicity in vivo**

Audrey Mohr\*, Mustapha Cherai\*, Nicolas Aubert\*, Anne-Elodie Receveur\*, Aness Haddouche, Baptiste Fouquet, Clara Cretet, Mo Atif, Melissa Saichi, Armelle Bohineust, Marie Turret, Derivry Lucille, Sylvain Choquet, Sophie Caillat-Zuckman, Françoise Norol, Robert Balderas, Raj Malhotra, Guy Gorochoy, Gilles Marodon, Makoto Miyara”

*Article en préparation*

### Abstract:

Adoptive cell therapy by CAR T-cells is a major revolution for the treatment of advanced B-cell malignancies. However, its efficacy is limited beyond hematological malignancies. One obstacle for use of CAR-T in solid tumor is the ability for these CAR-T to migrate and home into tumor. CD62-E/CD15s interaction promotes the tethering, rolling of immune blood cells and their transendothelial migration. Moreover, CD62-E is highly expressed on microvascular endothelial cells, especially upon inflammation. We hypothesize that this property could be exploited to enhance CAR T-cells migration and infiltration in solid tumor. In this study, we use *in vitro* exofucosylation by fucosyltransferase 7 (FUT7) to increase CD15s expression on CAR-T cells. First, we confirmed that *in vitro* treatment with FUT7 allowed increased expression of CD15s on immune cells, especially by a subset of CD8<sup>+</sup> T-cell that expressed perforin and IFN $\gamma$ . By grafting FUT7-treated PBMC in humanized mice, we showed that fucosylation was associated with an increased in CD8<sup>+</sup> T-cells infiltration in the tumor. Based on these observations, we evaluated FUT7-treatment of CAR-T-cells in CD19<sup>+</sup> solid tumor model. We showed that the treatment efficiently increased CD15s<sup>+</sup> proportion in CAR-T and this was associated with an increase in CAR-T infiltration and a decreased in tumor growth. Altogether, our results show that *in vitro* exogenous fucosylation enhances T cell anti-tumor cytotoxicity in vivo and that treatment of CAR-T cells with FUT7 might be a good option to increase their efficacy for treatment of solid cancer.

### Résumé :

Les thérapies par transfert adoptif de cellules CAR T sont une révolution dans la prise en charge des tumeurs B. Cependant, leur efficacité est limitée au-delà des cancers hématologiques. Un des obstacles à l'utilisation des CAR-T dans les tumeurs solides est la capacité de ces cellules à migrer dans la tumeur. L'interaction entre CD62-E et CD15s favorise l'attache, le roulement et la migration transendothéliale des cellules immunitaires. De plus, CD62-E est fortement exprimé par les cellules endothéliales des microvaisseaux, particulièrement au cours de l'inflammation. Nous avons émis l'hypothèse que cette propriété pourrait être exploitée pour

promouvoir la migration et l'entrée des CAR T dans les tumeurs solides. Dans cette étude, nous utilisons la fucosyltransférase 7 (FUT7) pour exofucosyler *in vitro* les CAR T et ainsi augmenter l'expression de CD15s. Dans un premier temps, nous avons confirmé que le traitement avec la FUT7 permettait l'augmentation de la proportion de cellules exprimant CD15s, notamment pour un sous-type de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> exprimant de la perforine et de l'IFN $\gamma$ . Après avoir greffé des PBMC traités avec la FUT7 à des souris humanisées, nous avons observé une meilleure infiltration de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans les tumeurs. Sur la base de ces observations, nous avons testé ce traitement sur des CAR T dans un modèle de tumeur solide exprimant CD19. Nous avons montré que le traitement est efficace pour augmenter la proportion de CAR T CD15s<sup>+</sup> et que cela s'associait à une infiltration accrue dans la tumeur et une réduction de la croissance tumorale. L'ensemble des résultats obtenus montrent que l'exofucosylation augmente la réponse antitumorale T cytotoxique et ouvre des perspectives quant à son utilisation pour augmenter l'efficacité des CAR T contre les tumeurs solides.

#### Contribution au projet :

Dans le cadre de ce projet, j'ai réalisé l'ensemble des expérimentations *in vivo* des injections des cellules tumorales et des cellules immunitaires humaines, à l'analyse des résultats, incluant le suivi des croissances tumorales, la préparation des tissus *ex vivo*, le marquage et l'acquisition par cytométrie en flux, le cas échéant. Ces expériences incluent la comparaison de l'efficacité de PBMC ou de CAR-T, exofucosylés *in vitro* ou non, dans le contrôle de la croissance tumorale.



