



**HAL**  
open science

# Effet anti-tumoral du GTN +/- doxorubicine dans le cancer du sein triple négatif: implication du système immunitaire

Nesrine Mabrouk

## ► To cite this version:

Nesrine Mabrouk. Effet anti-tumoral du GTN +/- doxorubicine dans le cancer du sein triple négatif: implication du système immunitaire. Cancer. Université Bourgogne Franche-Comté, 2021. Français. NNT: 2021UBFCI004 . tel-04354968

**HAL Id: tel-04354968**

**<https://theses.hal.science/tel-04354968v1>**

Submitted on 20 Dec 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.

THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE  
PREPAREE AU LABORATOIRE D'IMMUNOLOGIE ET IMMUNOTHERAPIE DES CANCERS

Ecole doctorale n°554

Environnement santé

Doctorat de Sciences Vie

Spécialité Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Par

Nesrine MABROUK

**Effet anti-tumoral du GTN +/- doxorubicine dans le cancer du sein  
triple négatif : implication du système immunitaire**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 30 mars 2021

Composition du jury

Pr. Dominique DELMAS

Dr. Véronique BRAUD

Dr. Marie-Cecile MICHALLET

Dr. Mickael RIALLAND

Dr. Benjamin GIBERT

Pr. Catherine PAUL

Professeur - LNC

Directeur de recherche - IPMC

Chargée de recherche - CRCL

Maitre de conférences - LNC

Chargé de recherche - CRCL

Directeur d'études - LIIC

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE  
PREPAREE AU LABORATOIRE D'IMMUNOLOGIE ET IMMUNOTHERAPIE DES CANCERS

Ecole doctorale n°554

Environnement santé

Doctorat de Sciences Vie

Spécialité Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Par

Nesrine MABROUK

**Effet anti-tumoral du GTN +/- doxorubicine dans le cancer du sein  
triple négatif : implication du système immunitaire**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 30 mars 2021

Composition du jury

Pr. Dominique DELMAS

Dr. Véronique BRAUD

Dr. Marie-Cecile MICHALLET

Dr. Mickael RIALLAND

Dr. Benjamin GIBERT

Pr. Catherine PAUL

Professeur - LNC

Directeur de recherche - IPMC

Chargée de recherche - CRCL

Maitre de conférences - LNC

Chargé de recherche - CRCL

Directeur d'études - LIIC

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

**Titre :** Effet anti-tumoral du GTN +/- doxorubicine dans le cancer du sein triple négatif : implication du système immunitaire

**Mots clés :** Cancer de sein triple négatif (CSTN), glycéryl trinitrate (GTN), S-nitrosylation, métabolisme lipidique

**Résumé :** Le cancer du sein (CS) est une maladie hautement complexe, hétérogène et multifactorielle. Comparé aux autres sous-types, le cancer du sein triple négatif (CSTN) représente l'un des stades les plus avancés de la maladie, et se caractérise par une forte hétérogénéité inter et intra-tumorale et une charge mutationnelle élevée, rendant les traitements très difficiles et inefficaces. L'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone, et l'absence de surexpression du récepteur HER2, fait des chimiothérapies (exemple : la doxorubicine) adjuvantes ou néo adjuvantes, le traitement de référence chez les patients atteints de ce type de cancer. Malheureusement, le taux de réponse anatomopathologique complète en réponse à ces chimiothérapies, dépasse rarement les 50 % avec un bénéfice à long terme qui touche uniquement 30 à 50% des malades. Le laboratoire LIIC dans lequel j'ai effectué ma thèse a comme objectif de montrer qu'un donneur de monoxyde d'azote (NO), le glycéryl trinitrate (GTN), un médicament utilisé en cardiologie, peut améliorer l'efficacité thérapeutique des chimiothérapies anti-cancéreuses. Le but de mon projet de thèse consistait donc à déterminer si l'association du GTN à la doxorubicine pouvait potentialiser l'activité anti-tumorale de cette chimiothérapie dans le CSTN, et de déterminer le mécanisme par lequel cette combinaison agit en mettant l'accent sur le microenvironnement immunitaire en général, et plus particulièrement sur les cellules myéloïdes immunosuppressives, les MDSCs.

Les résultats ont montré que l'association du GTN à la doxorubicine améliorait significativement l'efficacité anti-tumorale de cette dernière, dans un modèle de CSTN induit par l'injection de cellules mammaires 4T1. Cet effet est dû, en partie, à la capacité du GTN à augmenter la différenciation des LT CD4+ vers le sous-type anti-tumoral Th1 et à augmenter le recrutement intra-tumoral des cellules TCD8+/PD-1+ et des G-MDSCs sous-exprimant PD-L1. Cependant, le mécanisme principal par lequel le GTN agit repose essentiellement sur sa capacité à reprogrammer, en présence des ROS, ces G-MDSCs en faveur d'une diminution de leur activité immunosuppressive. En effet, les résultats ont révélé que le GTN, via la S-nitrosylation de STAT5, était capable de moduler le métabolisme lipidique, dépendant de la protéine FATP2 (Fatty Acid Transport Protein 2) de ces cellules. Ainsi une diminution de FATP2, ainsi que de tous les composants faisant partie de la voie de signalisation de cette protéine, en amont (STAT5) et en aval (PGE2), a été observée en réponse au GTN +/- doxorubicine. Tous ces effets étaient inhibés en présence d'un inhibiteur de ROS, la N-acétyl cystéines (NAC). La NAC retardait également considérablement la progression tumorale lorsqu'elle est associée à la combinaison doxorubicine / GTN.

Ce travail, basé sur l'utilisation de deux molécules couramment utilisées en clinique, ouvre sans conteste une nouvelle perspective de traitement pour les patientes atteintes d'un CSTN, et cette combinaison pourra être rapidement proposée aux cliniciens.

**Title:** Antitumor effect of GTN +/- doxorubicin in triple negative breast cancer: involvement of the immune system

**Keywords:** Triple negative breast cancer (TNBC), glyceryl trinitrate (GTN), S-nitrosylation, lipid metabolism

**Abstract:** Breast cancer (BC) is a highly complex, heterogeneous, and multifactorial disease. Compared to other subtypes, triple negative (TNBC) represents one of the most advanced stages of the disease and is characterized by a strong inter- and intra-tumor heterogeneity and a high mutational burden, making treatments very difficult and inefficient. The absence of estrogen and progesterone receptors expression, and the absence of HER2 receptor overexpression, makes chemotherapy (example: doxorubicin), the prior treatment in patients with this type of BC. Unfortunately, the complete anatomopathological response rate, in response to these chemotherapies, rarely exceeds 50% with a long-term benefit affecting only 30 to 50% of patients. The LIIC laboratory in which I did my thesis aims to show that a donor of nitric oxide (NO), the glyceryl trinitrate (GTN), a drug used in cardiology, can improve the therapeutic efficacy of anti-cancerous chemotherapy. The aim of my thesis project was therefore to determine whether the association of GTN with doxorubicin could potentiate the antitumor activity of this chemotherapy in TNBC, and to determine the mechanism by which this combination acts by emphasizing the immune microenvironment in general, and more particularly on immunosuppressive myeloid cells, MDSCs.

The results showed that the association of GTN with doxorubicin significantly improved the anti-tumor efficacy of this chemotherapy, in a TNBC model induced by the injection of 4T1 breast cells. This effect is due, in part, to the ability of GTN to increase the differentiation of CD4<sup>+</sup> TL in the anti-tumor lineage Th1 and to increase the intra-tumor recruitment of TCD8<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup> cells and of G-MDSCs down-expressing PD-L1. Nevertheless, the main mechanism by which GTN acts is essentially based on its ability to reprogram, in the presence of ROS, these G-MDSCs towards a less immunosuppressive phenotype. Indeed, the results revealed that GTN, via the S-nitrosylation of STAT5, was able to modulate the lipid metabolism of these cells, which is dependent on the protein FATP2 (Fatty Acid Transport Protein 2). Thus, a decrease in FATP2, as well as all the upstream (STAT5) and downstream (PGE2) components of this signaling pathway was observed in response to GTN +/- doxorubicin. All of these effects were inhibited in the presence of a ROS inhibitor, the N-acetyl cysteines (NAC). NAC also significantly delayed tumor progression when used in combination with doxorubicin / GTN.

This work, based on the use of two molecules commonly used in the clinic, undoubtedly opens up a new treatment perspective for patients with TNBC, and this combination can quickly be offered to clinicians.

## Sommaire

I.	INTRODUCTION .....	14
1.	LE CANCER.....	14
1.1.	ACTIVATION DES VOIES DE SIGNALISATION PROLIFERATIVES .....	15
1.2.	INSENSIBILITE AUX SIGNAUX ANTIPROLIFERATIFS .....	16
1.3.	RESISTANCE AUX MECANISMES DE MORT CELLULAIRE (APOPTOSE) .....	16
1.4.	INDUCTION DE L'ANGIOGENE.....	17
1.5.	ACQUISITION D'UN PHENOTYPE METASTASIQUE ET INVASIF .....	18
1.6.	PROPRIETE DE SE REPLIQUER INDEFINIMENT.....	18
2.	CANCER DU SEIN .....	20
2.1.	DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES .....	20
2.2.	CLASSIFICATION.....	20
2.3.	CANCER DU SEIN TRIPLE NEGATIF .....	21
2.3.1.	GENERALITES.....	21
2.3.2.	TRAITEMENTS CONVENTIONNELS DES CANCERS DU SEIN TRIPLES NEGATIFS.....	22
2.3.2.1.	LA RADIOTHERAPIE.....	22
2.3.2.2.	LES CHIMIOETHERAPIES STANDARDS .....	23
2.3.2.3.	THERAPIES CIBLEES.....	23
3.	SYSTEME IMMUNITAIRE ET IMMUNOTHERAPIES DANS LE CANCER DU SEIN.....	28
3.1.	MECANISMES D'IMMUNOSURVEILLANCE ET D'IMMUNOSUPPRESSION.....	28
3.1.1.	CELLULES IMPLIQUEES DANS LA PHASE D'ELIMINATION .....	30
3.1.1.1.	ROLE DE L'IMMUNITE ADAPTATIVE : LES LT CD4+ (BALANCE TH1/TH2).....	30
3.1.1.2.	ROLE DE L'IMMUNITE ADAPTATIVE : LES LT CD8+ .....	34
3.1.2.	MOLECULES / CELLULES IMPLIQUEES DANS LA PHASE D'ECHAPPEMENT .....	36
3.1.2.1.	MOLECULES IMMUNOSUPPRESSIVES .....	36
3.1.2.2.	LES POINTS DE CONTROLE NEGATIFS IMMUNITAIRES .....	37
3.1.2.2.1.	GENERALITES.....	37
3.1.2.2.2.	CTLA4 ET PD-1 .....	39
3.1.2.2.3.	LES INHIBITEURS DES POINTS DE CONTROLE NEGATIFS IMMUNITAIRES DANS LE CANCER DU SEIN.....	40
3.1.2.2.3.1.	ANTI-CTLA4 DANS LE CANCER DU SEIN.....	40
3.1.2.2.3.2.	ANTI PD-1/PD-L1 DANS LE CANCER DU SEIN.....	41
3.1.2.3.	CELLULES IMMUNOSUPPRESSIVES .....	43
3.1.2.3.1.	CELLULES T REGULATRICES (TREG) .....	43

3.1.2.3.2.	LES CELLULES MDSCS .....	46
3.1.2.3.2.1.	ORIGINE.....	46
3.1.2.3.2.2.	SOUS-TYPES ET PHENOTYPES .....	47
3.1.2.3.2.3.	RECRUTEMENT ET ACTIVATION.....	51
3.1.2.3.2.4.	MECANISMES D’ACTION DES MDSCS.....	53
3.1.2.3.2.5.	MDSCS ET CANCER .....	59
3.1.3.	LE MONOXYDE D’AZOTE COMME IMMUNOTHERAPIE .....	65
3.1.3.1.	GENERALITES SUR LE NO .....	65
3.1.3.2.	IMPLICATION DU NO DANS LE CANCER .....	66
II.	PROJET DE RECHERCHE .....	72
III.	RESULTATS .....	75
1.	EFFET ANTI-TUMORAL DE LA COMBINAISON DOXORUBICINE / GTN <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> .....	75
2.	MODULATION DU MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE TUMORAL EN REPONSE A LA DOXORUBICINE +/- GTN .....	77
2.1.	AUGMENTATION DE LA POLARISATION TH1 EN REPONSE AU GTN +/- DOXORUBICINE.....	77
2.2.	AUGMENTATION DU TAUX INTRA-TUMORAL DES CELLULES TCD8+/PD-1+ PAR L’ASSOCIATION DOXORUBICINE / GTN .....	81
2.3.	AUGMENTATION DU TAUX INTRA-TUMORAL DE G-MDSCS CORRELEE A LA DIMINUTION DE LEUR ACTIVITE IMMUNOSUPPRESSIVE EN REPONSE A L’ASSOCIATION DOXORUBICINE / GTN.....	85
3.	INHIBITION DE LA VOIE DE SIGNALISATION REGULANT L’ACTIVITE IMMUNOSUPPRESSIVE DES G-MDSC PAR LA COMBINAISON DOXORUBICINE / GTN.....	89
3.1.	DIMINUTION DE LA VOIE DE SIGNALISATION FATP2 EN REPONSE AU GTN +/- DOXORUBICINE..	89
3.2.	ROLE DE LA S-NITROSYLATION DE STAT5 DANS SON CLIVAGE .....	90
IV.	DISCUSSION.....	94
V.	MATERIEL ET METHODES .....	107
1.	MODELES TUMORAUX ET TRAITEMENTS.....	108
2.	LIGNEES CELLULAIRES.....	108
3.	ISOLEMENT DES CELLULES IMMUNITAIRES PRIMAIRES A PARTIR DE SOURIS .....	109
4.	DIFFERENCIATION <i>IN VITRO</i> DES LT CD4+ .....	110
5.	TRAITEMENTS CELLULAIRES .....	111
6.	RT-QPCR.....	111
7.	CYTOMETRIE EN FLUX .....	112
8.	IMMUNOHISTOFLUORESCENCE .....	113
9.	SÉQUENÇAGE DE L'ARN.....	114
10.	BIOTIN SWITCH ASSAY .....	114

11.	WESTERN BLOT .....	115
12.	ANALYSES STATISTIQUES .....	116
VI.	ANNEXES .....	118
VII.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	121
VIII.	PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES .....	155
1.	REVUE 1 : SENESCENCE AND CANCER: ROLE OF NITRIC OXIDE (NO) IN SASP .....	156
2.	REVUE 2 : PROTEIN KINASE INHIBITOR-BASED CANCER THERAPIES: CONSIDERING THE POTENTIAL OF NITRIC OXIDE (NO) TO IMPROVE CANCER TREATMENT .....	157
3.	ARTICLE : TUMOR-DERIVED GRANZYME B-EXPRESSING NEUTROPHILS ACQUIRE ANTITUMOR POTENTIAL AFTER LIPID A TREATMENT .....	158



## Liste des figures

FIGURE 1 : LES DIX ALTERATIONS A L'ORIGINE DE LA TRANSFORMATION TUMORALE DE CELLULES SAINES. .....	14
FIGURE 2 : CLASSIFICATION DES CANCERS DU SEIN EN FONCTION DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS AUX FACTEURS DE CROISSANCE.....	21
FIGURE 3 : PRESENTATION DES TROIS PHASES DE L'IMMUNOSURVEILLANCE OU IMMUNOEDITING (LES 3E) : ELIMINATION, EQUILIBRE, ET ECHAPPEMENT.....	29
FIGURE 4 : POLARISATION DES LT NAÏFS VERS LES DIFFERENTS SOUS-TYPES TCD4+ ET ROLE ANTAGONISTE DES CELLULES TH1 ET TH2 DANS LE CANCER.....	33
FIGURE 5 : MECANISMES D'ACTION DES CELLULES TCD8+.....	35
FIGURE 6 : EXPRESSION DES POINTS DE CONTROLE IMMUNITAIRES NEGATIFS ET LEURS LIGANDS.....	39
FIGURE 7 : MECANISMES D'ACTION DES CELLULES T REGULATRICES (TREG).....	45
FIGURE 8 : ACTIVITE IMMUNOSUPPRESSIVE DES PMN-MDSC DEPENDANTE DE L'EXPRESSION DE FATP2. .....	53
FIGURE 9 : MECANISMES LIES A L'IMMUNOSUPPRESSION INDUITE PAR LES G-MDSCS.....	58
FIGURE 10 : THERAPIES CIBLANT LES MDSCS DANS LE TRAITEMENT DU CANCER.....	64
FIGURE 11 : EFFET ANTI-TUMORAL DE LA COMBINAISON DOXORUBICINE / GTN DANS DEUX MODELES DE CANCER DU SEIN.....	76
FIGURE 12 : MODULATION DE L'INFILTRATION INTRA-TUMORALE PAR LES CELLULES TCD4+ EN REPOSE A LA DOXORUBICINE +/- GTN.....	79
FIGURE 13 : MODULATION DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES TCD4+ EN REPOSE A LA DOXORUBICINE +/- GTN.....	80
FIGURE 14 : IMPLICATION DES CELLULES TCD8+ DANS L'EFFET ANTI-TUMORAL DE LA COMBINAISON DOXORUBICINE / GTN.....	82
FIGURE 15 : IMPLICATION DU COUPLE PD-1/PD-L1 DANS L'EFFET ANTI-TUMORAL DE LA COMBINAISON DOXORUBICINE / GTN.....	84
FIGURE 16 : IMPACT DE LA COMBINAISON DOXORUBICINE / GTN SUR LA COMPOSITION INTRA- TUMORALE EN G-MDSC VS M-MDSC ET L'EXPRESSION DE PD-L1.....	87
FIGURE 17 : IMPACT DE LA COMBINAISON DOXORUBICINE / GTN SUR LE RECRUTEMENT INTRA-TUMORAL ET LE POTENTIEL IMMUNOSUPPRESSIF DES MDSCS.....	88
FIGURE 18 : L'ASSOCIATION DOXORUBICINE / GTN INDUIT UNE INHIBITION DE LA VOIE DE SIGNALISATION FATP2 DANS LES G-MDSC.....	90
FIGURE 19 : MODULATION DE LA VOIE STAT5 EN REPOSE AU GTN ASSOCIE OU NON A LA DOXORUBICINE. .....	92
FIGURE 20 : REPROGRAMMATION DES G-MDSCS EN CELLULES MOINS IMMUNOSUPPRESSIVES EN REPOSE AU GTN.....	106

## Liste des tableaux

TABEAU 1 : MARQUEURS SPECIFIQUES OU EN COMMUN DES M- ET G-MDSCS CHEZ LA SOURIS.....	48
TABEAU 2 : MARQUEURS SPECIFIQUES OU EN COMMUN DES M- ET PMN-MDSCS CHEZ L'HOMME .....	50

## Remerciements

Merci à Messieurs-dames membres du jury pour avoir accepté de juger et présider mon travail de thèse. Je tiens donc à remercier Mesdames **Dr. Marie-Cecile MICHALLET** et **Dr. Véronique BRAUD** d'avoir accepté d'être reportrices de mes travaux, ainsi que Messieurs **Pr. Dominique DELMAS**, **Dr. Mickael RIALLAND** et **Dr. Benjamin GIBERT** d'avoir accepté d'être examinateurs.

Je tiens également à remercier le **Pr. Ali Bettaieb** de m'avoir accueilli dans ton équipe depuis mon stage de Master 1, et pour tout le soutien que tu m'as apporté pendant toutes ces années. Un grand merci pour ta patience et tes conseils pertinents et très enrichissants 😊

Bien sûr, je remercie aussi ma directrice de thèse le **Pr. Catherine PAUL**, pour avoir cru en moi et m'avoir accueilli au sein de ta petite équipe « la Dream Team » depuis mon Master 1. Merci pour ton soutien, ta présence et tes conseils, et surtout de m'avoir supporté pendant toutes ces années ;) Tout ce travail est principalement grâce à toi 😊

Je souhaite également remercier le **Dr. Stéphanie PLENCHETTE** pour ta disponibilité et pour avoir pris le temps pour répondre à toutes mes questions. Merci pour tes précieux conseils en biologie moléculaire 😊

Un grand merci à tous les membres de notre équipe passés et présents (Ali, Catherine, Stéphanie, Véronique, Cindy, Silvia, Sara, Aurélie, Malorie, Nadhir, Arzo, Elaa, Elisia, Lucie, Emma, Margaux, Mathieu et Randa) pour les beaux moments qu'on a passés ensemble, nos pauses café, thé, gâteaux etttttt chocolats. Je me sens très chanceuse de vous avoir rencontré. Vous allez certainement me manquer... 😊

Cindy Cindy, je ne pourrais jamais te remercier autant pour toute l'aide que tu m'as apporté pendant ces années passées ensemble. Merci beaucoup pour la contribution que tu as faite pour la réussite de mon projet de thèse. Merci pour avoir pris le temps de me transmettre, sans hésitation, toutes tes compétences techniques et théoriques. Je te remercie pour tous tes conseils, tes encouragements et d'avoir été toujours présente pour me soutenir, essentiellement pendant cette dernière période. Aujourd'hui tu n'es plus une collègue pour moi, mais une vraie amie 😊

Silviaa, merci d'avoir toujours été disponible pour m'aider, me soutenir, me faire rire mais aussi pour la contribution que tu as apporté à mon projet de thèse. Un grand merci pour avoir été présente cette dernière période à mes coté, pour tous les gâteaux et les pizzas que tu as fait pour nous, et surtout de m'avoir apporté ma petite source de guérison de mes angines « le miel » ;) Je ne regrette vraiment pas de t'avoir connue et de t'avoir eu comme amie, même si cette amitié a commencé avec les horribles expériences de différenciation lymphocytaire LOL. Je te souhaite beaucoup de réussite pour ta thèse et surtout pour la poursuite de ta carrière 😊

Merci Malorie et Aurélie pour votre soutien, votre disponibilité et votre aide précieuse. Je vous souhaite beaucoup de réussite pour ta thèse Malorie et ton diplôme EPHE Aurélie, et surtout pour vos futurs projets professionnels 😊

Je souhaite également remercier François HERMETET et Valentin DERANGERE pour m'avoir aidé et guidé avec les techniques de biologie moléculaire et immunofluorescence. Merci pour votre gentillesse, votre disponibilité et pour tous les conseils techniques précieux que vous m'avez donné 😊

Merci à tous nos collaborateurs, François GHIRINGHELLI, Lotfi CHOUCANE, Shan JINGXUAN, Caroline TRUNTZER, Frédérique VEGAN, Elise BALLOT et Romain BOIDOT

Je souhaite remercier aussi tous les membres des équipes du 3<sup>ème</sup> étage mais également de l'équipe LIPNESS, toute l'équipe du Centre de zootechnie, de la plateforme de cytométrie en flux et de Cellimap pour votre sympathie, votre gentillesse et vos précieux services

Un grand merci va à tous mes amis, essentiellement Esma, Ines, Arzo, Kevin, Safa et Cathaline pour votre présence, gentillesse et soutien 😊

Mes plus profonds remerciements vont à ma famille, mes parents, zio Sergio, mes frères et sœurs, mon beau-frère et Imed MABROUK. Vous venez à la fin des remerciements, mais votre place est certainement au sommet. Sans vous je n'aurais jamais accomplis ce que j'ai pu accomplir et ne serais devenue ce que suis aujourd'hui. Je vous remercie énormément pour toute l'aide que vous m'avez apporté, sans la moindre hésitation, quand j'en avait besoin. J'espère que vous puissiez trouver dans la réalisation de cette thèse l'aboutissement de tous les efforts que vous avez fait tout au long de mon « longg » cursus universitaire 😊

## Liste des abréviations

**ADC** : Antibody Drug Conjugate  
**ADCC** : Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity  
**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique  
**APC** : Antigen Presenting Cells  
**ARN** : Acide RiboNucléique  
**ATP** : Adénosine TriPhosphate  
**ATRA** : All-Trans Retinoic Acid  
**Bcl-2** : B cell lymphoma-2  
**BCL6** : B Cell Lymphoma 6  
**BRCA1** : BReast CAncer 1  
**BTLA4** : B and T cell Lymphocyte Attenuator 4  
**cAMP** : cyclic Adenosine MonoPhosphate  
**CCL** : chemokine (C-C motif) Ligand  
**CD** : Cellules Dendritiques  
**Cdk** : Cycline dependent kinases  
**CK** : CytoKératine  
**CMH** : Complexe Majeur d’Histocompatibilité  
**COX2** : CycloOXygénase 2  
**CTLA4** : Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4  
**CXCL** : chemokine (C-x-C motif) Ligand  
**DAMPs** : Damage Associated Molecular Pattern  
**DMEM** : Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium  
**EDTA** : Éthylène Diamine Tétra-Acétique  
**EGFR** : Epidermal Growth Factor receptor  
**EPCR** : Endothelial Protein C Receptor  
**ERBB** : EGF Receptor family  
**FAD** : Flavine Adénine Dinucléotide  
**FAO** : Fatty Acid Oxidation  
**FATP2** : Fatty Acid Transport Protein 2  
**FDA** : Food and Drug Administration

**FGF** : Fibroblast Growth Factor  
**FLIP** : FLICE-Inhibitory Protein  
**FMN** : Flavine adénine MonoNucléotide  
**Foxp3** : Forkhead box p3  
**GAPDH** : GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase  
**GATA3** : Trans-Acting T cell specific transcription factor  
**G-CSF** : Granulocyte-Colony Stimulating Factor  
**GM-CSF** : Granulocyte / Macrophage-Colony Stimulating Factor  
**GTN** : Glyceryl TriNitrate  
**GTP** : Guanosine TriPhosphate  
**HBSS** : Hank's Balanced Salts Solution  
**HER2** : Human Epidermal Receptor 2  
**HIF-1** : Hypoxia-Inducible Factor-1  
**HMGB1** : High Mobility Group Box 1  
**HSP** : Heats Shock Protein  
**IAPs** : Inhibitors of Apoptosis Proteins  
**ICD** : Immunogenic Cell Death  
**ICOS** : Inducible T-cell COStimulatory  
**IDO** : Indoleamine 2,3-DiOxygenase  
**IFN- $\gamma$**  : InterFeron gamma  
**IGFR** : Insulin-like Growth Factor Receptor  
**iNOS** : inducible Nitric Oxide Synthase  
**iTreg** : induced Treg  
**IRF8** : Interferon Regulatory Factor 8  
**LAG-3** : Lymphocyte Activation protein 3  
**LB** : lymphocytes B  
**lncRNAs** : Long non-coding RNAs  
**LPS** : LipoPolySaccharide  
**LT** : Lymphocytes T  
**MAPK** : Mitogen Activated Protein Kinase  
**M-CSF** : Macrophage-Colony Stimulating Factor  
**MDSCs** : Myeloid-Derived Suppressor Cells

**MET** : MicroEnvironnement Tumorale  
**miRs** : microRNA  
**MMPs** : Matrix MetalloProteinases  
**mTOR** : mammalian Target Of Rapamycin  
**NaCl** : Chlorure de sodium  
**NADPH** : Nicotinamide Adenine Dinucleotide PHosphate  
**NF-kB** : Nuclear Factor-kappa B  
**NH4Cl** : Chlorure d'ammonium  
**NK** : Natural Killer  
**NKT** : Natural Killer T  
**NO** : Nitric Oxide  
**NOX2** : NADPH OXydase 2  
**NRAS** : Neuroblastoma RAS  
**NSCLC** : Non Small Cell Lung Carcinoma  
**nTreg** : natural Treg  
**OS** : overall survival  
**PARP** : Poly (Adénosine diphosphate Ribose) Polymerase  
**PCI** : Points de Contrôle Immunitaires négatifs  
**PD-1** : Programmed cell Death protein-1  
**PDGFR** : Platelet Derived Growth Factor Receptor  
**PD-L1** : Programmed cell Death-Ligand 1  
**PGE2** : ProstaGlandine E2  
**PI3K** : PhosphoInositide 3-Kinase  
**Procr** : PROtein C Receptor  
**PTEN** : Phosphatase and TENsin homolog  
**RA** : récepteurs aux androgènes  
**RB** : RetinoBlastoma  
**RNS** : Reactive Nitrogen Species  
**Rorc** : RAR-related Orphan Receptor gamma  
**RORγT** : Retinoic acid-related orphan receptor gamma t  
**ROS** : Reactive Oxygen Species  
**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute Medium

**sGC** : soluble Guanylate Cyclase

**STAT** : Signal Transducer and Activator of Transcription

**TAA** : Tumor Associated Antigens

**TAM** : Tumor Associated Macrophages

**TAN** : Tumor Associated Neutrophils

**Tbet** : T-box transcription factor TBX21

**TCR** : T Cell Receptor

**Tfh** : T follicular helpers

**TGF- $\beta$**  : Transforming Growth Factor-beta

**TGF- $\beta$ R** : Transforming Growth Factor-beta receptor

**Th1** : T helper 1

**TIGIT** : T cell ImmunoGlobulin and ITIM domain

**TILs** : Tumor Infiltrating Lymphocytes

**Tim-3** : T-cell immunoglobulin mucin domain-3

**TIMP-1** : Tissue Inhibitor matrix MetalloProteinase-1

**TLR** : Toll Like Receptors

**CSTN** : Cancer du Sein Triple Négatif

**TNF** : Tumor Necrosis Factor

**TNFR** : Tumor Necrosis Factor receptor

**TNM** : Tumor, Node, Metastasis

**TRAIL** : Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand

**TRAILR** : Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand receptor

**Treg** : T regulatory cells

**Trop-2** : Trophoblast cell surface antigen-2

**TSP-1** : Thrombo Spondin-1

**VEGFR** : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

**VISTA** : V-domain Ig Suppressor of T cell Activation

# Introduction



## I. Introduction

### 1. Le cancer

Le cancer est une maladie se caractérisant par une prolifération cellulaire exacerbée, au sein d'un tissu normal de l'organisme. Ces cellules tumorales adoptent ainsi un comportement anormal caractérisé par l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs, la résistance à la mort cellulaire par apoptose, la capacité proliférative illimitée, l'induction de l'angiogenèse et l'acquisition d'un phénotype métastatique et invasif (Figure 1, (Hanahan & Weinberg, 2000)). La dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire, la capacité à éviter la destruction par le système immunitaire, l'instabilité génomique et le développement d'un microenvironnement inflammatoire chronique font également partie des dix propriétés qu'acquiert une cellule pour devenir cancéreuse (Figure 1, (Hanahan & Weinberg, 2011)).

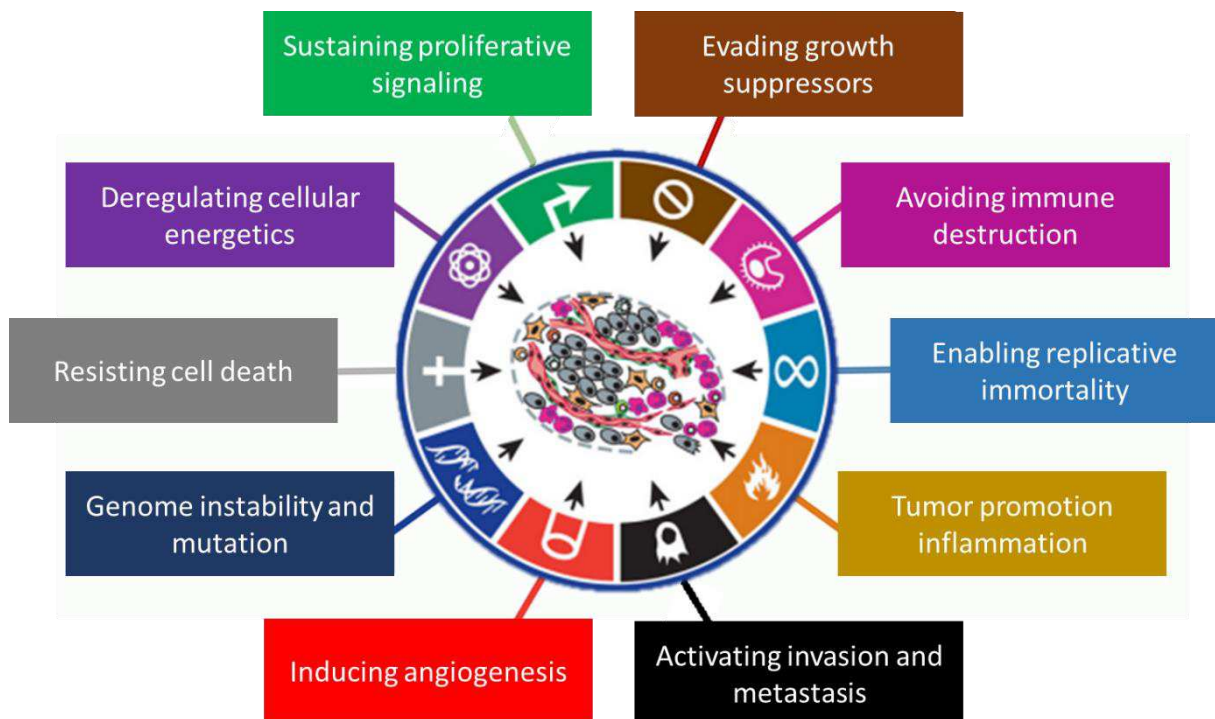


Figure 1 : Les dix altérations à l'origine de la transformation tumorale de cellules saines (Modifié d'après Hanahan et Weinberg., 2011).

### 1.1. Activation des voies de signalisation prolifératives

Lors de l'apparition du cancer, une dérégulation des signaux impliqués dans la croissance et la division cellulaire est observée, ces signaux étant indispensables pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, ainsi que le maintien de l'architecture et du fonctionnement normal des tissus. Cette dérégulation est contrôlée majoritairement par les facteurs de croissance, produits par ces cellules cancéreuses qui, une fois liés à leurs récepteurs, exprimés par les cellules cancéreuses mais également par les cellules normales, activent d'autres voies de signalisation impliquées dans la multiplication, la survie, l'angiogenèse, et le métabolisme énergétique des cellules tumorales (Hanahan & Weinberg, 2011; Hynes & MacDonald, 2009; Lemmon & Schlessinger, 2010; Perona, 2006; Witsch et al., 2010). Des mutations activatrices ciblant certains récepteurs aux facteurs de croissances à activité tyrosine kinase, comme par exemple ERBB (EGFR (Epidermal Growth Factor receptor) family), VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, impliqué dans vascularisation des tumeurs), PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor, impliqué dans la croissance du tissu conjonctif et la cicatrisation), IGFR (Insulin-like Growth Factor Receptor, ayant un rôle anti-apoptotique et pro-mitogène), et TGF- $\beta$ R (TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor-beta) Receptor), ont été retrouvées dans de nombreux cancers dont le cancer du sein, le cancer gastro-intestinal et le cancer de poumons (N. Cheng et al., 2008; Hynes & MacDonald, 2009; Perona, 2006; Wang, 2017). Des mutations activatrices ont été également retrouvées chez des personnes atteintes de mélanomes et qui touchent le gène BRAF et NRAS (Neuroblastoma RAS), une sérine/thréonine kinase responsable de l'activation de la voies RAS-RAF-MEK-MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), mais également le gène c-KIT (Davies & Samuels, 2010). La mutation du gène c-KIT a été retrouvée chez 80% des personnes atteintes d'un cancer gastro-intestinal (Hirota et al., 1998). D'autres voies de signalisation sont touchées par des mutations responsables de la formation et de la progression de cancers, dont la voie PI3K (Phospholinositide 3 Kinase) / AKT, hyperactivée soit directement suite à des mutations touchant sa sous-unité catalytique ou indirectement après inactivation du gène suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) (Davies & Samuels, 2010). Plus de détails peuvent être retrouvés dans la revue (en annexe) où je suis co-première autrice avec Ghione S., et intitulée « Protein kinase inhibitor-based cancer therapies: Considering the potential of nitric oxide to improve cancer treatment » (Ghione et al., 2020).

## 1.2. Insensibilité aux signaux antiprolifératifs

Il existe plusieurs gènes appelés gènes suppresseurs de tumeurs dont le rôle est de limiter la croissance et la prolifération excessive des cellules. Les plus connus sont les gènes codant pour les protéines RB (RetinoBlastoma) et p53. Ces deux dernières jouent un rôle primordial dans la régulation des voies gouvernant l'activation de la prolifération cellulaire, de la sénescence et de l'apoptose (Deshpande et al., 2005; Hanahan & Weinberg, 2011). Une dérégulation de la voies RB ou p53 est à l'origine d'une hyper-activation du cycle cellulaire et donc d'une prolifération illimitée des cellules et de l'apparition d'un cancer (Burkhart & Sage, 2008; Fiorentino et al., 2013; Ghebranious & Donehower, 1998; Hanahan & Weinberg, 2011). Outre l'inactivation de RB, sont également retrouvés la perte de la régulation du facteur de transcription E2F, la dérégulation de l'expression des cyclines E1 et E2, et l'hyperactivation aberrante de la famille des kinases dépendants des cyclines (Cdk (Cycline dependent kinases)) 4 et/ou 6. Ces modifications des Cdk peuvent se faire suite à l'expression dérégulée de la cycline de type D, ou la perte d'un des membres de la famille INK4 (exemple : p16INK4a) impliqué dans la différenciation cellulaire, ou la signalisation dérégulée du TGF- $\beta$ , ou encore l'insensibilité aux effets inhibiteurs de p16INK4a (Deshpande et al., 2005).

## 1.3. Résistance aux mécanismes de mort cellulaire (apoptose)

La mort cellulaire programmée par apoptose est un mécanisme naturel déclenché en réponse à divers stress physiologiques ou pathologiques. Ces stress peuvent être internes, comme par exemple l'augmentation de la signalisation d'oncogènes, les dommages à l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) (Hanahan & Weinberg, 2011; Wong, 2011), l'hypoxie, lors de maladies cardiaques (infarctus du myocarde) ou neurodégénératives (Alzheimer ou Parkinson) ; ou externes, comme par exemple lors de l'utilisation de chimiothérapies anti-cancéreuses ou de radiothérapie (Wong, 2011). En effet, deux voies majeures coopèrent afin de déclencher l'apoptose. Il s'agit de la voie extrinsèque (récepteurs de mort) réceptionnant et traitant les signaux extracellulaires, par exemple la voie Fas/FasL, TRAIL (TNF (Tumor Necrosis Factor) Related Apoptosis Inducing Ligand) / TRAILR (TRAIL receptor), et TNF / TNFR (TNF receptor) ; et de la voie intrinsèque (ou mitochondriale) détectant et traitant les signaux d'origine intracellulaire comme par exemple les dommages génétiques, l'hypoxie, le stress oxydatif ... Le but final de ces deux voies consiste à l'activation des caspases initiatrices (caspases 8 et 9)

permettant l'activation d'une cascade de protéolyse impliquant des caspases effectrices (caspase 3 ...) responsables de la phase d'exécution de l'apoptose (Hanahan & Weinberg, 2011; Wong, 2011). Lorsque l'apoptose est altérée, un développement de cancer ainsi qu'une résistance aux chimiothérapies peuvent être observés. Cette altération pourrait être le résultat d'une dérégulation de la balance des protéines pro et anti-apoptotiques telles que les membres de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), de la mutation de p53 ou de la dérégulation de l'expression des IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins). Elle peut également être due à la diminution de l'activité des caspases (caspase 3, 8, 9, et 10) ou à l'altération de la signalisation induite par les récepteurs de morts (diminution de l'expression des récepteurs de mort ou des signaux de mort, expression de récepteurs de mort dépourvus de leur domaine de mort) (Adams & Cory, 2007; Wong, 2011).

#### 1.4. Induction de l'angiogenèse

Tout comme les cellules normales, pour survivre, les cellules tumorales ont besoin de nutriments, d'oxygène et de métabolites, mais également d'éliminer le dioxyde d'oxygène et les déchets métaboliques. C'est ainsi qu'intervient la vascularisation sanguine induite via le processus d'angiogenèse. Ce dernier joue un rôle primordial dans la formation continue de nouveaux vaisseaux sanguins au sein de la tumeur, et aidant à soutenir la survie, la croissance et la progression tumorale mais également l'invasion et la formation de métastases (Hanahan & Folkman, 1996; Jiang et al., 2020; Li et al., 2019). Il a été montré que ce processus de néo-vascularisation est régi par plusieurs protéines, exprimées par les cellules cancéreuses, qui en se liant à leurs récepteurs, exprimés par les cellules endothéliales, activent (VEGF-A et FGF (Fibroblast Growth Factor)) ou inhibent (TSP-1 (Thrombospondin-1), l'angiostatine, le platelet factor-4 et l'IFN $\alpha/\beta$  (InterFeron alfa / beta)) les voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse (Baeriswyl & Christofori, 2009; Ferrara, 2009; Hanahan & Folkman, 1996; Kazerounian et al., 2008; Roudnicky et al., 2018).

### 1.5. Acquisition d'un phénotype métastatique et invasif

Les stades les plus avancés et agressifs du cancer se caractérisent par une augmentation de l'invasion des cellules cancéreuses et de la formation de métastases. Ces mécanismes se caractérisent par des altérations touchant la forme des cellules cancéreuses, mais également leurs capacités de liaison avec les autres cellules néoplasiques et la matrice extracellulaire. Une diminution de l'expression de la E-cadhérine (protéine impliquée dans l'adhésion intercellulaire) a été mise en évidence comme étant le mécanisme majeur lié à la formation des métastases. Cette diminution peut être due à plusieurs altérations se produisant au sein des tumeurs, par exemple, l'apparition de mutations, l'augmentation de la méthylation de certains promoteurs, et l'induction de certains répresseurs transcriptionnels (Snail and ZEB) (Berx & van Roy, 2009; Hanahan & Weinberg, 2011). D'autres cadhérine sont également impliquées dans le processus métastatique, comme par exemple la N-cadhérine (jouant un rôle dans migration des neurones et des cellules mésenchymateuses durant l'organogenèse) et la P-cadhérine qui ont été retrouvées surexprimées dans de nombreux cancers invasifs dont le cancer du sein, du pancréas et de la prostate (Berx & van Roy, 2009; Cavallaro & Christofori, 2004). C'est suite à certains stress que les cellules cancéreuses subissent des changements phénotypiques afin d'acquérir le phénotype mésenchymateux. Ainsi, grâce au système vasculaire sanguin et lymphatique, les cellules cancéreuses rejoignent leurs organes métastatiques tels que les ganglions lymphatiques, le foie, les poumons, la moelle osseuse et le cerveaux (Suhail et al., 2019). Le processus de migration tumorale, commence par une invasion locale suivie par une étape d'intravasation dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques et fini par l'extravasation vers le parenchyme des tissus éloignés, la formation de petits nodules de tumeurs et la colonisation des nouveaux tissus (Hanahan & Weinberg, 2011; Talmadge & Fidler, 2010).

### 1.6. Propriété de se répliquer indéfiniment

De nombreux travaux ont montré que les cellules expriment un programme intrinsèque leur permettant de limiter leur multiplication, c'est ce qu'on appelle « la sénescence ». Ce processus a été découvert par Hayflick *et al.*, et Wright et Coll., qui ont montré que les cellules en culture avaient un potentiel de réplication défini, et cessaient de proliférer après un certain nombre de doublement. De plus, ils ont trouvé que l'inhibition des protéines suppresseurs de tumeurs

RB et p53 permet de contourner ce mécanisme de sénescence, et ainsi de rendre ces cellules « immortelles » (Hayflick, 1997; Wright et al., 1989). L'acquisition de cette propriété de réplication infinie par les cellules tumorales, est essentiellement due au maintien de la longueur des télomères des cellules. Il s'agit de structures retrouvées aux extrémités des chromosomes eucaryotes et ayant pour rôle de les protéger contre la dégradation ou la fusion avec d'autres extrémités. Le mécanisme majeur responsable du maintien de ces télomères provient de la réexpression de la télomérase, enzyme qui permet l'ajout de répétitions hexanucléotidiques « TTAGGG » sur les télomères (Bryan et al., 1995). Plusieurs autres mécanismes ont été décrit par la suite, dont celui reposant sur les échanges inter-chromosomiques basés sur la recombinaison d'informations génétique (Bryan & Cech, 1999). Le but ultime de ces mécanismes est le maintien des télomères à des longueurs supérieures au seuil critique et suffisant pour permettre une multiplication illimitée des cellules descendantes. La sénescence, tout comme l'apoptose, représente un mécanisme de défense des cellules les rendant incapables de proliférer indéfiniment. Le contournement de ce processus de sénescence représente donc une stratégie thérapeutique essentielle dans l'inhibition de la croissance tumorale. Toutes ces avancées ont permis la mise en place de plusieurs traitements ciblant ce mécanisme dans le traitement des patients atteints d'un cancer, et qui a fait l'objet d'une revue où je suis co-première autrice avec Ghione S., et intitulée « Senescence and Cancer: Role of Nitric Oxide (NO) in SASP » (Mabrouk et al., 2020).

Les caractéristiques qu'acquiert une cellule pour devenir tumorales ont été mises à jour en 2011, par Hanahan et Weinberg qui ont rajouté 4 autres caractéristiques aux six définies ci-dessus (**Figure 1**). Pendant ma thèse je me suis spécialement focalisée sur l'étude d'une de ces dernières caractéristiques « l'échappement au système immunitaire », que j'ai largement détaillé dans la partie 3.1., et sur la compréhension de son implication dans l'apparition et la résistance aux traitements du cancer du sein.

## 2. Cancer du sein

### 2.1. Données épidémiologiques

En 2018, le nombre de nouveaux cas de cancer en France métropolitaine a été estimé à 382 000 dont 54% chez l'homme. Le cancer du sein (CS), avec environ 58 459 nouveaux cas par an, reste de loin le cancer le plus fréquent et la première cause de décès par cancer chez la femme, devant les cancers du côlon-rectum et du poumon (santé publique France, 2018\*). Le plus souvent il touche des femmes âgées de 50 ans et plus, mais il peut aussi apparaître chez les hommes avec une fréquence extrêmement rare (1% des cancers du sein) (institut national du cancer\*\*).

### 2.2. Classification

La classification standard des cancers passe par l'utilisation du modèle TNM (Tumor, Node, Metastasis), cependant dans le cas du cancer du sein, une nouvelle classification reposant sur les modifications d'expression génique a été développée en 2000 et mise à jour en 2001, et a permis de classer ces cancers en quatre puis en cinq sous-types cliniquement et biologiquement pertinents, respectivement. Les sous types Luminal A (génome stable) et luminal B (génome instable) sont positifs pour l'expression des récepteurs aux œstrogènes (RO+) et présentent une forte similarité de leur profil d'expression avec les cellules luminales de l'épithélium mammaires. Les trois autres sous-types regroupent les tumeurs négatives pour l'expression des RO (RO-) mais pouvant être du sous-type normal-like, ou exprimer le récepteur HER2 (HER2 (Human Epidermal Receptor 2)), ou alors être du sous-type basal, sous type auquel les tumeurs triples négatives (TN) sont apparentées (Perou et al., 2000; Sørli et al., 2001) (**Figure 2**). A la différence des autres sous-types de cancer du sein, les sous-types HER2+ et TN représentent les stades les plus avancés du cancer du sein, en présentant une forte hétérogénéité inter et intra-tumorale (Lyons & Traina, 2019; Roulot et al., 2016).