## **Butyrate induces TNF production in human Regulatory T cells**

Mo Atif, Mustapha Cherai, Nicolas Aubert, Clara Cretet, Lynda Aoudjehane, Baptiste Fouquet, Robert Balderas, Filomena Conti, Olivier Scatton, Guy Gorochov, Gilles Marodon, Ye Htun Oo, Makoto Miyara

*Article en préparation*

### Abstract:

Short-chain fatty acids (SCFAs) such as butyrate promote regulatory T (Treg) cells of thymic and peripheral origin. However, Treg cells are phenotypically and functionally heterogeneous entities. In this study, we delineated how butyrate modulated Treg cell heterogeneity via novel mechanisms.

Through combining multimodal single-cell profiling with wet-lab experiments, we found that butyrate polarized the differentiation of naïve Treg cells into heterogeneous subpopulations with both immunosuppressive and pro-inflammatory subsets. Butyrate also acutely inhibited the phosphorylation of STAT5 and p38. These effects coincided with increased secretion of TNF $\alpha$ , IL-2 and IL-17A from the activated Treg cells without affecting their immunosuppressive capacity. These new pro-inflammatory subpopulations were driven by the hypoxia, NF $\kappa$ B, JAK-STAT and TNF $\alpha$  signaling pathways. The regulons driving these processes were GATA3, HIF1A and several STAT proteins.

Collectively, our work demonstrates the capacity of butyrate to promote diverse regulatory and effector cell subpopulations. These novel mechanisms could be exploited to precisely modulate the effects of SCFAs on Treg cells.

### Résumé :

Les acides gras à chaîne courte (AGCC), tels que le butyrate, favorisent les lymphocytes T régulateurs (Treg) d'origine thymique et périphérique. Cependant, les cellules Treg sont des entités phénotypiquement et fonctionnellement hétérogènes. Dans cette étude, nous avons déterminé comment le butyrate modulait l'hétérogénéité des cellules Treg par de nouveaux mécanismes.

En combinant le profilage multimodal de cellules uniques avec des expériences en laboratoire, nous avons découvert que le butyrate polarisait la différenciation des cellules Treg naïves en sous-populations hétérogènes avec des sous-ensembles immunosuppresseurs et pro-inflammatoires. Le butyrate a également inhibé de façon aiguë la phosphorylation de STAT5 et de p38. Ces effets ont coïncidé avec une augmentation de la sécrétion de TNF $\alpha$ , IL-2 et IL-

17A par les cellules Treg activées sans affecter leur capacité immunosuppressive. Ces nouvelles sous-populations pro-inflammatoires étaient dirigées par les voies de signalisation de l'hypoxie, NFκB, JAK-STAT et TNFα. Les régulateurs de ces processus étaient GATA3, HIF1A et plusieurs protéines STAT.

Collectivement, notre travail démontre la capacité du butyrate à promouvoir diverses sous-populations de cellules régulatrices et effectrices. Ces nouveaux mécanismes pourraient être exploités pour moduler précisément les effets des AGCC sur les cellules Treg.

Contribution au projet :

Pour ce projet, j'ai réalisé une expérience supplémentaire visant à déterminer *in vivo*, dans un modèle de GvHD, si l'expansion *in vitro* de Treg humains en présence de butyrate permettait le maintien de leur fonction suppressive.

## Liste des figures

Figure 1 : Les caractéristiques communes des cancers .....	12
Figure 2 : Les trois phases de l'immunoédition tumorale.....	13
Figure 3 : Le cycle immunitaire antitumoral.....	15
Figure 4 : Les interactions immunosuppressives au sein de la tumeur .....	17
Figure 5 : Les mécanismes d'action des Tregs .....	20
Figure 6 : Les différents types de tumeur.....	22
Figure 7 : Impact de l'infiltrat immunitaire sur le pronostic des patients selon le cancer .....	23
Figure 8 : Thérapies qui peuvent affecter le cycle immunitaire antitumoral .....	24
Figure 9 : Les molécules de co-inhibition exprimées par les lymphocytes T et leurs ligands. 38	
Figure 10 : Les mécanismes d'action potentiels des anticorps ciblant CTLA-4.....	40
Figure 11 : Le réseau d'interaction d'HVEM .....	44
Figure 12 : Les différents modes de reconstitution d'un système immunitaire humain en souris humanisée.....	52
Figure 13 : Les lymphocytes T régulateurs murins expriment fortement 4-1BB .....	93
Figure 14 : Génération des clones de MC38 déficient pour 4-1BB-L et contrôle .....	94
Figure 15 : La délétion de 4-1BB-L dans la tumeur améliore le contrôle de la croissance tumorale en souris immunocompétente.....	95