\* <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers/cancer-du-sein>

\*\* <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Quelques-chiffres>

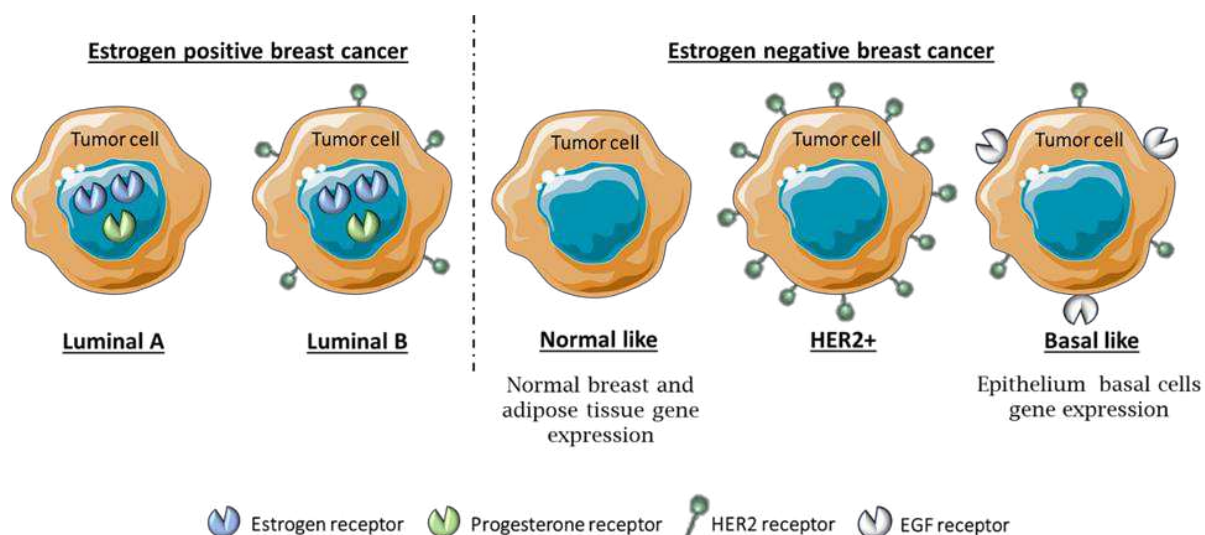


Figure 2 : Classification des cancers du sein en fonction de l'expression des récepteurs aux facteurs de croissance.

## 2.3. Cancer du sein triple négatif

### 2.3.1. Généralités

Les CSTN, bien qu'apparentés au sous-type basal, représentent une entité beaucoup plus hétérogène que les tumeurs basales. La dénomination « basale » vient de la grande ressemblance, au niveau de l'expression génique, de ces cellules avec les cellules myoépithéliales mammaires présentes au niveau de la couche basale de l'épithélium canalaire. On parle ainsi des gènes codant pour la cytokératine (CK5, 14 et 17), et des marqueurs musculaires lisses (P-cadhérine, cavéoline 1, CD10 et  $\beta$ 4-intégrines). Le CSTN peut à son tour être classifié en plusieurs sous-types ayant une sensibilité aux traitements et un pronostic différent. En effet, une analyse génomique réalisée par Lehman et ses collaborateurs a permis d'identifier 6 sous-types, présentant des ontologies et des expressions géniques qui leur sont uniques, incluant les basals like 1 et 2, les immunomodulatory, le mesenchymal, le mesenchymal stem-like et le luminal androgen receptor (Lehmann et al., 2011). D'un point de vue immuno-histochimique, les CSTN sont définis par l'absence d'expression des récepteurs associés à la prolifération, dont les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone (RP), et par l'absence de surexpression d'HER2. Ce sous-type de cancer du sein représente 7 à 15% des cancers du sein toute population confondue (Gonçalves et al., 2013). L'absence d'expression des récepteurs aux hormones, la forte induction de métastases ainsi que la forte hétérogénéité détectée au sein de ce type de cancer, le rends très agressif et très difficile à traiter (Lyons &



Traina, 2019). En effet, il n'existe pas de cibles thérapeutiques bien définies pour ce type de cancer (Lehmann et al., 2011). Les thérapies endocriniennes (traitements des sous-types luminaux) ainsi que celles ciblant le récepteur HER2 (trastuzumab, traitements du sous-type HER2+) (Harbeck & Gnant, 2017) ne pouvant pas être utilisées, les traitements se basent essentiellement sur la chirurgie en association ou non avec de la radiothérapie et / ou de la chimiothérapie néoadjuvante (avant exérèse) ou adjuvante (simultanément).

### 2.3.2. Traitements conventionnels des cancers du sein triples négatifs

#### 2.3.2.1. La Radiothérapie

La radiothérapie a pour but d'induire, de façon irréversible, des cassures dans l'ADN, conduisant à la mort ou à la sénescence des cellules tumorales irradiées (W. D. Yu et al., 2019). Cette thérapie est couramment associée à l'exérèse, à la chimiothérapie et / ou à l'immunothérapie, et permet de potentialiser l'efficacité anti-tumorale de ces dernières, avec des effets favorables sur la régression tumorale locale allant jusqu'à la guérison des patients, et aussi sur la survie à long terme (Aupérin et al., 2010; Crabtree et al., 2010; Grills et al., 2010; Onishi et al., 2011). Ces effets peuvent être liés à la capacité des rayons ionisants à induire ou renforcer l'immunité anti-tumorale et / ou à induire la mort cellulaire immunogène (ICD (Immunogenic Cell Death)). En effet, la radiothérapie, via sa capacité à induire la sécrétion d'un grand nombre de molécules telles que les antigènes associés aux tumeurs (TAA (Tumor Associated Antigens)), les molécules immunogéniques (ex : calréticuline), et des DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern) tels que les HSP (Heat Shock Proteins), les nucléotides, l'HMGB1 (High Mobility Group Box 1), l'acide urique, les protéines S100 et l'ATP (Adenosine TriPhosphate), permet l'activation des réponses immunitaires innées et adaptatives. Ces TAA vont être reconnus, capturés et présentés par les CD (Cellules Dendritiques) aux cellules T. Les DAMPs, quant à eux vont être reconnus par les TLR (Toll Like Receptors) et facilitent ainsi la présentation des TAA aux LTs (Lymphocytes T) et l'activation de ces cellules immunitaires (Demaria et al., 2005; Foell et al., 2007; Friedman, 2002; Golden et al., 2012; Hernandez et al., 2016; Ma et al., 2011; Takeshima et al., 2010; Wirsdörfer et al., 2018; W. D. Yu et al., 2019). La radiothérapie augmente également l'expression, par les cellules du MET (MicroEnvironnement Tumorale), d'autres molécules immunomodulatrices telles que les molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), les molécules de costimulation ou d'adhésion, les

récepteurs de mort, les cytokines et les médiateurs inflammatoires, (Friedman, 2002). Cette thérapie occupe une place essentielle dans le traitement locorégional du cancer du sein et permet de diminuer de 70 % le risque de récurrence locale après une chirurgie (Correa et al., 2010; Cutuli et al., 2014).

#### 2.3.2.2. Les chimiothérapies standards

Les chimiothérapies anticancéreuses utilisées dans le traitement des cancers du sein, appartiennent principalement aux familles des anthracyclines et des taxanes (Harbeck & Gnant, 2017). Le mode d'action des anthracyclines (exemple : doxorubicine) passe par leurs capacités à induire des coupures de l'ADN suite à une inhibition de l'activité de la topoisomérase II, et à s'intercaler entre les deux brins d'ADN afin de stabiliser les complexes ADN / topoisomérase II. Toutes ces modifications conduisent à la mort cellulaire par apoptose. Elles peuvent également agir via la production de radicaux libres responsables de l'induction de dommages à l'ADN ou encore la peroxydation des lipides (Gewirtz, 1999). En revanche, l'action anti-tumorale des taxanes (paclitaxel, docétaxel) vient de leurs capacités à se lier à la tubuline, favorisant sa polymérisation en microtubules. Cette fixation stabilise les microtubules empêchant ainsi sa dépolymérisation, ce qui conduit à l'interruption de la mitose et de la réplication cellulaire (Long & Fairchild, 1994; Schiff et al., 1979; Schiff & Horwitz, 1980). Malgré l'utilisation des taxanes et des anthracyclines, bien qu'assez efficaces dans les cancers mammaires, le taux de réponse anatomopathologique complète reste faible dans ce type de cancer (39%) (Bergin & Loi, 2019). De plus, les patients qui sont à un stade avancé de la maladie et présentant des métastases, deviennent très résistants à la chimiothérapie avec une médiane de survie globale allant jusqu'à 8-13 mois (Voorwerk et al., 2019), d'où la nécessité d'utiliser de nouvelles thérapies ou association thérapeutiques dans le traitement de ces cancers.

#### 2.3.2.3. Thérapies ciblées

De nombreuses études cliniques sont menées actuellement afin de tester de nombreuses cibles potentielles dans le CSTN, dont celles ciblant l'enzyme PARP (Poly (Adénosine diphosphate Ribose) Polymerase), les points de contrôle immunitaires négatifs (PCI), le récepteur aux androgènes, la voie AKT, ou encore celles utilisant des Anticorps (Acs) conjugués à des médicaments (ADC (Antibody Drug Conjugate)) (Lyons, 2019; Lyons & Traina, 2019).

❖ Inhibiteurs de PARP : la cible clinique la plus intéressante dans le traitement des cancers TN présentant des mutations de BRCA (BREast CAncer) 1 ou 2 est la PARP. Il s'agit d'une enzyme impliquée dans la réparation des cassures de l'ADN simple brin (Lehmann et al., 2011; Lyons & Traina, 2019). BRCA1 est un gène suppresseur de tumeur, qui est impliqué dans la réparation des cassures d'ADN double brin et jouant ainsi un rôle important dans le maintien de la stabilité de l'ADN. Des études *in-vitro*, mais également précliniques, ont montré que des lignées tumorales dépourvues de BRCA1 et/ou 2 sont plus sensibles aux inhibiteurs de PARPs, entraînant l'arrêt du cycle cellulaire et la mort par apoptose des cellules tumorales (Bryant et al., 2005; Evers et al., 2008; H. Farmer et al., 2005). L'association de AZD2281 (inhibiteur de PARP) à une chimiothérapie induisant des dommages à l'ADN (le cisplatine) dans le cancer du sein TN déficient en BRCA2, a aussi montré une potentialisation de l'efficacité anti-tumorale de cet inhibiteur de PARP avec des résultats assez promoteurs (Evers et al., 2008). Plusieurs autres inhibiteurs de PARP ont été synthétisés suite à ces études précliniques, comme l'olaparib, le veliparib, le niraparib, le rucaparib et le talazoparib (Lyons & Traina, 2019). Ces derniers ont été aussi testés dans plusieurs essais cliniques chez les patientes atteintes d'un CS métastatique afin d'évaluer leur innocuité et efficacité thérapeutique. Citons à titre d'exemple l'essai clinique de phase II réalisé par Tutt *et al.*, dans lequel ils ont évalué l'efficacité de l'olaparib, sur une cohorte de patientes atteintes de cancer du sein métastatique présentant des mutations de BRCA1 et 2. Les résultats montraient un taux de réponse objective de 41% avec une survie sans progression de 5,7 mois chez les patientes ayant reçu une forte dose d'olaparib (400 mg) (Tutt et al., 2010). Une autre étude récente appelée « EMBRACA » a testé le talazoparib en monothérapie dans un essai clinique de phase III, chez des patientes atteintes d'un cancer du sein avancé portant les mutations de BRCA 1 et 2 et recevant soit du talazoparib soit une chimiothérapie standard (capecitabine, eribulin, gemcitabine, or vinorelbine). Les résultats obtenus étaient également positifs avec une médiane de survie sans progression de 8,6 mois pour les patientes ayant reçu du talazoparib vs 5,6 mois pour celles recevant le traitement standard. Ces résultats ont permis de faire approuver cette thérapie par la FDA (Food and Drug Administration) dans le traitement de ce type de cancer (Litton et al., 2018). Un autre essai clinique de phase III identique au précédent mais utilisant comme inhibiteur de PARP l'oraparib, a montré une médiane de survie sans progression de 7 mois et un taux de réponse de 59,9% pour les patientes ayant reçu l'olaparib vs 4,2 mois et 28,8% pour celles recevant la chimiothérapie standard (Robson et al., 2017).

❖ Inhibiteurs des PCIs : cette partie sera développée dans la partie 3.1.2.2.

❖ Inhibiteurs des récepteurs aux androgènes (RA) : plusieurs anti-androgènes ont été testés dans des études pré-cliniques et cliniques (phases II) dans le CSTN, comme le bicalutamide (inhibiteur compétitif des RA), l'enzalutamide (antagoniste au RA), l'abiraterone acetate (inhibiteur sélectif des enzymes, 17 $\alpha$ -hydroxylase et c17, 20-lyase, responsables de la biosynthèse des androgènes) et le seviteronel (VT-464, antagoniste aux RA) (Lyons & Traina, 2019). Les résultats de ces différentes études étaient assez promoteurs comme le montre, par exemple, l'essai clinique de phase II réalisé sur des patientes atteintes d'un cancer de sein RO- / RP- / AR+. L'utilisation du bicalutamide sur cette cohorte de patientes a montré une médiane de survie sans progression allant jusqu'à 12 semaines avec une toxicité très faible (Gucalp et al., 2013). La découverte de ces thérapies a été mise en évidence suite à l'identification d'un nouveau groupe de cancer du sein par l'équipe de Farmer *et al.*, en 2005. Ce groupe de tumeurs mammaires présentait une augmentation de la signalisation dû aux androgènes. Ces observations leur ont permis de reclasser les cancers du sein en trois groupes : le luminaire (RO+ RA+), le basale (RO- RA-) et l'apocrine moléculaire (RO- RA+) (P. Farmer et al., 2005). D'autres études sont en faveur de la création de ce nouveau sous-groupe, comme l'étude de Doane *et al.*, mettant en évidence l'identification d'une nouvelle sous-population de cancer de sein négative pour les deux récepteurs RO et RP mais ayant une prolifération accrue en réponse aux androgènes. Ces récepteurs aux androgènes apparaissent donc comme une nouvelle cible thérapeutique (Doane et al., 2006).

❖ Inhibiteurs de la voie AKT : comme discuté précédemment, la grande instabilité génomique du CSTN, se traduit par des altérations du nombre de copies de gènes, des pertes d'hétérozygotie ou encore des mutations somatiques aboutissant à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (ex : p53, Rb, PTEN) ou à l'activation d'oncogènes (ex : PIK3CA) (Adélaïde et al., 2007). Concernant les oncogènes, il est connu que des gènes tels que ceux codant pour les protéines PIK3CA ou AKT1, sont fréquemment retrouvés mutés (mutations activatrices) chez les patientes atteintes de CSTN. L'activation de cette enzyme (PIK3CA) et de la signalisation AKT peut être aussi le résultat de la perte d'expression de la phosphatase PTEN. C'est suite à ces altérations qu'une hyper-activation de la voie PI3K / AKT / mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) peut être retrouvée dans certains sous-types de cancer du sein, dont le TN (25 à 30%), et associée à un mauvais pronostic (Gonçalves et al., 2013; Lyons & Traina, 2019; Verret et al., 2019). L'utilisation des inhibiteurs d'AKT représente donc une option

thérapeutique prometteuse dans le traitement de ces cancers. L'ipatasertib, un inhibiteur sélectif d'AKT, ciblant sa forme phosphorylée (pAKT), est le premier inhibiteur produit. Il a été testé dans un essai clinique de phase I, et a montré des résultats plutôt encourageant avec une forte inhibition de la voie AKT et de faibles effets secondaires (Saura et al., 2017). Un essai clinique de phase II a récemment été réalisé en utilisant un autre inhibiteur d'AKT, le capivasertib, en combinaison avec le paclitaxel chez des patientes atteintes d'un CSTN et a montré des résultats assez encourageants avec une survie sans progression (5,9 vs 4,2 mois) et une survie globale (19,1 vs 12,6 mois) nettement plus longues lorsque le paclitaxel est associé au capivasertib (Schmid, Abraham, et al., 2020). Outre l'inhibition d'AKT, d'autres thérapies ciblant d'autres composantes de cette voie de signalisation sont en cours de développement et d'essai pour le traitement des CSTN, tels que celles utilisant des inhibiteurs de mTOR (everolimus) ou de PI3K (buparlisib) seuls ou combinés (Ellis & Ma, 2019; Pascual & Turner, 2019). Citons à titre d'exemple les deux essais cliniques de phase II (NCT01790932 et NCT01629615), utilisant le buparlisib dans le traitement des patientes atteintes d'un CSTN, bien qu'aucun résultat n'ait été publié à ce jour. Concernant l'inhibiteur de mTOR, l'everolimus, une étude a montré que ce traitement induit une diminution de la croissance tumorale de plus de 50% dans 7 cas sur 15 de xénogreffes dérivées de patientes atteintes d'un CSTN (Hattem et al., 2016).

❖ ADC : l'utilisation de ces Acs conjugués à un agent cytotoxique permet de cibler les cellules cancéreuses et ainsi induire une inhibition de la croissance tumorale. Actuellement, le seul ADC approuvé par la FDA dans les cancers du sein est l'ado-trastuzumab emtansine (T-DMI) qui est utilisé dans le traitement des sous-types HER2+ (Ellis & Ma, 2019). Cependant, plusieurs autres ADCs sont en cours d'étude avec des résultats très encourageants. On trouve par exemple, le sacituzumab govitecan, le ladiratuzumab vedotin et le trastuzumab deruxtecan (DS-8201a) (Lyons & Traina, 2019). Le sacituzumab govitecan (IMMU-132), est un ADC dirigé contre les cellules exprimant Trop-2 (Trophoblast cell surface antigen-2) et délivrant le SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin), un inhibiteur de la topoisomérase I. Un essai clinique de phase I / II, a montré une activité anti-cancéreuse assez prometteuse de cet ADC dans le traitement des patientes atteintes d'un CSTN métastatique, avec un taux de réponse allant jusqu'à 30% (Lyons & Traina, 2019; Weiss et al., 2019).

❖ D'autres thérapies sont en cours d'essai comme celles ciblant le récepteur au facteur de croissance épidermique EGFR. Ce récepteur étant fréquemment surexprimé dans le sous-type TN du cancer du sein. Ainsi, un essai clinique de phase II regroupant 102 patientes atteintes d'un CSTN métastatique, a été réalisé en combinant un Ac dirigé contre EGFR (cetuximab) avec une chimiothérapie (carboplatine). Seuls 20 % des patientes ont démontré une réponse positive à cette association thérapeutique (Carey et al., 2012).

Une autre étude très récente a permis d'identifier un nouveau biomarqueur permettant de classer les CSTN. Il s'agit du marqueur de surface des cellules souches mammaires, le récepteur à la protéine C (PROCR (PROtein C Receptor), cible de wnt), aussi connu sous le nom de récepteur à la protéine C endothéliale (EPCR (Endothelial Protein C Receptor)). Ce récepteur a été retrouvé dans 50% des cancers TN (les tumeurs wnt1 basal like) et a été associé à un mauvais pronostic. Ces chercheurs ont trouvé que l'inhibition de ce récepteur avec un nano-Ac, un anticorps monodomaine ciblant le domaine extracellulaire de Procr et bloquant son interaction avec son ligand, la protéine C, diminuait significativement la croissance tumorale dans le sous-type TN du CS (D. Wang et al., 2019). Plusieurs autres molécules peuvent également être ciblées et ont été montrées comme étant des potentielles cibles thérapeutiques dans le CSTN, incluant VEGFR et d'autres récepteurs ou protéines à activité tyrosines kinases (Burstein et al., 2008), les phosphatases, les protéases, les miRs (microARN (acide ribonucléique)) et les ARN longs non codants (lncRNAs (Long non-coding RNAs)) (Nagini, 2017).

Malgré toutes ces avancées, ce cancer reste encore compliqué à traiter vu l'hétérogénéité de ce sous-type tumoral et particulièrement la capacité de ces cellules à échapper au système immunitaire.

### 3. Système immunitaire et immunothérapies dans le cancer du sein

#### 3.1. Mécanismes d'immunosurveillance et d'immunosuppression

Ces deux dernières décennies, il a été montré que le système immunitaire peut à la fois empêcher la formation des tumeurs à un stade précoce, et favoriser leur progression au stade plus tardif. En effet, c'est suite à une inefficacité des défenses immunitaires que le cancer peut se développer. Lors de la progression tumorale, la tumeur met en place des mécanismes d'échappement lui permettant de croître à l'insu du système immunitaire. Ce processus est appelé immunoediting ou immunosuppression qui, sous sa forme la plus complexe, se déroule en trois phases successives : élimination, équilibre et échappement (Règle des trois E) (Dunn et al., 2002) (**Figure 3**). La première étape consiste en l'identification et l'**élimination** des cellules cancéreuses naissantes qui ont pu échapper aux mécanismes cellulaires intrinsèques d'élimination tumorale. Cette étape fait intervenir aussi bien le système immunitaire innée que celui adaptatif qui coopèrent afin de reconnaître et d'éradiquer les cellules tumorales. Ce processus est suivi d'une phase de dormance tumorale au cours de laquelle quelques cellules cancéreuses ayant survécu à la première phase, et le système immunitaire entrent dans un **équilibre** dynamique. Ceci fait que la croissance de la tumeur reste très limitée voir bloquée au fil du temps. De par l'instabilité génétique des cellules transformées, certains sous-clones présentent une immunogénicité réduite et vont alors pouvoir **échapper** à la reconnaissance et à l'élimination par le système immunitaire. Au cours de cette phase la croissance tumorale n'est plus restreinte et les signes cliniques de la maladie apparaissent (Dunn et al., 2002; O'Donnell et al., 2019; Vesely et al., 2011). Plusieurs mécanismes peuvent ainsi être mis en place afin de permettre à ces cellules tumorales de croître à l'insu du système immunitaire. Parmi ces mécanismes, on trouve la sous-expression des antigènes tumoraux, des molécules de costimulation et de CMH-I, l'expression de molécules anti-apoptotiques, pro-angiogéniques ou immunosuppressives, ainsi que le recrutement de cellules immunoinhibitrices telles que les macrophages de type M2, les Treg (T regulatory cells), les Th2, les cellules dendritiques plasmacytoïdes et les MDSCs (Myeloid-Derived Suppressor Cells) (Faget et al., 2012; Mittal et al., 2014; Zitvogel, 2014).

L'implication du système immunitaire en tant que valeur prédictive et pronostique dans le cancer et dans la réponse aux traitements semble donc être un point décisif.

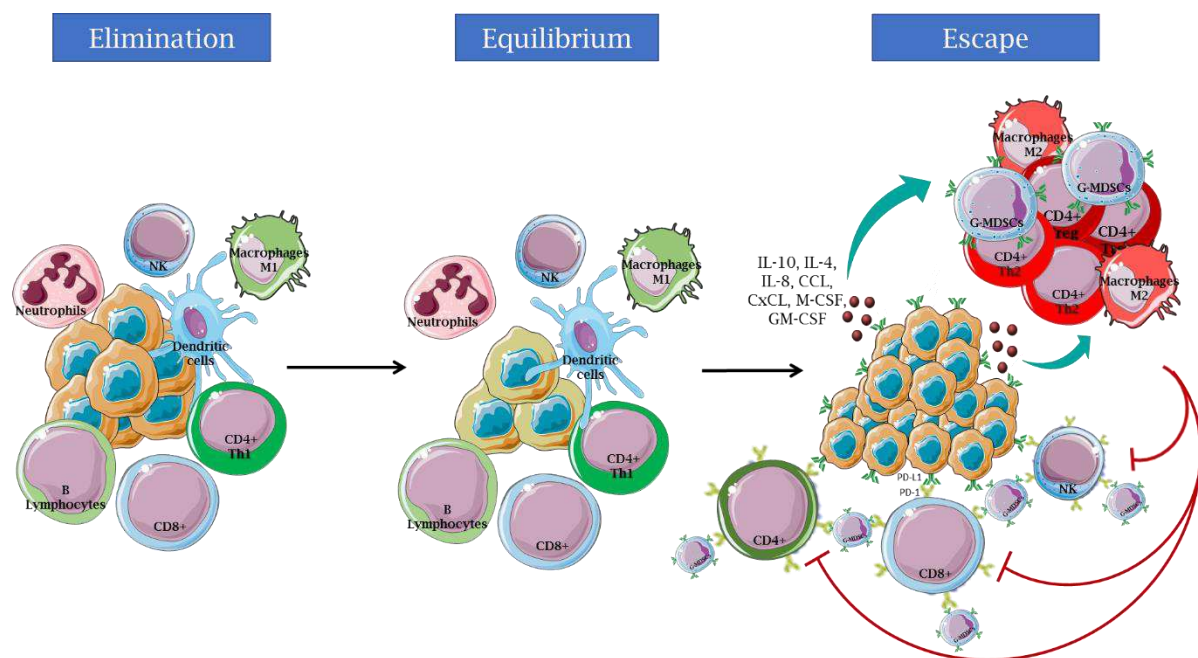


Figure 3 : Présentation des trois phases de l'immunosurveillance ou immunoediting (les 3E) : Elimination, Equilibre, et Echappement. Le système immunitaire semble jouer un rôle important aussi bien dans l'élimination que dans la progression tumorale. En effet, tout commence par la formation de cellules mutantes/anormales. Ces cellules vont être reconnues par le système immunitaire inné comme étant des cellules du « non soi », et présentées aux cellules immunitaires adaptatives qui, à leur tour, vont procéder à la destruction de ces cellules transformées. On parle alors de la phase d'élimination. Si ces cellules cancéreuses survivent à cette première phase, elles rentrent dans un état de dormance tumorale au cours de laquelle les cellules cancéreuses et immunitaires rentrent dans un équilibre dynamique. On parle alors de la phase d'équilibre. Ces cellules transformées peuvent alors subir un immunoediting, ce qui conduit à une perte d'immunogénicité. C'est pendant cette phase d'échappement que les cellules tumorales cancéreuses mettent en place des mécanismes leur permettant d'échapper à la détection et à l'élimination par le système immunitaire. Parmi ces mécanismes, on retrouve la sécrétion de cytokines ou chimiokines permettant le recrutement de cellules immunosuppressives telles que Treg, Th2, les macrophages de types M2 et les cellules immunosuppressives G-MDSCs. On assiste ainsi à un switch complet du microenvironnement tumoral, d'un environnement immunitaire anti-tumoral à un environnement immunitaire immunosuppresseur pro-tumoral à l'origine de la formation de tumeurs cliniquement apparentes. Ces cellules cancéreuses peuvent également inhiber directement l'activité anti-tumorale du système immunitaire via l'expression de molécules immunosuppressives, tels que PD-L1, le ligand de PD-1 exprimé par la plupart des cellules immunitaires et qui est responsable de l'inhibition de l'activation de ces cellules.



### 3.1.1. Cellules impliquées dans la phase d'élimination

La première étape de la règle des 3E, consiste en l'identification et l'élimination des cellules transformées naissantes qui ont pu échapper aux mécanismes cellulaires intrinsèques d'élimination tumorale. Cette étape fait intervenir des cellules de l'immunité innée et adaptative. Parmi les cellules de l'immunité innée, on distingue les cellules myéloïdes (macrophages, neutrophiles, mastocytes, CD) et les cellules lymphoïdes innées (NK). Ces cellules interagissent aussi bien avec les cellules tumorales, qu'avec les cellules de l'immunité adaptative (contact direct ou indirect via des cytokines et des chimiokines) avec lesquelles elles coopèrent afin d'éviter la prolifération des cellules cancéreuses. Il existe deux mécanismes par lesquelles ces cellules innées peuvent éliminer ces cellules transformées. Le premier mécanisme est relatif aux propriétés effectrices des cellules impliquées, leur permettant d'éliminer les cellules tumorales par phagocytose pour les macrophages et les neutrophiles, via la cytotoxicité induite par les cellules NK ou encore par de la cytotoxicité cellulaire dépendante des Acs (ADCC (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity)). Le deuxième mécanisme consiste en la présentation des antigènes tumoraux aux cellules effectrices de l'immunité adaptative, qui à leur tour induisent l'élimination des cellules cancéreuses (Wu & Dai, 2017). Parmi les cellules adaptatives intervenant dans la réponse anti-tumorale, on retrouve les LT (CD4+ et CD8+) et B. Tout au long de mon projet, je me suis focalisée sur les LT et je vais donc me concentrer sur ce type cellulaire.

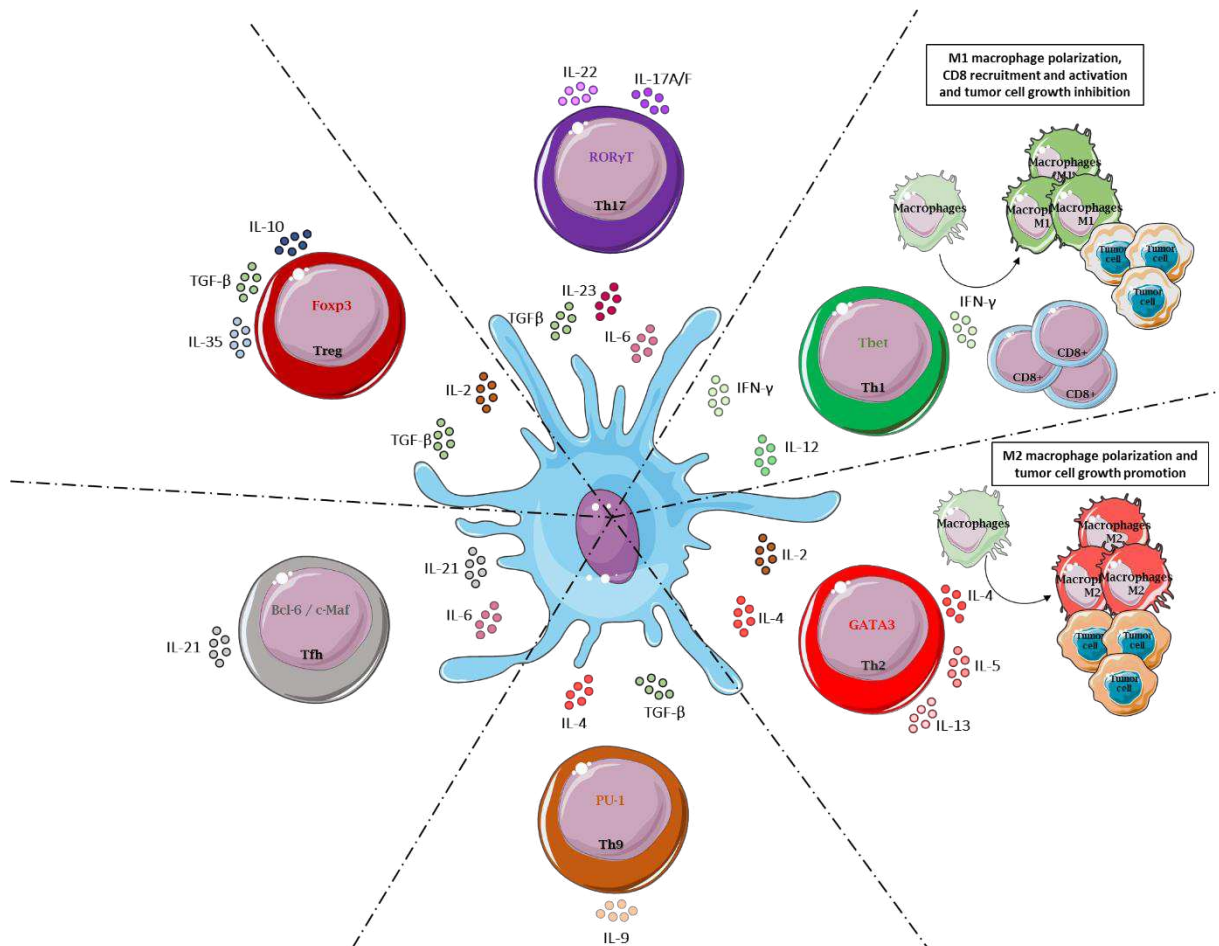
#### 3.1.1.1. Rôle de l'immunité adaptative : les LT CD4+ (balance Th1/Th2)

La famille des lymphocytes TCD4+, encore appelés T helper (Th) ou T auxiliaires, est constituée de différentes sous-populations : les sous-populations intervenant dans l'élimination spécifique des pathogènes, telles que les Th1, les Th2 et les Th17, les cellules intervenant dans le maintien de l'auto-tolérance, telles que les Treg, les cellules impliquées dans la production d'Ac par les lymphocytes B (LB) et les Tfh, et encore d'autres sous-populations telles que les Th9 et les Th22 (Cosmi et al., 2014; Raphael et al., 2015). La différenciation vers l'un ou vers l'autre des lignages dépend des cytokines et facteurs de croissance sécrétées par les CD ou par d'autres cellules environnantes pendant la phase d'activation du TCR. Par exemple, un microenvironnement riche en IL (interleukine)-6, IL-23 et TGF- $\beta$  favorise la différenciation des cellules TCD4+ naïves en Th17, alors qu'un microenvironnement riche en IL-2 et TGF- $\beta$  induit leur différenciation en

Treg. La présence d'IFN- $\gamma$  et d'IL-12, par contre, favorise la différenciation Th1 via l'activation de la voie de signalisation STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) 1 et STAT4 respectivement, alors que la sécrétion d'IL-2 et d'IL-4 induit la différenciation en Th2 via l'activation de la voie STAT5 et 6 respectivement (Geginat et al., 2014; Yamane & Paul, 2013; Zhu et al., 2010). Une fois activées, ces cellules vont exprimer des facteurs de transcription et des récepteurs de « homing », et sécréter des cytokines qui leur sont spécifiques et qui sont responsables de leurs fonctions immunitaires respectives. Les cellules Th1, Th2 et Th17 sont caractérisées par l'expression des facteurs de transcription Tbet (T-box transcription factor TBX21, Th1), GATA3 (Trans-Acting T cell specific transcription factor, Th2) et ROR $\gamma$ T (Retinoic acid-related orphan receptor gamma t, Th17), et par la sécrétion des cytokines IFN- $\gamma$  (Th1), IL-4, IL-5 et IL-13 (Th2), et IL-17 et IL-22 (Th17) (Yamane & Paul, 2013) (Figure 4). Ces cytokines vont à leur tour permettre la réexpression des facteurs de transcription spécifiques pour chaque sous-type cellulaire et donc l'amplification, via une boucle de rétroaction positive, de leur différenciation et activation (Cosmi et al., 2014; Yamane & Paul, 2012). Tous ces sous-types cellulaires jouent des rôles différents et parfois opposés dans le cancer et peuvent être liés à un bon (Th1 ou rarement les Th2) ou à un mauvais pronostic (Th2). L'effet des Th17, reste, quant à lui, très controversé, source de résultats contradictoires en fonction du type de cancer. En effet, dans le cancer colorectal, une étude a permis d'identifier des clusters de gènes associés à différents sous-types CD4+ dont les Th17, les Th2 et Th1 et de corrélérer la présence des unes ou des autres de ces cellules à la survie des patients. Cette étude a montré une forte corrélation de la survie prolongée sans récurrence avec la présence des cellules Th1. En revanche, un mauvais pronostic a été associé aux cellules Th17 (Tosolini et al., 2011). Une autre étude clinique a également montré que la présence des cellules Th17 était corrélée à la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques des patients atteints d'un cancer colorectal suggérant qu'un rapport élevé de LT ROR $\gamma$ + / LT CD3+ pourrait être utilisé comme un facteur pronostic pour la survie post-opératoire (Yoshida et al., 2016). Un effet pro-tumoral associé aux cellules Th17 a été également identifié dans le cancer du sein dans une étude assez récente réalisée par Ma *et al.* Ces chercheurs ont montré que ces cellules stimulent les cellules tumorales mammaires pour qu'elles sécrètent du CXCL (chemokine (C-X-C motif) ligand) 1, chimiokine jouant un rôle essentiel dans la promotion de la croissance tumorale (Ma et al., 2018). D'autres études ont, cependant, montré que ce sous-type cellulaire peut induire le recrutement ainsi que l'activation des cellules cytotoxiques (NK et LTCD8+) et des cellules

effectrices Th1 (Nuñez et al., 2013). L'effet anti-tumoral de ces Th17 pourrait être lié à leur grande plasticité (à la différence des cellules Th1 et Th2) leur permettant de se redifférencier en cellules Th1, intervenant alors dans l'inhibition de la croissance tumorale (Martin et al., 2012). En ce qui concerne les cellules Th2, même si Tosolini *et al.*, n'ont montré aucune corrélation de la présence des cellules Th2 à la survie des patients atteints d'un cancer colorectal (Tosolini et al., 2011), DeNardo *et al.*, ont montré que ces cellules sécrétrices d'IL-4 jouent un rôle important dans la régulation de la fonction effectrice des macrophages associés aux tumeurs mammaires. Ces cellules vont donc sécréter des facteurs de croissance et angiogéniques, des protéases ainsi que des facteurs de survie tumorale, et induire la formation de métastases d'origine tumorale mammaire (DeNardo et al., 2009). D'autres études ont également montré que les cellules Th2, en réponse à la signalisation induite par la chimiokine CCL (chemokine (C-C motif) ligand) 2, augmentent l'activité pro-métastatique des cellules myéloïdes associées aux tumeurs, aussi bien en clinique chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, qu'en préclinique chez des souris porteuses de tumeurs mammaires 4T1 (Mandal et al., 2018; Zhang et al., 2015). En ce qui concerne les cellules Th1, leur rôle anti-tumoral a été bien établi dans de nombreux types de cancers dont le cancer du sein (Ostrand-Rosenberg, 2005; Zhao et al., 2019). Plusieurs essais cliniques ont mis en évidence une dérégulation de la balance Th1/Th2 en faveur des cellules Th2 chez les patientes atteintes d'un cancer du sein (Zhao et al., 2019). En revanche, un switch de ce rapport en faveur de la polarisation de type Th1 était corrélée à un bon pronostic avec un taux de survie élevé et un faible taux de récurrence dans plusieurs types de cancers dont le cancer du sein (Yu et al., 2014; Zhao et al., 2019). Plusieurs mécanismes responsables de la fonction anti-tumorale des Th1 ont été évoqués et peuvent être directs ou indirects. En effet, les Th1, par l'intermédiaire des cytokines IFN- $\gamma$  et TNF, peuvent agir directement sur les cellules tumorales pour induire un arrêt permanent de leur croissance (Braumüller et al., 2013). Cependant, le mécanisme le plus connu repose sur leur capacité à agir indirectement sur les cellules cancéreuses via le recrutement et l'activation d'autres cellules appartenant aussi bien à l'immunité innée qu'adaptative. En effet, par l'intermédiaire des cytokines qu'elles sécrètent, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , et GM-CSF (Granulocyte / Macrophage-Colony Stimulating Factor), elles induisent, par exemple, la polarisation des macrophages vers le sous-type anti-tumoral M1 et augmentent leur activité cytotoxique contre les cellules tumorales (DeNardo et al., 2009) (**Figure 4**). Elles sont également capables d'induire le recrutement, l'expansion, la différenciation ainsi que l'activation des cellules cytotoxiques

(les cellules NK et TCD8+) qui à leur tour reconnaissent et éliminent les cellules tumorales (Dushyanthen et al., 2015; Lowenfeld et al., 2019; Lu, 2017). Cet effet semble être lié à la capacité des cellules Th1 à sécréter de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2, cytokines importantes dans le recrutement et l'activation des cellules TCD8+ (Bos & Sherman, 2010).



*Figure 4 : Polarisation des LT naïfs vers les différents sous-types TCD4+ et rôle antagoniste des cellules Th1 et Th2 dans le cancer. Les cellules TCD4+ naïves peuvent se différencier en plusieurs sous-types cellulaires et exprimer des facteurs de transcription et des cytokines qui leur sont spécifiques. Ce mécanisme est orchestré, entre autres, par les CD sécrétrices de cytokines. La sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-12, ou d'IL-2 et d'IL-4, ou d'IL-4 et de TGF- $\beta$ , ou d'IL-6 et d'IL-21, ou d'IL-2 et de TGF- $\beta$ , ou encore d'IL-23, d'IL-6 et de TGF- $\beta$  induit l'expression respective des facteurs de transcription Tbet (Th1), GATA3 (Th2), PU-1 (Th9), BCL6 (Tfh), Foxp3 (Treg) et ROR $\gamma$ T (Th17). Ces cellules vont sécréter de l'IFN- $\gamma$  (Th1), de l'IL-4, -5 et -13 (Th2), de l'IL-9 (Th9), de l'IL-21 (Tfh), de l'IL-10, -35 et du TGF- $\beta$  (Treg) et en fin de l'IL-22 et de l'IL-17A/F (Th17). La balance Th1/Th2 joue un rôle primordial dans l'apparition et la progression des tumeurs. En effet, un environnement riche en Th1 va permettre la polarisation des macrophages vers le phénotype anti-tumoral (M1) et le recrutement des LT cytotoxiques qui vont ensemble contribuer à l'inhibition de la croissance tumorale. A l'inverse, un environnement riche en Th2 va permettre la polarisation des macrophages vers le phénotype pro-tumoral (M2) et l'augmentation de la progression tumorale.*

### 3.1.1.2. Rôle de l'immunité adaptative : les LT CD8+

Les LT CD8+ cytotoxiques (CTL (cytotoxic T lymphocyte)) correspondent aux cellules T les plus impliquées dans l'élimination des tumeurs de par leur capacité à reconnaître, à eux seuls ou par l'intermédiaire des CD, les antigènes tumoraux présentés par les molécules du CMH-I. Cette interaction avec les antigènes tumoraux permettant l'activation de leur fonction cytolytique et l'élimination des cellules tumorales. Ce processus nécessite également la présence de cytokines produites par le MET, entre autre par les CD, afin de permettre leur prolifération et leur activation optimale (Farhood et al., 2019). Outre les cellules tumorales et les CD, les cellules TCD4+, via l'expression du ligand CD40L, interviennent également dans le processus d'activation et de différenciation des LT CD8+ en CTL effectrices et mémoires. Deux différentes voies d'activation des LT CD8+, dépendantes de CD40L, sont donc à distinguer (Borst et al., 2018; Zhang et al., 2009) :

- ❖ La voie indirecte : les cellules TCD4+/CD40L+ vont interagir avec les CD exprimant le récepteur CD40. Cette interaction permet l'activation des CD qui se chargent à leur tour d'activer les cellules TCD8+ (Bennett et al., 1998; Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998; Zhang et al., 2009),

- ❖ La voie directe : les cellules TCD4+/CD40L+ interagissent directement avec les LT CD8+/CD40+, dans ce cas le rôle des CD consiste à mettre en contact ces deux types cellulaires (Bourgeois et al., 2002).

Une fois activées, ces cellules TCD8+ vont utiliser trois mécanismes majeurs pour exercer leur activité cytotoxique sur les cellules tumorales. Le premier repose sur la capacité de ces cellules à sécréter des médiateurs solubles tels que l'IFN- $\gamma$ . Cette cytokine va permettre l'amplification de la réponse adaptative, ainsi que la différenciation de ces cellules TCD8+ en CTL effectrices. Cette cytokine induit également le recrutement des cellules de l'immunité innée telles que les macrophages, et l'induction de leur polarisation vers le phénotype anti-tumoral M1. Elle a également un effet inhibiteur sur l'angiogenèse des cellules tumorales, ainsi que stimulateur de l'expression du CMH-I par ces dernières cellules et la présentation de leur antigènes tumoraux. Le deuxième mécanisme repose sur la capacité de ces cellules à induire l'exocytose de granules contenant le granzyme A et B et la perforine. En effet, une fois ces cellules effectrices mises en contact avec les cellules tumorales, elles produisent de la perforine pour induire des pores au niveau de leurs membranes plasmiques, ces trous vont donc faciliter

l'entrée des protéases granzyme A et/ou B, le clivage des substrats intracellulaires ainsi que l'apoptose des cellules cibles. Enfin, le troisième mécanisme correspond à l'induction de l'apoptose des cellules tumorales via l'activation de la voie Fas / FasL, l'activation des caspases pro-apoptotiques et la sécrétion du cytochrome C (Farhood et al., 2019; Thomas & Massagué, 2005) (Figure 5).

La présence des LT CD8+ au sein des tumeurs est associée, dans la majorité des cas, à un bon pronostic. Cette corrélation a été identifiée dans de nombreux types de cancers tels que le cancer de l'ovaire (Zhang et al., 2003), le cancer colorectal (Pagès et al., 2005) mais aussi dans le cancer du sein (Liu et al., 2011; S. Liu et al., 2012; Mahmoud et al., 2011; K. Wang et al., 2016).