## Liste des tables

Table 1 : Les propriétés immunostimulatrices des agents de chimiothérapie.....	27
Table 2 : Evolution des immunothérapies antitumorales au cours du temps .....	28
Table 3 : Liste des anticorps monoclonaux disposant d'une autorisation de mise sur le marché .....	33
Table 4 : Les récepteurs Fc .....	36
Table 5 : Pronostic associé à l'expression d'HVEM par la tumeur .....	44
Table 6 : Les principales souches de souris immunodéficientes utilisables pour générer des souris humanisées.....	51
Table 7: Avantages et inconvénients des modèles de souris humanisées .....	53

## **Identification de nouvelles cibles potentielles impliquées dans l'immunomodulation tumorale**

### **Résumé :**

L'échappement du cancer au système immunitaire fait intervenir deux mécanismes principaux : une inhibition directe des cellules cytotoxiques par la tumeur et une inhibition indirecte, via la promotion des cellules immunosuppressives (lymphocytes T régulateurs, macrophages M2, MDSC, ...). Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé d'une part, aux mécanismes de suppression directe de la tumeur sur les cellules effectrices via le couple de récepteurs/ligands HVEM/BTLA, et d'autre part, à un mécanisme de suppression indirecte via la stimulation des lymphocytes T régulateurs par la tumeur, dépendante de l'expression d'ICOS-L et de 4-1BB-L, deux ligands dont les récepteurs (ICOS et 4-1BB) sont fortement exprimés par les lymphocytes T régulateurs humains et murins. L'utilisation de lignées tumorales déficientes pour HVEM, ICOS-L, et 4-1BB-L dans des modèles murins syngéniques ou humanisés nous a permis de mettre en évidence l'impact délétère de l'expression de ces molécules sur la réponse immunitaire antitumorale. En effet, malgré des croissances similaires dans des souris immunodéficientes, nous avons observé une réduction significative de la croissance de ces lignées dans des souris immunocompétentes allant jusqu'au rejet total avec une tumeur murine déficiente pour 4-1BB-L. Cette réduction est associée à une augmentation de l'activité des cellules effectrices dans les 3 modèles, et à une diminution de la proportion des cellules suppressives dans le cas d'ICOS-L et de 4-1BB-L. De plus, ce meilleur contrôle est reproduit dans un contexte thérapeutique avec un anticorps murin ciblant la molécule HVEM humaine chez la souris humanisée. Ainsi, nos résultats apportent de nouveaux éléments quant à l'immunomodulation directe et indirecte exercée par la tumeur sur les lymphocytes in situ et ouvrent de nouvelles perspectives dans le traitement des cancers où la forte expression de ces molécules est de mauvais pronostic.

Mots clés : Immunothérapie du cancer – Souris Humanisée – HVEM – 4-1BB-L – ICOS-L – Immunomodulation tumorale

## **Identification of potential new targets involved in tumor immunomodulation**

### **Abstract:**

Tumor immune escape is one of the hallmarks of cancer. This escape involves two main mechanisms: direct inhibition of effector cells by the tumor through the expression of co-inhibitory ligands and promotion of immunosuppressive cells (regulatory T-cells, M2 macrophages, MDSC, ...). In my thesis, I studied both direct tumor suppression mechanisms on effector cells via the HVEM/BTLA couple, and indirect suppression mechanisms through regulatory T cells promotion via ICOS-L and 4-1BB-L, which are both ligands of receptors (ICOS and 4-1BB) highly expressed on human and murine regulatory T-cells. Using tumoral cell lines deficient for HVEM, ICOS-L, and 4-1BB-L in syngenic and humanized mice models, we demonstrate the deleterious impact of the expression of these molecules on the anti-tumor immune response. Indeed, despite similar growths in immunodeficient mice, we observe significant reductions of tumor growth with the deficient cell lines, with complete rejection of murine tumor deficient for 4-1BB-L in half of the mice. This reduction is associated with an increase in effector cell activity in all three models, and a decrease in the proportion of regulatory T cells with the ICOS-L and 4-1BB-L deficient lines. Moreover, this better control is reproduced in a therapeutic context with a murine antibody targeting human HVEM in humanized mice. Thus, our results provide new elements about direct and indirect immunomodulation exerted by the tumor on lymphocytes in situ and open new perspectives in the treatment of cancers in which high expression of these molecules is associated with worse prognosis.

Key words: Cancer immunotherapy – Humanized mice – HVEM – 4-1BB-L – ICOS-L – Tumor Immunomodulation