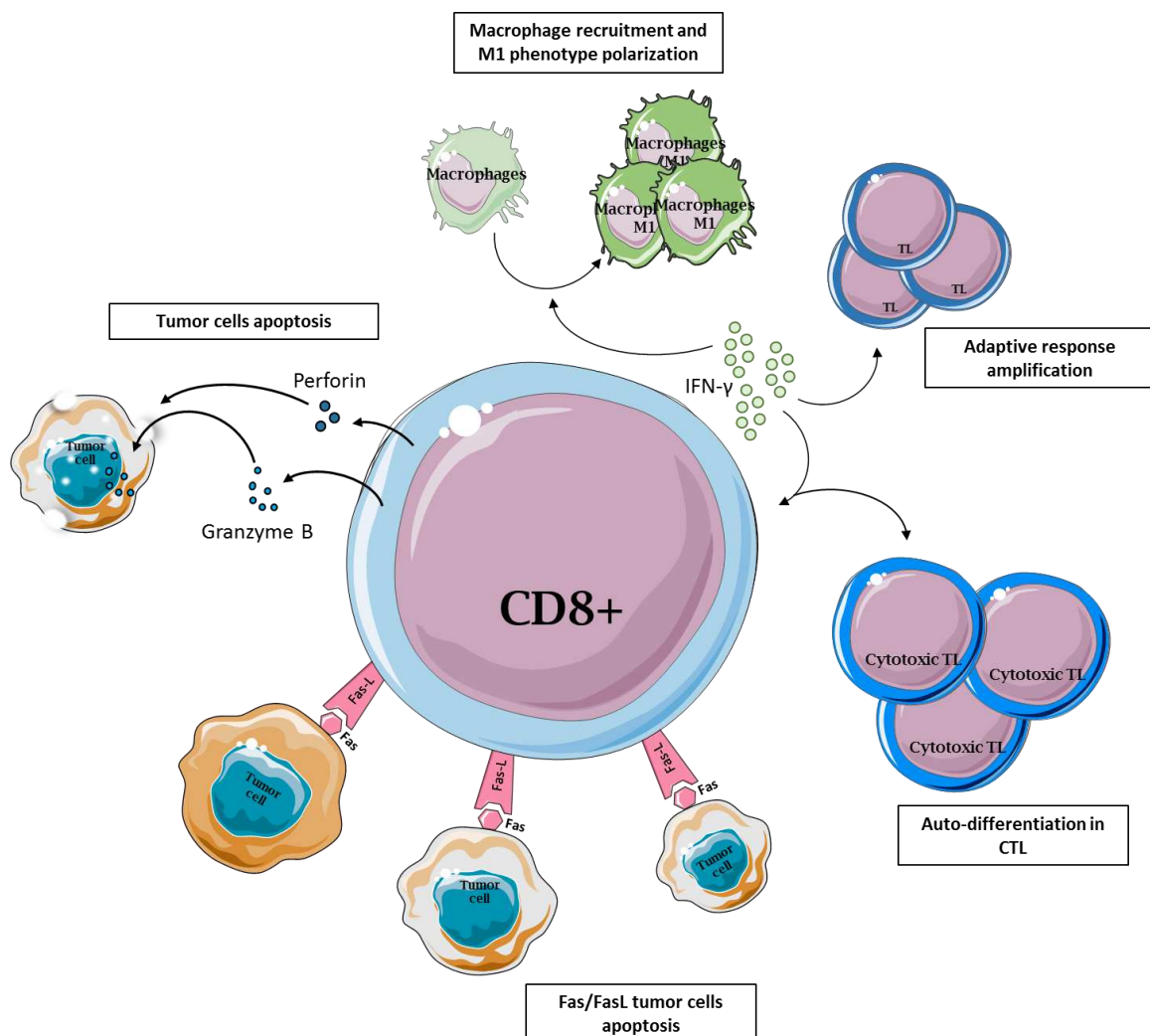


Figure 5 : Mécanismes d'action des cellules TCD8+. Trois mécanismes sont à l'origine de l'effet anti-tumoral des cellules TCD8+ : 1) sécrétion d'IFN- $\gamma$  qui via une boucle de rétrocontrôle positif induit l'amplification de leur différenciation en LT cytotoxiques effecteurs et de la réponse adaptative, ainsi que le recrutement et la polarisation des macrophages M1 ; 2) la sécrétion de perforine, induisant des pores au niveau des cellules tumorales, et du granzyme A et B qui, une fois rentré dans la cellule tumorale via les pores formés par la perforine, provoque un clivage des substrats intracellulaires et l'apoptose des cellules cancéreuses ; 3) induction de l'apoptose via l'interaction de FasL exprimé par les LT CD8+ avec les récepteurs de mort Fas présents à la surface des cellules tumorales

### 3.1.2. Molécules / cellules impliquées dans la phase d'échappement

Plusieurs mécanismes peuvent ainsi être mis en place afin de permettre aux cellules tumorales de croître à l'insu du système immunitaire. Les cellules cancéreuses vont, par exemple, sous-exprimer leurs antigènes tumoraux et les molécules du CMH, mais également augmenter l'expression de molécules anti-apoptotiques ou de molécules de surface tels les ligands aux PCI (exemple PD-L (Programmed cell Death-Ligand) 1 ou 2), produire des molécules immunosuppressives, telles que TGF- $\beta$ , IL-10 et IDO (Indoleamine 2,3-DiOxygenase), ou pro-angiogéniques (VEGF), exprimer des facteurs de transcription impliqués dans la prolifération cellulaire, tels que STAT3, et induire le recrutement de cellules immunosuppressives telles que les Treg et les MDSCs (Avalle et al., 2012; Dunn et al., 2002; Dunn et al., 2004; Li et al., 2016; O'Donnell et al., 2019). En effet, plusieurs études effectuées sur des patientes porteuses de cancer du sein, ont montré que ces dernières présentaient des signes biologiques d'immunosuppression tels que le blocage de la différenciation des LT CD8+, la diminution du nombre de lymphocytes NKT (Natural Killer T), la production d'IFN $\gamma$ , l'expression de la chaîne  $\zeta$  du TCR ou de molécule de costimulation, l'augmentation du nombre des cellules immunorégulatrices (Treg, Th2 ou MDSCs (Myeloid-Derived Suppressor Cells)) ainsi que de la concentration sanguine de molécules immunosuppressives telles que l'arginase et la PGE2 (ProstaGlandine E2) (Zitvogel, 2014).

#### 3.1.2.1. Molécules immunosuppressives

Plusieurs molécules sont secrétées au sein du microenvironnement tumorale (MET) et jouent un rôle important dans la suppression du système immunitaire. Parmi ces molécules, on retrouve l'adénosine, un puissant métabolite immunosuppresseur, produit à partir de l'ATP dans des conditions d'hypoxie grâce aux endonucléotidases CD39 et CD73. Une fois accumulée dans le MET, l'adénosine exerce sa fonction immunorégulatrice en se fixant sur l'un de ses récepteurs A1R, A2AR, A2BR ou A3R (Allard et al., 2017; Vijayan et al., 2017). Elle permet ainsi l'anergie de la réponse TCD4+ avec une augmentation de leur conversion en cellules immuno-inhibitrices Treg, la diminution de la cytotoxicité des cellules cytotoxiques (CD8+ et NK), l'inhibition des CD ainsi que la conversion des macrophages M1 vers le phénotype pro-tumoral M2 (Allard et al., 2016; Mastelic-Gavillet et al., 2019). Plusieurs enzymes comme l'arginase et l'IDO sont également secrétées par les tumeurs afin d'inhiber le système immunitaire. Le

mécanisme d'action de ces deux enzymes consiste à cataboliser les acides aminés (arginine et tryptophane respectivement) indispensables au fonctionnement des cellules effectrices (Anestakis et al., 2015; O'Donnell et al., 2019). Les tumeurs sécrètent également la PGE2, un acide gras jouant un rôle important dans la suppression des cellule T. En effet, outre son puissant rôle immunosuppresseur direct, elle joue également un rôle très important dans la reprogrammation des cellules myéloïdes monocytaires vers un phénotype immunosuppresseur (M-MDSCs) (Porta et al., 2020), ainsi que dans la potentialisation de leur fonction immunosuppressive et l'augmentation de leur capacité à induire la prolifération des cellules Treg (Tomić et al., 2019). Il a été également montré que la PGE2 permet l'augmentation de l'expression de plusieurs molécules immunosuppressives par les MDSCs, telles que le ligand aux PCIs, PD-L1 (Programmed cell Death-Ligand 1) (Prima et al., 2017), mais également l'arginase, l'IDO et l'iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) (Donkor et al., 2009; Obermajer et al., 2012; Ochoa et al., 2007). Les cytokines IL-6, IL-12, TGF- $\beta$  et VEGF sont aussi des molécules sécrétées par les tumeurs afin de permettre le dysfonctionnement immunitaire ainsi que la croissance tumorale et la formation de métastases. Un des mécanismes par lesquels ces cytokines agissent est la surexpression de PCIs à la surface des TILs (Tumor Infiltrating Lymphocytes, cas de VEGF) (Johnston et al., 2016; Voron et al., 2015) ou de récepteurs à ces points de contrôle au sein des tumeurs ou des TILs (cas de TGF- $\beta$ , Il-6 et IL-12) (David et al., 2017).

### 3.1.2.2. Les points de contrôle négatifs immunitaires

#### 3.1.2.2.1. Généralités

Les PCIs sont des molécules dont l'expression est induite en réponse à l'activation des LT afin de permettre leur inhibition. Cette inhibition joue un rôle très important dans la tolérance centrale du soi (sélection positive et négative lors du réarrangement du TCR) afin d'éviter les réactions auto-immunes, mais également dans la tolérance périphérique (expansion et différenciation des lymphocytes dans les tissus périphériques) permettant ainsi l'anergie lymphocytaire (Zitvogel, 2014). A ce jour, sept PCIs ont été décrits tels que CTLA4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4), PD-1 (Programmed cell Death protein-1), Tim-3 (T-cell immunoglobulin mucin domain-3), LAG-3 (Lymphocyte Activation protein 3, ou CD223), TIGIT (T cell ImmunoGlobulin and ITIM domain), VISTA (V-domain Ig Suppressor of T cell Activation) et BTLA4 (B and T cell Lymphocyte Attenuator) (**Figure 6**). CTLA4 et PD-1 sont les deux premières



molécules à avoir été découvertes. L'histoire a commencé dans les années 80, lorsque les chercheurs ont commencé à comprendre qu'outre les signaux activateurs (les liaisons TCR-CMH et CD28-CD80/86), les LT répondent également à des signaux inhibiteurs (la liaison CTLA4-CD80/86) qui seraient impliqués dans l'inactivation de ces cellules immunitaires (Ballas, 2018; Brunet et al., 1987). C'est en 1995 que deux équipes ont mis en évidence une hyperprolifération des LT associée à la mort des souris lorsque ces dernières étaient déficientes en CTLA4. Ces résultats étant en faveur de l'utilisation d'inhibiteurs de CTLA4 dans le traitement des cancers (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995), il y a eu la mise au point des premiers Ac dirigés contre ce PCI. C'est ainsi en 1996, que l'équipe de James Allison a commencé à tester ces Ac en précliniques, chez des souris porteuses de mélanome. Les résultats étaient très encourageants puisqu'une forte régression des tumeurs était observée en réponse à l'anti-CTLA4 (Leach et al., 1996). Ces résultats ont été en faveur du développement d'Ac inhibant CTLA4 et utilisables en clinique, comme l'ipilimumab. Un essai clinique de phase III a alors été mis en place en 2010, et a montré des résultats « miraculeux » chez les patients atteints de mélanome métastatique avec une médiane de survie globale allant jusqu'à 10,1 mois (Hodi et al., 2010). En 1992, l'équipe de Tasuku Honjo a réussi à identifier une autre molécule faisant partie des PCIs et responsable de la mort par apoptose des cellules l'exprimant, il s'agit de PD-1 (Ishida et al., 1992). Toutes ces avancées ont permis à Honjo T et Allison J de bénéficier du prix Nobel en physiologie et médecine en 2018 (Ballas, 2018). Par la suite les cinq autres PCIs ont été identifiés incluant Tim-3 (Monney et al., 2002), LAG-3 (Andrews et al., 2017), TIGIT (Yu et al., 2009), VISTA (Wang et al., 2011) et BTLA4 (Greenwald et al., 2005; X. Yu et al., 2019) et qui représentent aussi des cibles thérapeutiques assez encourageantes dans le traitement du cancer.

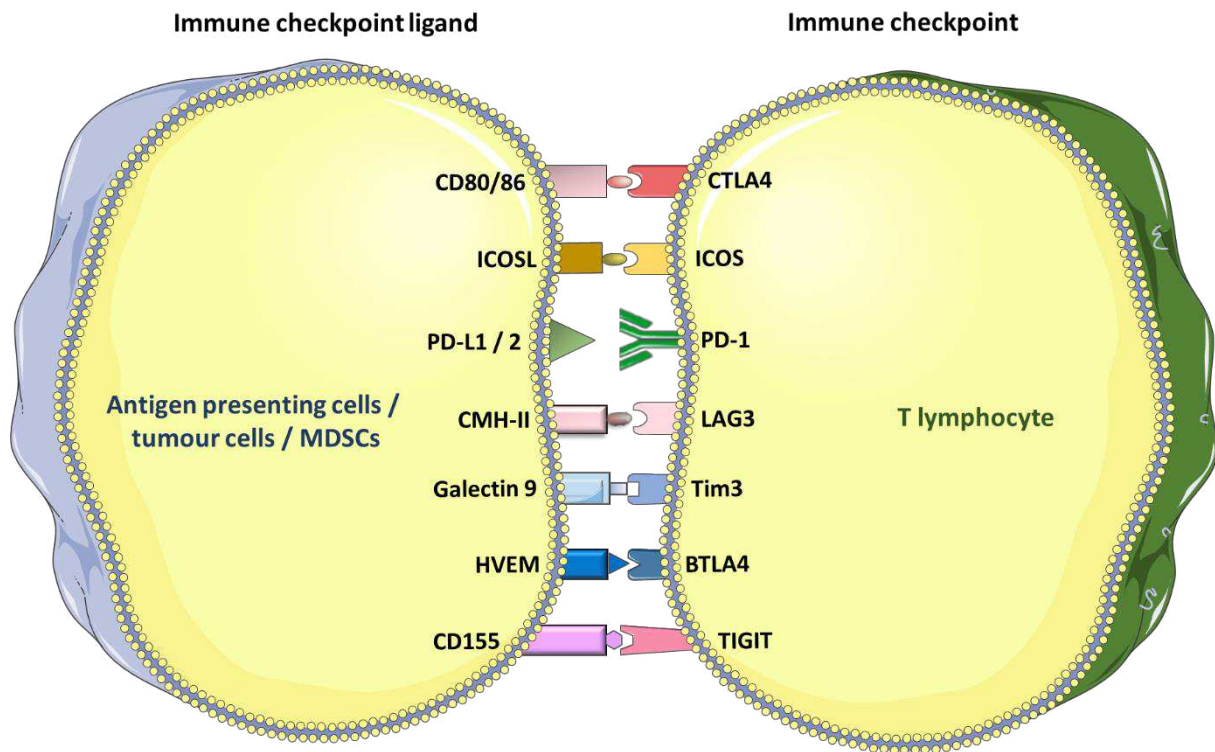


Figure 6 : Expression des points de contrôle immunitaires négatifs et leurs ligands.

#### 3.1.2.2.2. CTLA4 et PD-1

CTLA4 est une molécule de co-stimulation qui est exprimée de manière constitutive par les LTreg (Ohue & Nishikawa, 2019), mais aussi par les autres LT une fois activés. Elle a une forte homologie structurale avec la molécule de co-stimulation CD28 et présente une plus grande affinité que CD28 pour CD80/CD86. Cette grande affinité envers CD80/86 lui permet de se lier de façon compétitive avec ce récepteur présent sur les cellules présentatrices d'Ag (APC (Antigen Presenting Cells)) et les LB. A la différence de CD28, qui en se fixant sur CD80/CD86 induit l'activation des LT, CTLA4 contribue au phénomène d'anergie, et donc à l'échappement tumoral (Haanen & Robert, 2015). PD-1, est exprimé de manière constitutive par les LT CD4-/CD8- et conduit à la tolérance centrale lors de la sélection positive et négative, mais il est aussi exprimé de manière inductible sur les LT activés et joue alors un rôle dans la tolérance périphérique et l'anergie lymphocytaire. Il peut aussi être exprimé par les LB, les LTreg, les NK et les CD. Son interaction avec ses ligands, PD-L1 ou PD-L2, va permettre de limiter l'activité des LT via la diminution de la signalisation induite par le TCR. PD-L1 est exprimé par différents types cellulaires dont les cellules épithéliales, endothéliales et tumorales. Son expression sur les cellules tumorales peut être dû à plusieurs mécanismes intrinsèques, tels que la délétion de

PTEN activant la voie PI3K, ou extrinsèques, avec par exemple la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les LT activés. PD-L2, par contre, est exprimé par les APCs activées (Haanen & Robert, 2015; Pitt et al., 2016). L'inhibition de ces PCIs par des Acs les ciblant a donc pour but de réactiver la réponse immune et permettre l'éradication des tumeurs. L'utilisation de ces Acs a permis d'obtenir des résultats très encourageants dans plusieurs types de cancers tels que le poumon, l'ovaire, le mélanome et le sein.

### 3.1.2.2.3. Les inhibiteurs des points de contrôle négatifs immunitaires dans le cancer du sein

#### 3.1.2.2.3.1. Anti-CTLA4 dans le cancer du sein

Il a été montré que le blocage de CTLA4 par un Ac monoclonal anti-CTLA4 induit la levée d'inhibition des LT activés, mais aussi l'inhibition des LTreg dans le MET (Ohue & Nishikawa, 2019; Pitt et al., 2016). A ce jour deux Ac anti-CTLA4 sont utilisés, il s'agit de l'ipilimumab (ou MDX-010, IGg1) et du tremelimumab (ou ticilimumab, IGg2) (Su et al., 2016). L'ipilimumab a été le premier Ac ciblant CTLA4 testé dans un essai clinique de phase III en association ou non avec un vaccin à base du peptide gp100 chez des patients atteints d'un mélanome métastatique. Les résultats étaient assez encourageants quant à l'utilisation de l'ipilimumab seul dans le traitement du mélanome métastatique. Ils ont en effet montré que, indépendamment de son association au vaccin, l'ipilimumab améliorait la survie globale de ces patients (10 mois pour l'ipilimumab +/- gp100 vs 6,4 mois pour gp100 seul) (Hodi et al., 2010). L'efficacité de l'ipilimumab a ensuite été mise en évidence dans le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC (Non Small Cell Lung Carcinoma)), tout comme l'efficacité anti-tumorale du tremelimumab dans le mélanome avancé et le NSCLC (Xia & Herbst, 2016). En effet des essais cliniques de Phase I / II, ont montré que le tremelimumab induisait des réponses anti-tumorales durables avec des toxicités gérables chez les patients atteints d'un mélanome avancé (Reuben et al., 2006). Dans le NSCLC également, l'utilisation de l'ipilimumab a montré une amélioration de la survie des patients atteint de ce type de cancer lorsqu'il est administré en association avec des chimiothérapies standards telles que le paclitaxel et le carboplatine (Xia & Herbst, 2016). A ce jour, l'utilisation de ces Acs chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, n'a pas démontré d'efficacité thérapeutique en monothérapie (Su et al., 2016). Cependant, l'utilisation des inhibiteurs de CTLA4/PD-1 combinés à d'autres traitements, tel que le

trastuzumab emtansine (T-DM1), semble montrer des résultats très probants en préclinique dans un modèle de tumeur HER2+ (Müller et al., 2015), mais également en clinique lorsqu'ils sont combinés avec un inhibiteur de l'aromatase stéroïdienne qui inhibe la synthèse des œstrogènes, l'exemestane. Cet essai clinique de phase I réalisé sur des patientes atteintes d'un cancer du sein avancé traitées avec l'association du tremelimumab à l'exemestane a, en effet, montré que cette combinaison était associée à un taux élevé de cellules TCD4+ et TCD8+ exprimant ICOS (Inducible T-cell COstimulatory) (Vonderheide et al., 2010).

#### 3.1.2.2.3.2. Anti PD-1/PD-L1 dans le cancer du sein

Les Acs monoclonaux ciblant le point de contrôle PD-1 sont à ce jour au nombre de cinq avec le pembrolizumab (anti-PD-1 : Ac monoclonal humanisé (IgG4-κ)), le nivolumab (anti-PD-1 : IgG4), le pidilizumab (anti-PD-1 : Ac monoclonal humanisé (IgG1-κ)), l'atezolizumab (anti-PDL-1, aussi appelé MPDL3280A) et le BMS936559 (anti-PD-L1) (Brahmer et al., 2012; Lee et al., 2016). Trois de ces inhibiteurs sont approuvés par la FDA dans le traitement des mélanomes métastatiques non résecables (pembrolizumab et nivolumab), des NSCLC (pembrolizumab, nivolumab et atezolizumab), du cancer rénal métastatique (nivolumab) et du cancer urothélial localement avancé ou métastatique (atezolizumab) (Pitt et al., 2016; Spigel et al., 2018; Zou et al., 2016). Le pembrolizumab peut également être indiqué dans le traitement de nombreux autres cancer, tels que le cancer de la tête et du cou (Moskovitz et al., 2018), le carcinome urothélial métastatique (Bellmunt et al., 2017), le cancer du col de l'utérus (Frenel et al., 2017) et d'autres encore. Plusieurs essais cliniques de phase Ib ou II ont également testé ces Acs monoclonaux en monothérapie dans le traitement des patientes atteintes d'un CSTN métastatique précédemment traitées (Adams, Schmid, et al., 2019; Nanda et al., 2016) ou pas (Adams, Loi, et al., 2019) avec des chimiothérapies comme les anthracyclines et les taxanes, et ont montré une activité anti-tumorale assez durable avec un profil de sécurité assez gérable. Cependant le taux de réponse des patientes à ces différents inhibiteurs dépasse rarement les 40% dans plusieurs types de cancer, et les 21% dans le cancer du sein (Pitt et al., 2016; Zou et al., 2016). Ces échecs provenant probablement de l'hétérogénéité d'expression de PD-L1 par ces types de tumeurs (Bedognetti et al., 2016). Leurs associations à d'autres thérapies anti-cancéreuses semble, en revanche, montrer des résultats assez encourageants dans le traitement du cancer du sein. Plusieurs essais cliniques de phase I (Adams, Diamond, et al.,

2019; Loi et al., 2019), II (Loi et al., 2019; Nanda et al., 2020) et III (Schmid, Cortes, et al., 2020; Schmid, Rugo, et al., 2020) associant les anti-PD-1 ou PD-L1 avec d'autres traitement du cancer de sein tels que le nab-paclitaxel, le trastuzumab, le paclitaxel, la carboplatine, la doxorubicine-cyclophosphamide ou l'épirubicin-cyclophosphamide, ont été mené. Ainsi, l'essai clinique de phase III mené par Schmid *et al.*, et réalisé sur des patientes atteintes d'un CSTN a montré que pour celles recevant l'association de chimiothérapies néoadjuvantes (le paclitaxel, la carboplatine, la doxorubicin-cyclophosphamide et l'épirubicin-cyclophosphamide) avec du pembrolizumab, le taux de réponse pathologique complète était de 64,8% comparé à un taux de 51.2% chez les patientes recevant de la chimiothérapie + placebo (Schmid, Cortes, et al., 2020). L'essai clinique de phase I/II réalisé par loi *et al.*, en 2019, sur des patientes atteintes d'un cancer HER2+ / PD-L1+ à un stade avancé et résistant au trastuzumab, a montré que l'association du pembrolizumab avec du trastuzumab montrait un bénéfice clinique durables (Loi et al., 2019). L'expression, naturelle ou induite par les traitements, de PD-L1 au niveau des tumeurs semble donc être un marqueur prédictif de l'utilisation de ces inhibiteurs d'ICPs. Certaines chimiothérapies comme le paclitaxel, l'étoposide et le 5-fluorouracile peuvent sensibiliser à l'effet anti-tumoral des anti-PD-1/PD-L1 en augmentant l'expression de PD-L1 sur les lignées cellulaires de cancer mammaire (Migali et al., 2016). A l'inverse d'autres chimiothérapies comme la doxorubicine auraient tendance à induire la diminution d'expression de PD-L1 par les cellules cancéreuses mammaires (Zitvogel, 2014) ne favorisant pas l'utilisation ultérieure d'inhibiteurs de PD-L1/PD-1. Une étude préclinique sur des souris porteuses d'une tumeur mammaire induite via l'injection de cellules EMT6, a également montré un effet synergique de l'association de réovirus (virus à ARNdb) à un anti-PD-1. Ces réovirus seuls étaient capables d'induire une augmentation du recrutement des LTreg intratumoraux, mais surtout l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales, ce qui pourrait expliquer la potentialisation induite lorsqu'ils sont associés à de l'anti-PD-1 (Mostafa et al., 2018).

Outre ces molécules immunosuppressives et ICP, plusieurs cellules immunitaires jouent également un rôle important dans l'immunosuppression et l'échappement tumoral. Parmi ces cellules on retrouve les cellules TCD4+ de type Treg et les cellules myéloïdes MDSCs.

### 3.1.2.3. Cellules immunosuppressives

#### 3.1.2.3.1. Cellules T régulatrices (Treg)

Les cellules T régulatrices font partie des sous-types de LT CD4+ (5-10% des cellules CD4+ circulants), exprimant le récepteur à l'IL-2 (CD25) et le facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box p3), et sécrétant plusieurs cytokines immunosuppressives telles que le TGF- $\beta$  et l'IL-10. Il s'est avéré que cette population cellulaire peut être classée en plusieurs sous-groupes ayant chacun un rôle différent dans le contrôle du système immunitaire. On retrouve ainsi les nTreg (natural Treg), les iTreg (induced Treg), les Tr1 (les seules n'exprimant pas Foxp3), les Treg sécrétant IL-17 et les Tregs CD8+ (Hashemi et al., 2020; Zhang et al., 2014). Ces cellules ont en commun leur capacité à inhiber la réponse immunitaire dans le but de maintenir l'homéostasie immunitaire et éviter l'activation excessive ou inappropriée du système immunitaire à l'origine des maladies auto-immunes (Lee & Lee, 2018). En fonction de leur sous-type, elles peuvent agir sur différentes cellules du système immunitaire dont les CD, les mastocytes, les basophiles, les éosinophiles, les autres sous-types CD4+ (Th1, Th2 et Th17) ainsi que les cellules TCD8+ (Zhang et al., 2014). Outre leur rôle physiologique, ces cellules peuvent aussi être impliquées dans de nombreuses pathologies dont le cancer où elles jouent un rôle important dans l'échappement et la progression tumorale. Une augmentation du nombre de ces cellules a été retrouvée dans le sang et les tumeurs de patients atteints de nombreux types de cancers comme le cancer du sein, du foie, de l'estomac, des ovaires, de l'œsophage et la cancer gastrique et hépatocellulaire. Dans la majorité des cas, elle est associée à un mauvais pronostic et une faible survie (Bates et al., 2006; Gobert et al., 2009). En effet, l'équipe de Bates *et al.*, fut la première à montrer que la présence d'un taux élevé de TILs Foxp3+ était corrélée à des critères cliniques et histologiques agressifs dans le cancer du sein et à un faible taux de survie sans rechute (Bates et al., 2006). De même, une augmentation de l'infiltration tumorale par des LTreg fortement activés et exprimant ICOS, a été retrouvée dans les tumeurs mammaires comme étant corrélée à un mauvais pronostic (Gobert et al., 2009). Il existe toutefois quelques exceptions, où la présence d'un nombre élevé de cellules T FoxP3+ est plutôt corrélée à un meilleur pronostic. C'est le cas du cancer colorectal (Saito et al., 2016), et du lymphome de hodgkin (Alvaro et al., 2005). Saito *et al.*, ont, en effet, découvert deux types de cancer du côlon, le premier qui était infiltré par des cellules Treg Foxp3<sup>(hi)</sup>, et le deuxième qui était riche en cellules Treg Foxp3<sup>(hi)</sup> n'exprimant pas CD45RA et présentant un niveau élevé de cytokines inflammatoires (TGF- $\beta$  et

l'IL-12). Le premier type était corrélé à un mauvais pronostic, alors que le deuxième était de bon pronostic (Saito et al., 2016).

Le recrutement de ces cellules vers la tumeur se fait en réponse à certains chimioattractants de type CC ou CXC qui vont se lier à leur récepteurs CCR ou CXCR exprimés par les LTregs. On retrouve, par exemple, les couples CCR4-CCL17/22 (Kurose et al., 2015), CCR8-CCL1 (Barsheshet et al., 2017), CCR10-CCL28 (Eksteen et al., 2006) et CXCR3-CCL9/10/11 (Müller et al., 2007). Une fois dans le MET, ces cellules commencent à exercer leurs fonctions immunosuppressives en faveur d'une augmentation de la progression tumorale. Plusieurs mécanismes sont liés à leur activité immuno-inhibitrice. Comme évoqué précédemment, les cellules Treg expriment à leur surface CD25, un récepteur ayant une grande affinité pour la cytokine IL-2. L'épuisement du MET en IL-2 prive les autres cellules immunitaires de son utilisation et inhibe ainsi leur prolifération ainsi que leur activation en cellules effectrices (Setoguchi et al., 2005). De plus, ces LTreg sont des grands producteurs de cytokines inhibitrices de l'activation des LT effecteurs, telles que le TGF- $\beta$ , l'IL-10 et l'IL-35 (Collison et al., 2007; Maj et al., 2017; Takahashi et al., 1998). Ces cellules immunosuppressives peuvent également inhiber directement les APC ou les cellules effectrices via plusieurs mécanismes tels que la production de la perforine et du granzyme B (Cao et al., 2007), l'interaction de Fas (exprimé par les cellules effectrices) avec Fas ligand (exprimé par les LTreg) responsable de l'apoptose des cellules cibles, ou encore l'interaction CTLA4 (exprimé par les LTreg) / CD80/86 (exprimé par les CD) inhibant ainsi la présentation de l'Ag aux cellules effectrices par les CD. D'autres PCIs peuvent également être exprimés par les cellules Treg et permettre soit l'augmentation de leur fonction immunosuppressive via la liaison de PD-1 avec PD-L1 des cellules tumorales, soit l'inhibition des cellules effectrices présentant le CMH-II, via l'interaction avec LAG-3 des LTreg (Camisaschi et al., 2010; Huang et al., 2004; Kamada et al., 2019; Ohue & Nishikawa, 2019). Ces cellules Treg peuvent également exprimer des molécules costimulatrices telles que ICOSL (ICOS Ligand) qui, en interagissant avec son récepteur ICOS exprimé par les CD, induit la prolifération et l'activation des LTregs (Ohue & Nishikawa, 2019). Un dernier mécanisme immunosuppresseur implique la sécrétion de métabolites immunosuppressifs, soit directement (adénosine) (Maj et al., 2017), soit indirectement en activant les CD (IDO) en réponse à l'interaction CTLA4 (LTreg) / CD80/86 (CD) (**Figure 7**, (Mellor & Munn, 2004)).

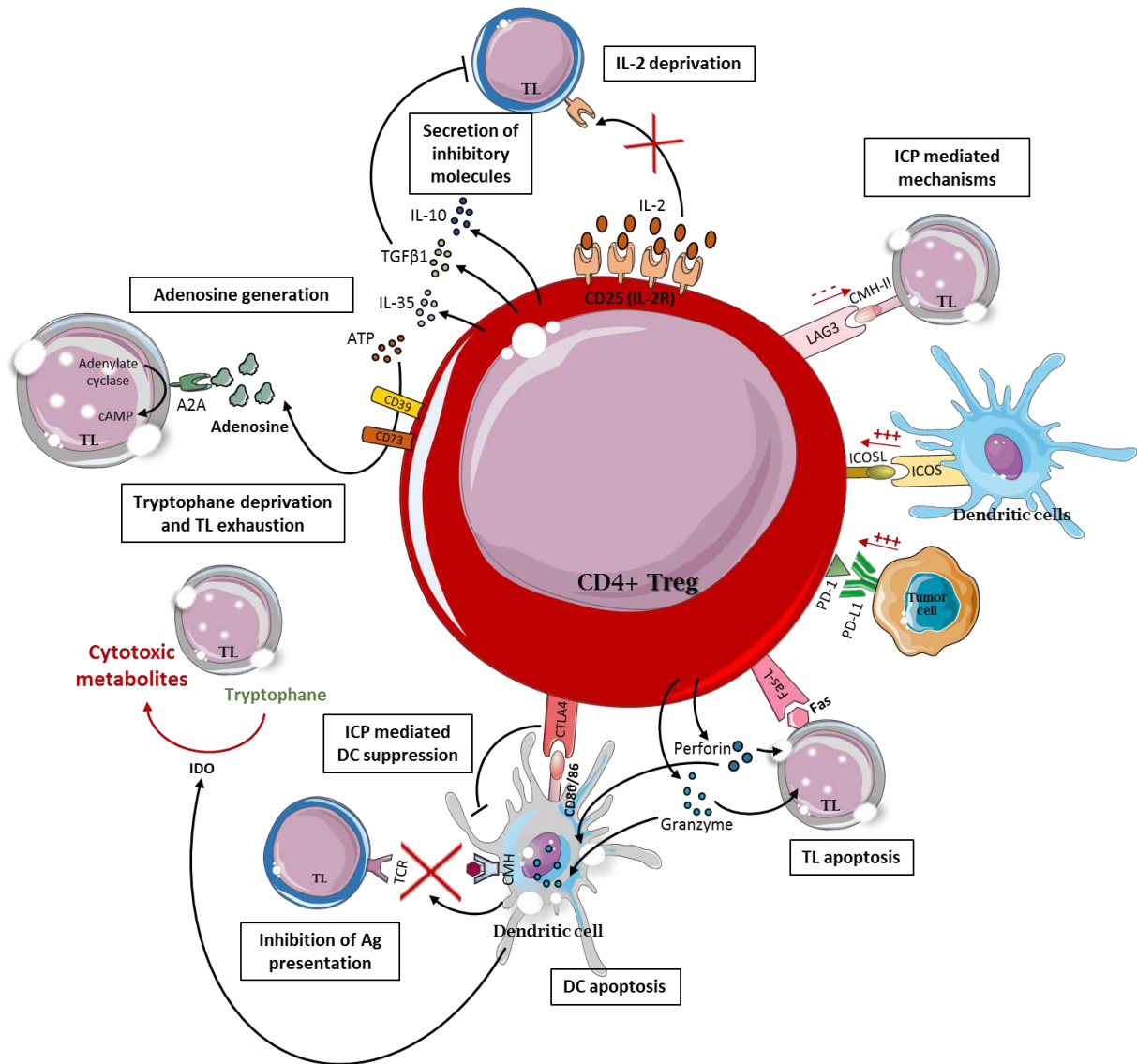


Figure 7 : Mécanismes d'action des cellules T régulatrices (Treg). Sept mécanismes sont à l'origine de l'immunosuppression induite par les LTreg : 1) inhibition indirecte via l'expression du récepteur à l'IL-2 (CD25) induisant l'épuisement en IL-2 et ainsi l'inhibition de la prolifération et de l'activation des LT ; 2) interaction CTLA4 (Treg) / CD80/86 (CD), entraînant une altération de la maturation des CD et la diminution de la disponibilité des molécules de costimulation CD80/86 ; 3) épuisement des LT en acides aminés essentiels à leur survie via l'induction de l'expression d'IDO par les CD ; 4) inhibition directe des cellules T via la sécrétion de cytokines inhibitrices (TGF- $\beta$ , IL-10 et IL-35) ; 5) génération de l'adénosine à partir de l'ATP, qui en se fixant sur son récepteur A2AR exprimé par les cellules T, induit l'inhibition de ces dernières ; 6) interaction Fas (LT) / FasL (Treg), et sécrétion de perforine et granzyme B, résultant dans l'apoptose de ces LT ; 7) expression des points de contrôle immunitaire négatifs tels que LAG-3, et PD-1 ou de molécules de costimulation ICOSL, qui vont se fixer sur CMH-II (LT), et PD-L1 (cellules tumorales) et ICOS (CD) respectivement. L'interaction PD-1 / PD-L1 et ICOS / ICOSL permettent l'activation des Treg alors que l'interaction LAG-3 / CMH-II permet l'inhibition des cellules effectrices.



L'inhibition de ces cellules semble donc être une approche immunothérapeutique très intéressante dans le traitement du cancer. Parmi les molécules de surface exprimées par les LTreg et pouvant être ciblées pour les inhiber on trouve : CD25, CTLA-4, PD-1, ICOS, OX40 (molécule de costimulation de la famille TNF-R), CD15s, CCR4 et CCR8, dont certaines ont été testées dans des essais cliniques et d'autres méritent de l'être (Ohue & Nishikawa, 2019).

Les cellules Tregs ne sont pas les seules à avoir un effet immunosuppresseur et intervenant dans la phase d'échappement et de progression tumorale, on retrouve également les macrophages ou neutrophiles associées aux tumeurs (TAM (Tumor Associated Macrophages) ou TAN (Tumor Associated Neutrophils) respectivement), et surtout les MDSCs. Mon projet de thèse portant sur l'effet anti-tumoral de la combinaison de traitements par la doxorubicine et le GTN (Glyceryl TriNitrate) et ciblant la reprogrammation des G-MDSC pro-tumoraux en G-MDSC / neutrophiles anti-tumoraux, je vais me focaliser plus spécifiquement sur ces cellules.

#### 3.1.2.3.2. Les cellules MDSCs

Les MDSC correspondent à une population hétérogène de cellules immunitaires d'origine myéloïde jouant un rôle majeur dans la régulation immunitaire de diverses maladies inflammatoires, en particulier le cancer, mais également les infections bactériennes ou parasitaires, les inflammations aiguës et chroniques, les maladies auto-immunes et le stress traumatique (Bronte et al., 2016; Gabrilovich et al., 2007; Gao et al., 2019). Tout comme les LTregs, ces cellules font partie des cellules immunosuppressives pouvant être à l'origine de l'échappement et la progression tumorale (Bronte et al., 2016; Gao et al., 2019).

##### 3.1.2.3.2.1. Origine

Un intérêt croissant a porté sur une population de cellules retrouvées chez les patients atteints de cancers, ayant une origine myéloïde tout comme les macrophages et les CD, mais qui à la différence de ces dernières, sont immatures et ont une fonction immunosuppressive. A ces cellules a été attribué le nom de MDSC pour « Myeloid Derived Supressor Cells » (Bunt et al., 2006; Gabrilovich et al., 2007; Millrud et al., 2017). En effet, lors d'une inflammation aiguë, une activation de la myélopoïèse peut être observée pour donner naissance aux monocytes pro-inflammatoires à partir de progéniteurs myéloïdes. Ces monocytes, une fois activés, migrent vers les tissus où ils subissent leur maturation en macrophages ou CD (Sica et al., 2019). En

revanche, dans certaines conditions pathologiques ou lors d'inflammation chronique (cancer, agents infectieux ou lésions tissulaires), une perturbation de l'approvisionnement régulier en cellules myéloïdes peut être observée entraînant ainsi une myélopoïèse d'urgence (Bronte et al., 2016). Deux conditions peuvent se mettre en place :

- ❖ Le problème se résout rapidement et l'équilibre des cellules myéloïdes se rétablit sans conséquences négatives pour l'hôte ;
- ❖ Dans le cas d'une inflammation chronique, de maladies auto-immunes ou de cancer, une myélopoïèse dérégulée peut-être retrouvée, se caractérisant par l'accumulation de cellules myéloïdes immatures qui ne suivent pas le chemin classique de différenciation. Ces cellules immatures présentent alors un programme d'activation (activation pathologique) différent de celui des cellules myéloïdes matures (Bronte et al., 2016). Deux sous-types majoritaires de MDSCs (les G-MDSCs et les M-MDSCs) peuvent alors être produits. Ces cellules peuvent se retrouver aussi bien dans la moelle osseuse, que dans la rate, les poumons, le sang périphérique et les tumeurs (Fleming et al., 2018).

#### 3.1.2.3.2.2. Sous-types et phénotypes

En se basant sur leurs caractéristiques phénotypique et morphologique, deux sous-populations de MDSCs peuvent être distinguées : les PolyMorphoNucléaires (PMN-MDSCs) appelés également Granulocytaires (G-MDSC) et les Monocytaires (M-MDSC) (Bronte et al., 2016). Au sein de la tumeur, la proportion de ces deux sous-types cellulaires dépend du type de cancer ainsi que de l'état de progression de la maladie (Gabrilovich, 2017; Law et al., 2020), même si d'une manière générale, ce sont les G-MDSC qui sont les plus prédominants avec une moyenne de 80% (Fleming et al., 2018). Dans le cancer du sein, par exemple, les G-MDSCs semblent être retrouvées majoritairement par rapport aux M-MDSCs (Gabrilovich, 2017; Law et al., 2020), cependant l'effet immunosuppresseur le plus intense est associé aux M-MDSCs dans la majorité des cas (Dolcetti et al., 2010; Kumar et al., 2016; Law et al., 2017; Movahedi et al., 2008).

Les G-MDSCs (Rapoport et al., 2020) et les M-MDSCs ressemblent morphologiquement et phénotypiquement aux neutrophiles et aux monocytes immatures respectivement, mais sont fonctionnellement différents. Ainsi ils expriment des marqueurs de lignées cellulaires myéloïdes mais ils manquent de marqueurs de maturation et d'activation (Millrud et al., 2017). En effet, phénotypiquement, ces cellules peuvent exprimer différents marqueurs qui peuvent

également être différents entre la souris et l'homme. Chez la souris, les M-MDSCs vont être caractérisées sur la base de cellules CD11b+/Gr-1<sup>low</sup>/Ly6C<sup>hi</sup>/Ly6G<sup>-</sup> alors que les G-MDSC sont CD11b+/Gr-1<sup>hi</sup>/Ly6C<sup>low</sup>/Ly6G<sup>+</sup>. Chez l'homme, les M-MDSCs peuvent être soit CD14+/HLA-DR<sup>lo</sup> soit CD11b+/CD14-/CD33+/CD15-, alors que les G-MDSC sont CD11b+/CD14-/CD33+/CD15+ (Nagaraj & Gabrilovich, 2010; Youn et al., 2013). Les différents marqueurs communs ou spécifiques des M-MDSC et des G-MDSCs sont présentés dans les Tableaux 1 (souris) et 2 (Homme) (d'après (Law et al., 2020)).

Tableau 1 : Marqueurs spécifiques ou en commun des M- et G-MDSCs chez la souris (d'après Law et al., 2020).

Marqueurs	Niveau d'expression chez les M-MDSC	Niveau d'expression chez les G-MDSC	Fonction
CCR2	+++	+	Recrutement et expansion des MDSC
CCR5	+	+	Recrutement et expansion des MDSC
CD1b	+	-	Utilisé par les NKT pour cibler les MDSC pour une immunité anti-tumorale
CD11b (Mac-1)	+	+	Glycoprotéine transmembranaire impliquée dans l'adhésion et migration des leucocytes
CD38	+	+	Associé aux MDSCs immatures et à une forte suppression des LT
CD39	+	+	Ectonucleotidase de surface impliquée dans la voie adénosine inhibant l'activité des LT et des NK
CD40	+	+	Récepteur immunostimulant inhibant l'activité des LTs, et induisant l'expansion des LTReg, ainsi que l'expansion (induite par CXCR5) et l'accumulation des MDSC
CD43	?	+	Recrutement des neutrophiles. Surexprimé par les G-MDSC dans les cancers mammaires
CD45	+	+	Marqueurs des cellules immunitaires (permet de distinguer les cellules immunitaires des cellules tumorales)
CD49b (VLA4)	+	-	Marqueur spécifique des M-MDSCs qui sont des puissants supresseurs de la réponse T antigène spécifique
CD54 (ICAM-1)	+++	+	Molécule immunostimulatrice se liant à CD11b
CD62L (L-selectine)	+	+	Molécule de Homing et marqueur de sélection des CD des MDSCs
CD171 (récepteur à la transferrine)	+	-	Marqueur précoce des précurseurs érythroïdes et de prolifération
CD73	+	+++	Ectonucléotidase de surface associée à CD39 et impliquée dans la voie de l'adénosine. Inhibe l'activité des LT et des cellules NK et l'expansion des MDSCs
CD80 (B7.1)	+	+/-	Ligand de CTLA4 inhibant l'activité des LT
CD86	+	+	Ligand de CTLA4 inhibant l'activité des LT
CD98	?	+	Peut aussi être associé à la prolongation de la durée de vie des MDSC via la signalisation mTOR. Surexprimée par les G-MDSCs dans le modèle de cancers mammaires.
CD115 (M-CSFR)	+/-	+/-	Recrutement des monocytes infiltrants les tumeurs. Surexprimé par les MDSC dans de nombreux types de cancers
CD120b (TNFR2)	+(low)	+(low)	Accumulation et activation des MDSCs au sein des tumeurs
CD124 (IL-4 receptor $\alpha$ )	+/-	+/-	Survie des MDSCs et la suppression des LT par les MDSCs
CD162 (PSGL-1)	+	+	Affect l'adhésion et la rentrée des LT dans les sites d'inflammation

CD244	-	+/-	Récepteur de surface exprimé par les CD, les cellules NK et les LT. Surexprimé par les MDSCs dans de multiples types de cancers
CD279 (PD-L1)	+	+	Inhibition de l'activation des LT
CX3CR1	+	+	Recrutement et expansion des MDSCs (via CCL26 secrété par les cellules tumorales en hypoxie)
CXCR1	+	+	Recrutement et expansion des MDSCs
CXCR2	+	+	Recrutement et expansion des MDSCs
CXCR4	+	+	Recrutement et expansion des MDSCs
F4/80	+/-	-	Marqueur pour distinguer les M-MDSCs des macrophages
Gr-1	+	+++	Reconnait les épitopes dans Ly6G et Ly6C
Ly6C	+++	+	Antigène de différenciation exprimé par les précurseurs des M-MDSC, macrophages et CD8
Ly6G	-	+++	Antigène de différenciation exprimé par les G-MDSC, neutrophiles, monocytes et granulocytes
Mac-2 (galectine-3)	+++	+	Recrutement des MDSCs via la voie GM-CSF induisant l'apoptose des LT via Tim3
CMH I	+	+	Présentation de l'antigène impliqué dans l'activation de l'immunité adaptative
CMH II	+/-	+/-	
Sca-1, Ly6A/E	+	+	Marqueur des cellules souches hématopoïétiques
VEGFR	+	+	Récepteur au VEGF stimulant l'angiogenèse et le recrutement et l'activité des MDSCs. Les MDSCs VEGFR+ sont plus immunosuppressives que celles ne l'exprimant pas

Tableau 2 : Marqueurs spécifiques ou en commun des M- et G-MDSCs chez l'homme (d'après Law et al., 2020).

Marqueurs	Niveau d'expression chez les M-MDSC	Niveau d'expression chez les G-MDSC	Fonction
CCR2	+++	+	Recrutement et expansion des MDSC
CXCR4	+	+	Recrutement et expansion des MDSCs
CD11b	+	+	Glycoprotéine transmembranaire impliquée dans l'adhésion et migration des leucocytes
CD13	+	+++	Motilité cellulaire
CD14	+++	-	Antigène de différenciation exprimé par les précurseurs des M-MDSCs, macrophages et CDs
CD15	-	+	Antigène de différenciation exprimé par les G-MDSCs, neutrophiles, monocytes et les granulocytes
CD16 (FcγR)	+++	+/-	Marqueur utilisé pour distinguer les G-MDSCs (CD16+) des MDSC immatures (CD16-) dans le sang circulant
CD33	+++	+	Marqueur myéloïde
CD34	+++	+	Marqueur des progéniteur hématopoïétiques utilisé pour distinguer les MDSCs immatures
CD38	+	+	Son expression est associée à un mauvais pronostic
CD39	+	+	Ectonucleotidase de surface impliquée dans la voie adénosine inhibant l'activité des LT et des NK et induit une protection des cellules tumorales contre la chimiothérapie
CD45	+	+	Marqueurs des cellules immunitaires (permet de distinguer les cellules immunitaires des cellules tumorales)
CD62L (L-selectine)	+	+	Molécule de Homing impliquée dans la circulation des MDSCs
CD66b	-	+	Marqueur de différenciation exprimé par les G-MDSCs
CD68	+	-	Marqueur spécifique des macrophages, permet de différencier les TAM des M-MDSCs
CD73	+	+	Ectonucléotidase de surface impliquée dans la voie de l'adénosine. Inhibe l'activité des LT et des cellules NK et induit une protection des cellules tumorales contre la chimiothérapie
CD80	+/-	-	Ligand de CTLA4 inhibant l'activité des LT
CD83	+/-	-	Activation de l'activation et la suppression des cellules immunitaire
CD86	+/-	-	Ligand de CTLA4 inhibant l'activité des LT
CD115 (M-CSFR)	+/-	+/-	Recrutement des monocytes infiltrants les tumeurs
CD117 (cKIT)	+/-	+	Marqueur des précurseurs des granulocytes-monocytes. Surexprimé dans le cancer colorectal
CD124 (IL-4 receptor α)	+	+	Survie des MDSCs et la suppression des LT par les MDSCs
CD163	+	-	Marqueur spécifique des macrophages utilisé pour distinguer les TAM des M-MDSCs
CXCR1	+	+	Recrutement et expansion des MDSCs
CXCR2	+	+	Recrutement et expansion des MDSCs
Lin	+/-	+/-	Marqueur de cellules matures
VEGFR	+	+	Surexprimé chez les patients atteints d'un cancer rénal

### 3.1.2.3.2.3. Recrutement et activation

Le recrutement des MDSCs au sein du MET est une étape indispensable à l'exercice de leur fonction immunosuppressive. Ainsi, plusieurs chimiokines sont secrétées par ce même MET, afin de permettre l'infiltration des tumeurs par ces cellules immunosuppressives, suite à leur fixation sur leurs récepteurs spécifiques. C'est ainsi que le couple CCL2 (C-C motif chemokine ligand 2) et son récepteur CCR2 (C-C chemokine receptor 2) (Chang et al., 2016; Karin & Razon, 2018; Lesokhin et al., 2012; Weber et al., 2018) est décrit pour jouer un rôle important dans le recrutement intra-tumoral des cellules M-MDSC (Blattner et al., 2018; Hawila et al., 2017; Karin & Razon, 2018), tout comme les chimiokines CCL3-5 et leurs récepteur CCR5 pour les cellules G-MDSC (Blattner et al., 2018; Hawila et al., 2017; Karin & Razon, 2018; Weber et al., 2018). Le rôle exact de ces différentes chimiokines sur le recrutement des M- ou G-MDSC reste encore discuté, puisqu'en effet, bien que CCL2 et CCL3 attirent majoritairement les monocytes / M-MDSCs et les TAM, elles permettent également le recrutement des G-MDSC / neutrophiles au sein de la tumeur (Chun et al., 2015; Reichel et al., 2012; Sica et al., 2000). D'autres études ont également montré que les M-MDSCs tumoraux pouvaient aussi sécréter les chimiokines CCL3, 4 et 5 et permettre le recrutement d'autres cellules immunosuppressives exprimant CCR5, telles que les LTreg, dans deux types de modèles tumoraux, le lymphome et le mélanome (Schlecker et al., 2012). En plus des CCL, les chimiokines CXCL (dont CXCL1, 5, 6, 8 et 12) jouent également un rôle primordial dans le recrutement des MDSCs (particulièrement les G-MDSCs) et des neutrophiles (Kumar et al., 2016). Une fois arrivées au sein de la tumeur, ces cellules vont devoir s'activer afin d'exercer leur rôle dans la promotion de la croissance et de l'évasion tumorale. Cette fonction est sous le contrôle d'un réseau complexe de facteurs solubles (IL-6, GM-CSF, IL-10, M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) et VEGF), ainsi que de ligands (TLR) et de facteurs de transcriptions (STATs). Tous ces facteurs vont coopérer afin d'aboutir à l'activation de voies de signalisation responsables de l'expansion, de l'activation ainsi que de la production de molécules immunosuppressives par les MDSCs (Gabrilovich & Nagaraj, 2009).

Outre les chimiokines et tous les autres facteurs précédemment listés, les lipides jouent également un rôle crucial dans l'activation et le fonctionnement des cellules MDSCs. En effet, les lipides sont connus pour jouer un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, de l'intégrité de la membrane cellulaire ainsi que dans la signalisation cellulaire

(Clements et al., 2018; den Brok et al., 2018; Yan et al., 2019). En effet, une forte accumulation de lipides dans les MDSC de souris ou patients porteurs de tumeur a été observée (Al-Khami et al., 2017; Veglia et al., 2019) et était corrélée à une augmentation de leur activité immunosuppressive sur les cellules T (Al-Khami et al., 2017; Hossain et al., 2015). Une inhibition de cette fonction immunosuppressive des MDSCs infiltrant les tumeurs, ainsi qu'une diminution de la croissance tumorale ont été observées, par l'équipe de Hossain *et al.*, en 2015, suite à l'inhibition de l'oxydation des acide gras (FAO : Fatty Acid Oxidation) (Hossain et al., 2015). Plus récemment, Veglia *et al.*, ont montré que la reprogrammation des PMN-MDSC était dépendante de la surexpression du transporteur des acides gras, FATP2 (Fatty Acid Transport Protein 2). En effet, l'expression de ce récepteur est corrélée à une augmentation de la fonction immunosuppressive des cellules PMN-MDSCs et de la progression tumorale. Ainsi, dans le MET, le GM-CSF va induire l'activation de la voie de signalisation STAT5 et donc l'expression du gène *FATP2* (*Slc27A2*). La présence à la membrane de ce transporteur va induire le captage de l'acide arachidonique et sa métabolisation cellulaire en PGE2, un acide gras responsable de la suppression des cellules TCD8+ (Veglia et al., 2019) (**Figure 8**). Outre la voie STAT5, la signalisation STAT3, déclenchée par le G-CSF, est aussi une voie impliquée dans la prolifération, la différenciation ainsi que l'activation des MDSCs (Gabrilovich et al., 2012). Tout comme la voie STAT5, la voie STAT3 joue un rôle important dans l'accumulation de lipides dans les MDSC. En effet, Al-Khami *et al.*, ont révélé que l'inhibition de STAT3 et de STAT5 dans les MDSC, en utilisant, respectivement, FLLL32 et pimozide, réduisait fortement l'accumulation de lipides intracellulaires, ce qui était associée à une diminution de l'activité immunosuppressive des MDSC induite par l'arginase-1, l'iNOS et l'expression de la PGE2 (Al-Khami et al., 2017).

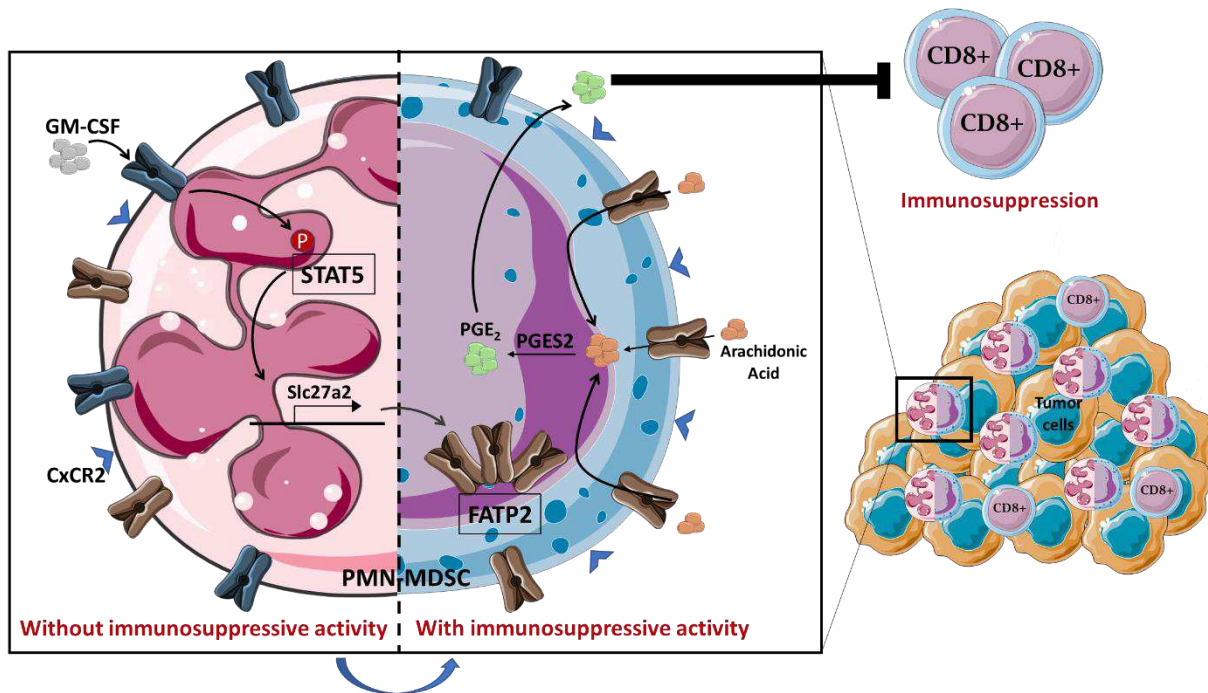


Figure 8 : Activité immunosuppressive des PMN-MDSC dépendante de l'expression de FATP2. En se fixant sur son récepteur, le GM-CSF induit la transcription du gène *slc27a2* et l'expression de la protéine FATP2, via la phosphorylation de STAT5. Ce transporteur d'acides gras va alors se localiser sur la membrane cellulaire, et permettre à la cellule de prendre en charge l'acide arachidonique, un acide gras qui, sous l'action de la PGE2 synthase (PGES2), se transforme en PGE2. Ce dernier va permettre la suppression des LT CD8+ et induire la prolifération des cellules cancéreuses. Ce mécanisme d'expression de FATP2 est donc en partie à l'origine de l'activité immunosuppressive des PMN-MDSC.

#### 3.1.2.3.2.4. Mécanismes d'action des MDSCs

Comme décrit précédemment, les MDSCs exercent un effet pro-tumorigène au sein de la tumeur en induisant un MET immunosuppresseur pauvre en LT fonctionnels. Ces MDSC pourraient donc jouer un double rôle en diminuant l'activité anti-tumorale des LT infiltrant les tumeurs mais également en réduisant le recrutement de ces LT intra-tumoraux. Un large éventail de mécanismes est utilisé par les MDSCs afin d'exercer leurs fonctions immunosuppressives, notamment l'épuisement du MET en métabolites indispensables au fonctionnement des LT, l'expression de PCIs, la sécrétion de molécules immunosuppressives, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS (Reactive Oxygen Species)) et de l'azote (RNS (Reactive Nitrogen Species)), la régulation du chimiotaxisme des LT et l'augmentation de l'expansion des cellules Treg (Sica et al., 2019). Rapoport *et al.*, ont récemment résumé ces mécanismes en deux groupes selon qu'ils étaient dépendant ou non de l'état oxydatif de la cellule (Rapoport et al., 2020), et qui concernent plus spécifiquement le sous-type G-MDSCs (Figure 9).



Le premier groupe inclut l'inactivation directe des TILs via la production des ROS comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), les ions superoxydes ( $O_2^-$ ) mais également les RNS comme le monoxyde d'azote (NO) et les peroxy-nitrites. En ce qui concerne les ROS, elles proviennent majoritairement de l'augmentation de l'activité de la NOX2 (NADPH OXydase 2), mais également de la mitochondrie (Corzo et al., 2009; Rapoport et al., 2020). Ce mécanisme semble nécessiter une interaction cellules-cellules faisant intervenir les intégrines  $\alpha_M / \beta_1$  et  $\alpha_M / \beta_2$ , qui sont exprimées par les MDSCs, et leur récepteur « la molécule d'adhésion intercellulaire, ICAM-1 », exprimé par les TILs. Cette interaction permet ainsi la mise en contact des LT avec le  $H_2O_2$  secrété par les MDSCs, et conduire donc à leur suppression (Kusmartsev et al., 2004; Pillay et al., 2012; Rapoport et al., 2020). D'autres mécanismes responsables de l'inhibition de la prolifération et de l'activation des LT par les ROS (ou précisément par le  $H_2O_2$ ) ont également été décrits (Rapoport et al., 2020; Treffers et al., 2016), tels que :

- ❖ La sous-expression de la chaîne  $\zeta$  du TCR, essentielle pour la stabilisation du TCR à la membrane plasmique. Ce mécanisme est dépendant de la tyrosine nitration du TCR, induite par les peroxy-nitrites qui sont produits en présence de NO et d'ions superoxide. Il en résulte une diminution de la capacité des TILs à reconnaître les antigènes tumoraux et donc à s'activer (Rapoport et al., 2020; Treffers et al., 2016),

- ❖ La diminution de l'expression et de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappa B) associée à une altération de la production de cytokines nécessaires à la différenciation des différents sous-types de LT (IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-2 et TNF- $\alpha$ ). Cette inhibition transcriptionnelle est réalisée à faibles concentrations de  $H_2O_2$ , une forte concentration induisant l'apoptose de ces cellules (Malmberg et al., 2001; Rapoport et al., 2020; Treffers et al., 2016),

- ❖ L'oxydation de la protéine cofiline, protéine de remodelage de l'actine et jouant un rôle important dans la formation de la synapse immunologique et dans l'activation et la migration des LT (Klemke et al., 2008; Rapoport et al., 2020; Treffers et al., 2016), et

- ❖ L'inhibition du switch métabolique conduisant la cellule à passer de la respiration mitochondriale à la glycolyse aérobie, un mécanisme indispensable à l'expansion clonale et à la production de cytokines par les cellules T (Kramer et al., 2015; Treffers et al., 2016).

Les MDSCs sont également capables, via l'expression de l'iNOS, de générer du NO pouvant jouer un rôle clé dans l'inhibition de l'activation des LT induite par les MDSCs et principalement

par les M-MDSCs ou les TANs (Rapoport et al., 2020; Treffers et al., 2016). En effet, outre la production du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les ions superoxydes O<sub>2</sub><sup>-</sup>, en interagissant avec le NO, vont induire la formation de RNS comme par exemple les peroxy-nitrites, un agent oxydant très puissant possédant une activité immunosuppressive (Treffers et al., 2016). En effet, on retrouve des concentrations élevées de ces peroxy-nitrites dans les zones d'accumulation des cellules inflammatoires et des MDSCs au sein du MET. La présence de ces zones étant associée à l'inhibition de la réponse T et à l'augmentation de la progression tumorale dans de nombreux types de cancer (Dilek et al., 2012; Kusmartsev et al., 2004; Mantovani et al., 2003; Schmielau & Finn, 2001; Szuster-Ciesielska et al., 2004; Vickers et al., 1999). Les mécanismes par lesquels les peroxy-nitrites inhibent les LTs sont multiples. En effet, ces RNS sont capables d'induire la nitration du TCR (comme précédemment décrit avec la chaîne ζ), mais également du récepteur CD8 rendant impossible la reconnaissance des Ag tumoraux via les molécules du CMH (Dilek et al., 2012; Nagaraj et al., 2007). Ces RNS peuvent également induire l'apoptose des cellules T (Rapoport et al., 2020), ou encore la diminution de leur recrutement au sein du MET suite à la nitration de certaines chimiokines dont CCL2. En effet l'équipe de Molon *et al.*, a montré que l'utilisation d'un Ac inhibant CCL2 facilite l'infiltration des tumeurs par des CTL (Molon et al., 2011). Récemment Markowitz et ses collaborateurs, ont mis en place un autre mécanisme par lequel les MDSC, productrices de NO, inhibent le système immunitaire. Ce mécanisme consiste à inhiber la présentation de l'Ag aux cellules TCD4<sup>+</sup> par les CD. Ceci est possible via la nitration de la Tyr701 de STAT1, un facteur de transcription jouant un rôle primordial dans la voie de signalisation utilisée par les CD pour présenter l'Ag (Markowitz et al., 2017).

Le deuxième groupe de mécanismes d'immunosuppression des MDSCs, indépendants de l'état oxydatif comprend :

- ❖ L'épuisement du MET en acides aminés (AA) essentiels au fonctionnement des LT, comme par exemple l'arginine. Cet AA joue un rôle primordial dans l'internalisation et la réexpression de la chaîne ζ du TCR. Zea et ses collaborateurs ont montré que l'absence de cet AA induit une anomalie au niveau de l'expression du TCR et donc l'anergie des LT et la diminution de la production de cytokines, comme l'IFN-γ, l'IL5, et l'IL-10 (Weber et al., 2018; Zea et al., 2004). C'est sous l'effet de l'arginase (secrétée par les granules tertiaires des G-MDSCs) (Treffers et al., 2016) mais également de l'iNOS (exprimée par les MDSCs) que l'arginine peut être transformée en L-ornithine et urée ou en L-citrulline et NO respectivement, limitant

ainsi la disponibilité de cet AA aux LT (Rapoport et al., 2020). L'arginine n'est pas le seul AA ciblé par les MDSC puisque ces dernières induisent également l'épuisement de la cystéine, via la séquestration de la cystine (Srivastava et al., 2010). Elles induisent aussi la réduction du tryptophane par l'IDO (J. Yu et al., 2013) en métabolites cytotoxiques, appelés kynurenine, responsables de l'inhibition de la cytotoxicité des LT mais aussi de l'augmentation de la différenciation intra-tumorale des LT CD4<sup>+</sup> en LTreg (Moon et al., 2015; J. Yu et al., 2013),

❖ L'augmentation de l'infiltration des tumeurs par les LTreg. En effet, plusieurs études ont montré que les MDSCs, via la production de cytokines telles que l'IL-10 et le TGFβ1 (Huang et al., 2006; Park et al., 2018; Pistoia et al., 2013; Rapoport et al., 2020; Sinha et al., 2007; Weber et al., 2018; Yang et al., 2020), ou de chimiokines, ligands du récepteur CCR5, telles que le CCL3, CCL4 et CCL5 permettent le recrutement des LTreg au sein des tumeurs (Schlecker et al., 2012; Yang et al., 2020) ainsi que leurs différenciation et /ou prolifération (Huang et al., 2006; Rapoport et al., 2020). L'expression du récepteur immunostimulant (CD40) par les MDSCs, semble également être un mécanisme à l'origine du recrutement et de l'accumulation des cellules Treg (Pan et al., 2010). Enfin, il a été montré qu'à la différence des autres sous-types de LT, les LTreg sont beaucoup moins sensibles au stress oxydatif induit par les MDSCs et donc à l'immunosuppression induite par ces cellules. En effet, ces Tregs sont de très puissants immunoinhibiteurs capables à eux seuls d'induire une exacerbation du stress oxydatif et du dysfonctionnement immunitaire au sein de la tumeur (Mougiakakos et al., 2011; Mougiakakos et al., 2009).

❖ La sécrétion de protéases (provenant des granules primaires des G-MDSC) telles que les sérines protéases, les élastases, la protéinase-3 et la cathepsine-G. Ces protéases, via le clivage de certaines cytokines, comme le TNF-α, l'IL-2 et l'IL-6, et récepteurs de cytokines, comme l'IL-2R et l'IL-6R, induisent une inhibition de l'activation des LT (Ariel et al., 1998; Bank & Ansorge, 2001; Bank, Küpper, et al., 1999; Bank, Reinhold, et al., 1999; Nortier et al., 1991; Scuderi et al., 1991).

❖ La production et la sécrétion de molécules ayant une fonction immunosuppressive comme la PGE2. En effet, la PGE2 une fois produite et sécrétée, interagit avec son récepteur (PGE2R) exprimé par les LT CD8<sup>+</sup>, atténuant ainsi leur activité anti-tumorale (Rapoport et al., 2020). Une autre molécule immunosuppressive est l'adénosine. Ainsi, c'est suite à la surexpression des endonucléotidases CD39 (nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) et CD73 (ecto-5'-nucleotidase) par les MDSCs intra-tumoraux, que l'ATP ou l'ADP est hydrolysé en

AMP qui à son tour est clivé en adénosine (Groth et al., 2019; Limagne et al., 2016; Yang et al., 2020). L'interaction de l'adénosine avec son récepteur A2A exprimé par les cellules TCD8+ infiltrant les tumeurs induit la formation de cAMP (cyclic Adenosine MonoPhosphate) après activation de l'adénylyl cyclase, et l'inhibition de l'activation et de la fonction effectrice de ces cellules T (Antonioli et al., 2013; Rapoport et al., 2020; Yang et al., 2020),

- ❖ L'expression abondante sur ces MDSC de PCIs tels que PD-L1 (Lu et al., 2016) ou encore de molécules induisant la mort par apoptose des LT (FasL) (Zhu et al., 2017), et

- ❖ La diminution de l'expression de récepteurs impliqués dans le chimiotactisme des LT vers les ganglions lymphatiques. En effet, en 2016, Ku *et al.*, ont montré que les MDSCs étaient capables de diminuer l'expression de la L-sélectine, récepteur responsable du chimiotactisme des LT naifs et LB vers les ganglions lymphatiques (Ku et al., 2016). De plus, ces MDSCs induisent la diminution de l'expression de la E-sélectine par les cellules endothéliales, via la production de NO, ainsi que la nitration de la chimiokine CCL2, les deux étant impliqués dans la migration des LT au sein de la tumeur (Gehad et al., 2012; Molon et al., 2011).

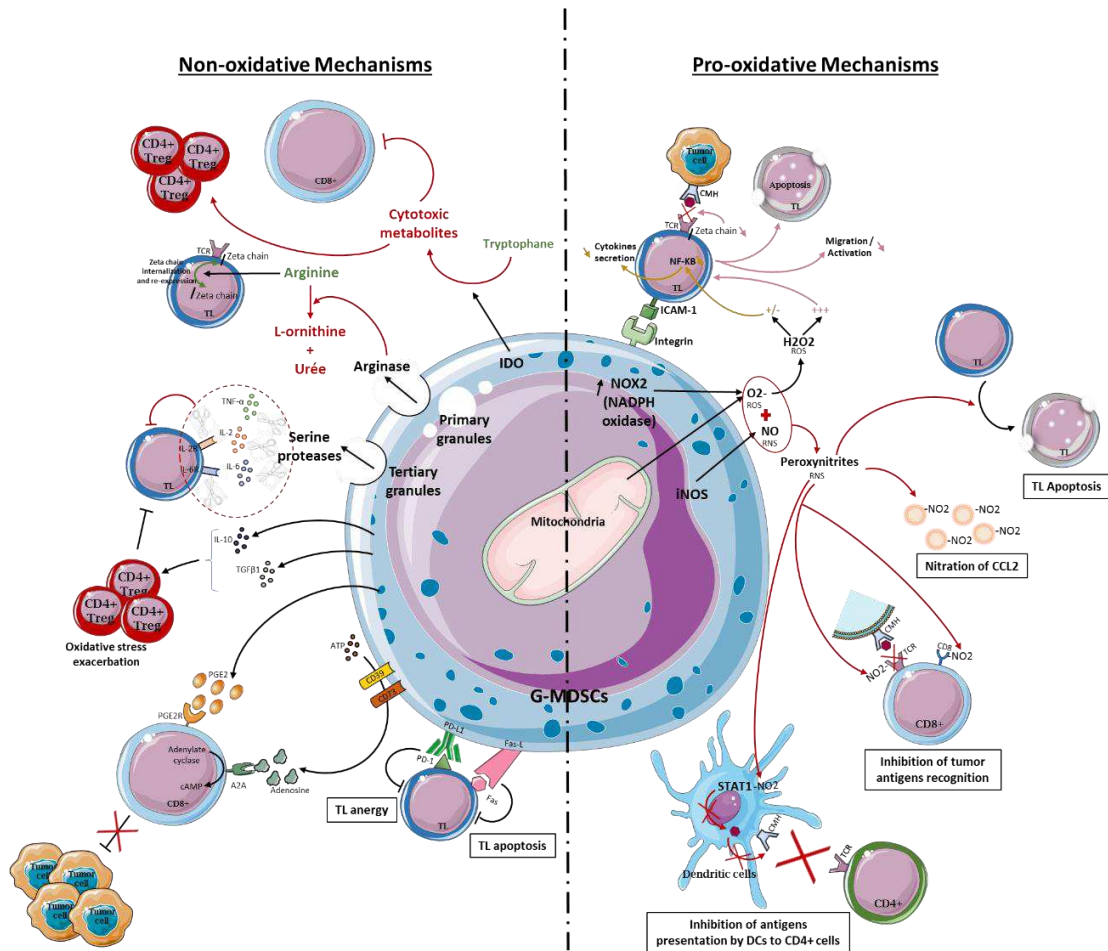


Figure 9 : Mécanismes liés à l'immunosuppression induite par les G-MDSCs. Deux groupes de mécanismes sont à l'origine de l'immunosuppression induite par les G-MDSCs : les mécanismes pro- et non-oxydatifs. Les mécanismes pro-oxydatifs sont basés sur la production abondante de ROS via l'activation mitochondriale et la surexpression de la NOX2, mais également de RNS via l'induction de l'iNOS et la production de NO. 1) Effet des ROS : une fois synthétisé et sécrété, le H2O2 induit la suppression ainsi que la diminution de la migration et de l'activation des LT quand il est sécrété à forte concentration. Il peut également induire la sous-expression de la chaîne  $\zeta$  du TCR, et donc la diminution de la stabilisation du TCR à la membrane plasmique et de la reconnaissance des antigènes tumoraux. En revanche, à faible concentration, le H2O2 induit une diminution de l'expression et de l'activation de NF- $\kappa$ B. Il en résulte une altération de la production de cytokines impliquées dans la différenciation des sous-types de LT ; 2) Effet des RNS : l'expression de l'iNOS conduit à la production et libération du NO par les MDSCs, qui en interagissant avec les anions superoxydes  $O_2^-$  conduit à la formation de peroxy-nitrites, agents oxydants très puissants et possédant une activité immunosuppressive. Les mécanismes par lesquels les peroxy-nitrites inhibent les LT sont multiples : nitration du TCR et du récepteur CD8 rendant impossible la reconnaissance des Ag tumoraux via le CMH ; nitration de la chimiokine CCL2 et diminution du recrutement des LT au sein du MET ; nitration de la Tyr701 de STAT1, facteur de transcription jouant un rôle primordial dans la voie de signalisation utilisée par les CD pour présenter les Ag. Les mécanismes indépendants de l'état-oxydatif comprennent : l'épuisement du MET en AA essentiels au fonctionnement des LT (arginine et tryptophane). Ainsi, c'est en réponse à l'arginase (secrétée à partir des granules tertiaires) et à l'IDO, que l'arginine est transformée en L-ornithine et urée, et le tryptophane est réduit en métabolites cytotoxiques respectivement. Il en résulte donc une dérégulation de l'internalisation et de la réexpression de la chaîne  $\zeta$  du TCR (arginase), l'inhibition de la cytotoxicité des LT CD8+ et l'augmentation de la différenciation des LT CD4+ en LTreg (IDO) ; l'augmentation de l'infiltration des tumeurs par les LTreg via la production d'IL-10 et de TGF $\beta$ 1 ou encore de chimiokines, tel que le CCL3, CCL4 et CCL5 (ligands du récepteur CCR5). Tout comme les MDSCs, ces TReg sont également capables d'induire un stress oxydatif et un dysfonctionnement immunitaire au sein de la tumeur ; la sécrétion de protéases à partir des granules primaires, qui via le clivage de certaines cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6) et récepteurs de cytokines (IL-2R et IL-6R) induisent une inhibition de l'activation des LT ; la production de molécules immunosuppressives (PGE2, l'adénosine). La PGE2 interagit avec son récepteur exprimé par les LT CD8+ afin d'atténuer leur activité anti-tumorale. L'adénosine est produite à partir de l'hydrolyse de l'ATP en AMP par les endonucléotidases CD39 (ATP  $\rightarrow$  AMP) et CD73 (AMP  $\rightarrow$  adénosine) exprimées par les MDSCs intra-tumoraux. Une fois produite, l'adénosine interagit avec son récepteur A2A exprimé par les cellules TCD8+ infiltrant les tumeurs, et induit la formation de la cAMP responsable de l'inhibition de la fonction effectrice de ces cellules T ; l'expression abondante de PCI (PD-L1) ou de FasL induisant, respectivement, l'anergie et l'apoptose des cellules T.

### 3.1.2.3.2.5. MDSCs et cancer

Les cellules MDSCs ont été identifiées dans de nombreux types de cancer tels que les mélanomes (Jiang et al., 2015; Jordan et al., 2013; Weide et al., 2014), les myélomes multiples (Brimnes et al., 2010), les cancers hépatocellulaires (Hoechst et al., 2008), le NSCLC (Liu et al., 2010), le cancer rénal et pancréatique (Z. Wang et al., 2016), le cancer de la prostate (Vuk-Pavlović et al., 2010), le cancer colorectal (Chun et al., 2015) mais également dans le cancer du sein (Danilin et al., 2012; Diaz-Montero et al., 2009; Duechler et al., 2014; Li et al., 2018; J. Yu et al., 2013). Leur présence est dans la majorité des cas associée à un mauvais pronostic, à un taux de survie globale faible et parfois même à une inefficacité des thérapies anti-cancéreuses (Bergenfelz, Larsson, et al., 2015; Markowitz et al., 2013; Shou et al., 2016; Solito et al., 2011). De plus, un fort taux de MDSCs dans le sang des patientes atteintes d'un cancer du sein a été corrélée à un taux élevé d'apparition de métastases (Bergenfelz, Larsson, et al., 2015; Diaz-Montero et al., 2009; Waight et al., 2013). A l'inverse, des taux faibles de MDSCs circulants étaient corrélés à des réponses pathologiques complètes élevées en réponse à des traitements anti-cancéreux dans le cancer du sein HER2- (Montero et al., 2012). Ainsi dans une étude portant sur une cohorte de patients porteurs de cancers solides (dont le sein) à différents stades de la maladie, les chercheurs ont pu établir une forte corrélation entre le pourcentage des MDSCs et le stade clinique de la maladie, avec le taux le plus élevé observé chez les patients appartenant au stade IV et présentant une charge tumorale métastatique (Diaz-Montero et al., 2009). En utilisant un modèle de souris transgénique IRF8 (Interferon Regulatory Factor 8)-Tg, dans lequel la myélopoïèse est intacte et l'accumulation des MDSCs est faible, il a été montré que le taux de développement des métastases était significativement plus faible par rapport aux souris WT (Waight et al., 2013). Plus récemment, Bergenfelz *et al.*, ont montré que la présence de cellules CD14<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>low/-</sup>/CD86<sup>low/-</sup>/CD80<sup>low/-</sup>/CD136<sup>low/-</sup> correspondant aux M-MDSCs, était corrélée à la progression de la maladie ainsi qu'à l'apparition de métastases dans les ganglions lymphatiques et les organes viscéraux chez les patientes atteintes d'un cancer du sein (Bergenfelz, Larsson, et al., 2015). Ces différents travaux suggèrent que le taux des MDSCs circulants pourrait être utilisé comme biomarqueur pronostic dans le cancer du sein.

L'inhibition directe (Ac spécifiques) ou indirecte (chimiothérapies) de ces cellules en association ou non avec d'autres thérapies anti-cancéreuses semble être une stratégie prometteuse dans le traitement de nombreux types de cancers dont le cancer du sein. En effet, certaines chimiothérapies se sont révélées inhiber le recrutement des MDSCs dans plusieurs types de cancers. Parmi ces chimiothérapies, on trouve le paclitaxel dans le mélanome (Sevko et al., 2013), la gemcitabine dans le cancer du pancréas (Bunt et al., 2013; Eriksson et al., 2016), le 5-FU dans le lymphome (Vincent et al., 2010), le FOLFOX (association de l'acide folinique avec du 5-fluorouracile et de l'oxaliplatine) dans le cancer colorectal (Kanterman et al., 2014), le sunitinib (inhibiteur de tyrosine kinase) dans le cancer rénal métastatique (Ko et al., 2010; Ozao-Choy et al., 2009; Xin et al., 2009), la doxorubicine (Alizadeh et al., 2014; Yuan et al., 2019) et la gemcitabine (Le et al., 2009) dans le cancer du sein (Suzuki et al., 2005) et d'autres encore.

D'autres stratégies ciblant les MDSCs ont été également développées et vont cibler spécifiquement leur différenciation, expansion, recrutement intra-tumorale ou encore leur activité immunosuppressive (Albeituni et al., 2013; Anani & Shurin, 2017; Weber et al., 2018) (**Figure10**) :

❖ Induction de la différenciation des MDSCs en cellules matures : différentes molécules ont été mises en évidence pour permettre la différenciation des MDSCs, telles que les vitamines A et D3, quelques chimiothérapies appartenant à la famille des taxanes (docetaxel et paclitaxel), les particules  $\beta$ -glucane (ou WGP (Whole-glucan particles)), les inhibiteurs de la voie TLR-9, le curcumin (inhibiteur d'IL-6), l'IL-2 et l'IL-12. Les protéoliposomes de très petites tailles, et l'ATRA (All-Trans Retinoic Acid), un inhibiteur de la voie de signalisation de l'Acide rétinoïque, sont également des molécules capables d'induire la différenciation des MDSCs en APC matures (CDs et macrophages) (Albeituni et al., 2013; Anani & Shurin, 2017; Nefedova et al., 2007; Singh et al., 2013; Steding et al., 2011; Tu et al., 2012). ATRA, a été utilisé dans deux essais cliniques, sur des patients atteints de cancer rénal métastatique (Mirza et al., 2006) ou de poumons à petites cellules (Iclozan et al., 2013). Son utilisation a été associée à une amélioration de la survie de ces patients. Dans le premier essai clinique, ATRA induisait la diminution de la fréquence des cellules MDSCs sanguines avec une activation de la réponse des LT spécifiques des Ag via l'activation des CD (Mirza et al., 2006). En revanche, dans le deuxième essai, ATRA s'est révélé induire une augmentation des cellules TCD8<sup>+</sup> Granzyme<sup>+</sup> lorsqu'il était associé à un vaccin à base de CD transduites avec la protéine p53 WT (Iclozan et al., 2013). Un autre

essai clinique de phase II réalisé sur des patients atteints d'un mélanome avancé et traités avec ipilimumab en association ou non avec ATRA, a montré que ce dernier induit une diminution de la fréquence des MDSCs circulants par rapport à l'ipilimumab seul (Tobin et al., 2018). Dans des modèles précliniques de cancer du sein, des effets promoteurs de cette molécule, en association avec un traitement anti-angiogénique inhibant VEGFR2, ont été également observés, avec une diminution de l'accumulation intra-tumorale des cellules MDSCs et une augmentation de l'efficacité thérapeutique de l'anti-VEGFR2 (Bauer et al., 2018).

❖ Inhibition de l'expansion des MDSCs : différents agents chimio-thérapeutiques, tels que la gemcitabine, le 5-fluoro-uracile et le sunitinib (Albeituni et al., 2013), des inhibiteurs de COX2 (CycloOXYgénase 2) et de PGE2, tels que l'indométhacine (Levin et al., 2000), le celecoxibe (Leahy et al., 2002; Veltman et al., 2010), le meloxicame (Tsubouchi et al., 2000) et l'acide acétyl-salicylique (Fujita et al., 2011), se sont révélés inhiber l'accumulation des MDSCs et la croissance tumorale dans plusieurs types de cancers. D'autres molécules, tels que les inhibiteurs du facteur des cellules souches (SCF (Stem Cell Factor)) (Pan et al., 2008) et les amino-biphosphonates (inhibiteurs des métalloprotéinase-9 produites par les cellules tumorales et stromales) induisent également une diminution de l'expansion des MDSCs et une amélioration de la réponse anti-tumorale dans le cancer du sein (Melani et al., 2007).

❖ Inhibition du recrutement intratumorale des MDSCs : ce mécanisme peut être réalisé par des inhibiteurs pharmacologiques du CSF1R (GW2580) (Priceman et al., 2010; Xu et al., 2013) ou du G-CSF (BMP4 : membre de la famille TGF- $\beta$ ). L'utilisation de BMP4 a, en effet, montré une réduction du taux de G-CSF et une diminution de l'expansion et de la capacité immunosuppressive des MDSC chez les souris porteuses de tumeurs (Cao et al., 2014). D'autres molécules vont cibler plus spécifiquement les récepteurs impliqués dans le chimiotactisme / recrutement des MDSCs tels que CXCR2 / CXCR4. Ainsi, des antagonistes de ces récepteurs, tels que le SB-265610 (antagoniste de CXCR2) (F. Yu et al., 2013) ou le AMD3100, le POL5551 et le T104 ... (antagonistes de CXCR4) (Chen et al., 2019; Cortés et al., 2018; Xiang et al., 2015; Xu et al., 2015; F. Yu et al., 2013), ainsi que des inhibiteurs de CCR2 (silibinin) et d'autres encore, ont permis la diminution de la migration des MDSCs vers la tumeur (Forghani et al., 2014). Plus récemment, il a été mis en évidence que l'inhibition de c-MET, un récepteur à activité tyrosine kinase intervenant dans la prolifération, la survie et la migration cellulaire, induit l'inhibition du recrutement dans la tumeur mais également dans les ganglions lymphatiques des neutrophiles. Cette inhibition de c-MET était corrélée à une potentialisation de l'immunité anti-tumorale,



avec une amélioration de l'efficacité du transfert adoptif des cellules T et des inhibiteurs des PCIs (Glodde et al., 2017).

❖ Destruction des MDSCs via l'induction de la dégradation de l'éphrine A2, en utilisant les inhibiteurs de l'IL-13, ou les bloqueurs d'histamine ou encore quelques agents cytotoxiques (Anani & Shurin, 2017) comme la doxorubicine. Cette anthracycline était capable de déclencher l'apoptose des MDSCs via un mécanisme lié aux ROS dans le cancer du sein (Alizadeh et al., 2014).

❖ Inhibition de la fonction immunosuppressive des MDSCs : différentes cibles moléculaires ont été testées avec par exemple celles ciblant l'inhibition du NO, des ROS (ex. le triterpénoides (CDDO-Me)) et des RNS (ex. l'AT38 [3-(aminocarbonyl) furoxan-4-yl] methyl salicylate). Ainsi l'AT38 a été mis en évidence pour induire une diminution de l'arginase 1, de l'iNOS et des peroxynitrites dans les MDSCs dans plusieurs modèles de cancer. On retrouve également l'inhibition des exosomes dérivés de tumeurs via l'utilisation de l'amiloride. Ce traitement était capable d'induire la diminution de l'activité suppressive des MDSCs circulants prélevés à partir de patients atteints d'un cancer colorectal métastatique. Il y a également les inhibiteurs de la phosphodiesterase-5 (eg. sildenafil) ayant montré une restauration de la prolifération des cellules TCD8+ aussi bien chez l'homme que chez la souris (Albeituni et al., 2013; Anani & Shurin, 2017). Une régulation du recrutement et de l'activité immunosuppressive des MDSCs par la voie de signalisation du complément (C5a et son récepteur C5aR1) a également été mise en évidence par Markiewski *et al* (Markiewski et al., 2008). Ainsi, l'inhibition pharmacologique de C5aR induisait un ralentissement de la croissance tumorale. Plusieurs autres études ont également montré l'implication de cette voie du complément dans la fonction suppressive des MDSCs, et l'efficacité thérapeutique de son inhibition dans le traitement de nombreux types de cancers (Y. Wang, H. Zhang, et al., 2019). Enfin plus récemment, il a été montré que l'utilisation d'un agent pharmacologique, le lipofermata, inhibant de manière sélective le transporteur FATP2, induisait la diminution de la fonction immunosuppressive des cellules G-MDSCs et la diminution de la progression tumorale dans les souris porteuses d'un cancer du poumon (cellules LLC). Cet effet était fortement potentialisé quand le lipofermata est associé à un inhibiteur de PCI, l'anti-CTLA4 (Veglia et al., 2019).

Toutes ces stratégies de thérapies visent à réduire le potentiel immunosuppresseur du MET puisqu'en effet, malgré les progrès réalisés dans les thérapies anti-cancéreuses, le CSTN reste un cancer très agressif et difficile à soigner de par sa forte hétérogénéité inter et intra-tumorale (Roulot et al., 2016). Combiner des thérapies existantes avec des molécules pouvant moduler le microenvironnement immunitaire tumoral reste une stratégie prometteuse pour améliorer le pronostic de ces patientes. Dans ce contexte, l'utilisation de donneurs de NO, tel que le GTN, pourrait être une des stratégies envisagées.

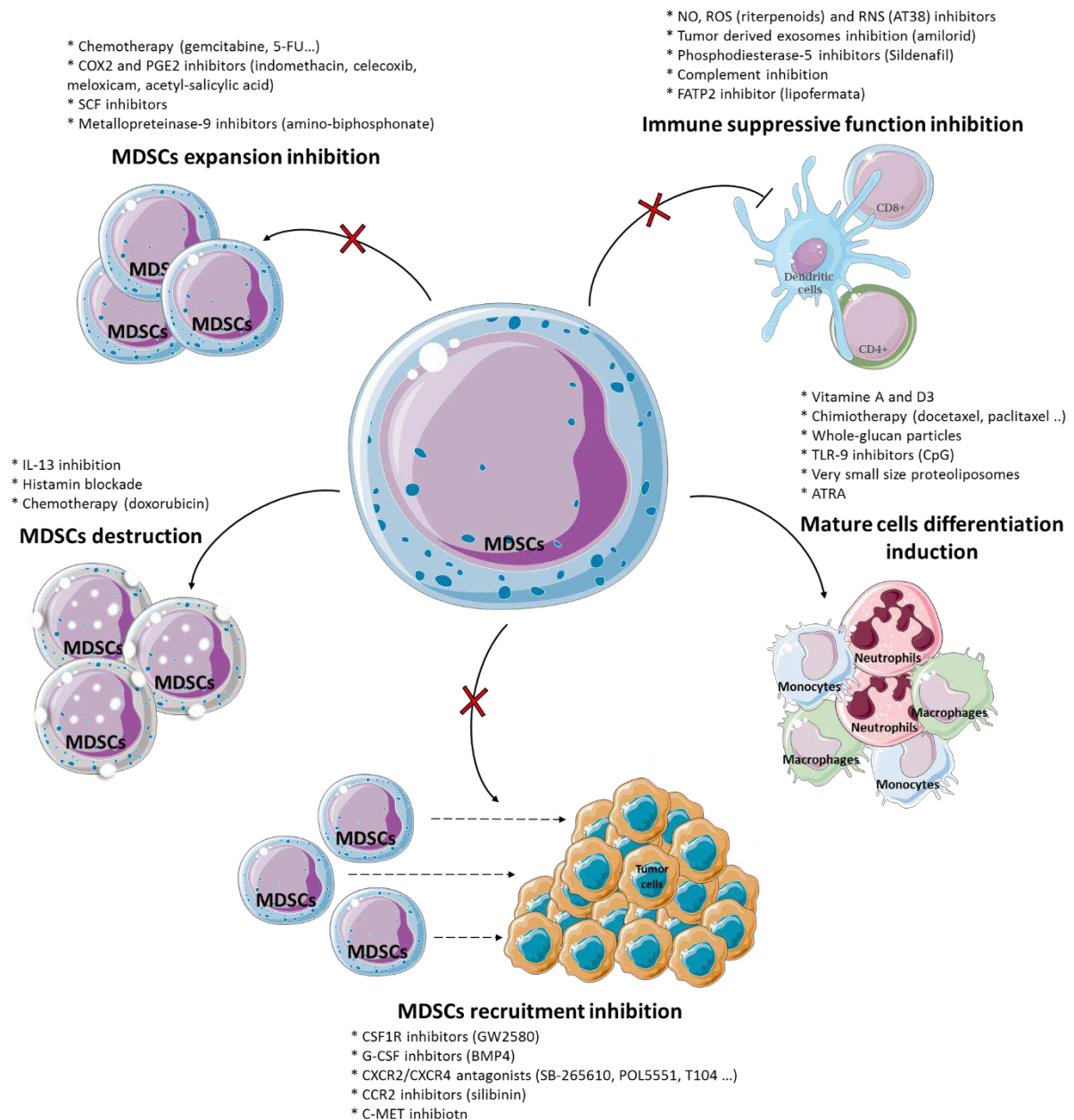


Figure 10 : *Thérapies ciblant les MDSCs dans le traitement du cancer.* Les stratégies de traitement ciblant les MDSCs ont tenté d'inhiber leurs développement et expansion (quelques chimiothérapies, des inhibiteurs de la PGE2 et COX2, de SCF ou de la métalloprotéinase 9), d'inhiber leurs fonction immunosuppressive (inhibition du NO, des ROS, des RNS, et du complément, l'amiloride, le Sildenafil et la lipofermate), d'induire leurs différenciation en cellules matures (quelques chimiothérapies, la vitamine A et D3, l'ATRA, inhibiteurs de TLR-9, protéoliposomes de très petite taille ...), d'inhiber leurs migration et recrutement intra-tumoral (les inhibiteurs de CSF1R, de G-CSF et de CXCR2, CXCR4, CCR2 et c-MET) ainsi que d'induire leurs élimination directe (quelques agents cytotoxiques, anti-IL-13 et les bloqueurs d'histamine).

### 3.1.3. Le monoxyde d'azote comme immunothérapie

#### 3.1.3.1. Généralités sur le NO

La découverte du NO est attribuée à Furchgott et Zawadzki en 1980, qui ont mis en évidence la libération d'un vasodilatateur suite à la stimulation des cellules endothéliales par différents agonistes. Ils ont alors nommé ce composé EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor) (Blaise et al., 2005; Furchgott & Zawadzki, 1980). EDRF a été décrit comme faisant partie des différents polluants présents dans l'air mais également comme étant un agent cancérigène. C'est dans les années 90 que cette molécule change de nom pour s'appeler monoxyde d'azote (Blaise et al., 2005; Maher et al., 2017). Les travaux menés sur cette molécule ont permis aux trois chercheurs Murad F (Katsuki et al., 1977), Furchgott R (Furchgott & Zawadzki, 1980) et Ignarro L (Ignarro et al., 1987) de bénéficier du prix Nobel en Physiologie et Médecine en 1998.

Le NO est une molécule gazeuse de très petite taille, non chargée, instable, hautement réactive et lipophile. Toutes ces propriétés lui confèrent la possibilité de traverser les membranes cellulaires ainsi que les organelles subcellulaires afin d'exercer ses rôles, physiologiques ou pathologiques, dans le corps humain (Holotiuk et al., 2019). La production endogène du NO est dépendante de l'activité d'une famille d'enzymes, les NOS, qui catalysent sa synthèse à partir de la L-Arginine en présence d'oxygène (O<sub>2</sub>) et de co-facteurs (Bredt, 1999). Trois isoenzymes exprimées par différents types cellulaires ont été identifiées et caractérisées (Yang et al., 2009). Les NOS neuronales (nNOS ou NOS1) et endothéliales (eNOS ou NOS-3) sont constitutivement exprimées et leur activité est dépendante du calcium (Ca<sup>2+</sup>). L'iNOS ou NOS2 est une NOS inductible, indépendante du taux de calcium et dont l'expression est induite en réponse à différentes cytokines inflammatoires et produits bactériens tels que le LPS (LipoPolySaccharide). L'expression de cette enzyme va générer de fortes concentrations de NO (micromolaire), alors que les NOS dépendantes du Ca<sup>+</sup> produisent de plus faibles quantités de NO (nanomolaire) (Keshet & Erez, 2018). L'iNOS va pouvoir être exprimée dans un large éventail de cellules et tissus tels que les macrophages, monocytes, hépatocytes, neutrophiles, cellules micro- et astrogliales, cellules endothéliales et épithéliales (Alderton et al., 2001; Holotiuk et al., 2019; Litvinova et al., 2015; Switzer, Ridnour, et al., 2012). Toutes ces enzymes sont majoritairement localisées dans le cytosol et dans le noyau. Beaucoup plus récemment, une potentielle quatrième NOS a été mise en évidence dans la mitochondrie (mtNOS) (Kamm et al.,

2019) et elle pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'activité mitochondriale NO-dépendante (Ghafourifar & Cadenas, 2005; Haynes et al., 2004; Litvinova et al., 2015).

La réaction menant à la production du NO est identique pour tous ces isoformes. En effet, ces enzymes ont besoin d'O<sub>2</sub>, de NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate), de FAD (Flavine Adénine Dinucléotide), de FMN (Flavine adénine MonoNucléotide), du cofacteur BH<sub>4</sub> (tetrahydrobipeptine) et de la calmoduline +/- Ca<sup>2+</sup>, pour générer du NO et de la L-citrulline à partir de la L-arginine (Kamm et al., 2019). Une autre origine du NO serait la réduction des nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) et des nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) qui sont soit emmenés à partir d'une source exogène (consommation de légumes, fruits ..), soit synthétisés de manière endogène à partir de la L-arginine dans une réaction catalysée par les NOS. Les nitrites peuvent également provenir de la réduction des nitrates (Kamm et al., 2019). Une fois produit, le NO agit sur plusieurs protéines ou enzymes et joue un rôle essentiel dans plusieurs processus physiologiques mais également pathologiques tels que le cancer.

#### 3.1.3.2. Implication du NO dans le cancer

Les fonctions du NO en physiologie ont été bien décrites avec une intervention de cette molécule dans le système cardiovasculaire en tant que vasodilatateur mais également dans le système nerveux centrale en régulant l'approvisionnement cérébrale en sang et ainsi jouant un rôle dans la neurotransmission et la mémoire, et dans le système immunitaire en participant à la chimiotactisme des monocytes, l'adhésion des leucocytes à l'endothélium, et l'adhésion et agrégation des plaquettes (Blaise et al., 2005; Holotiuk et al., 2019; Maher et al., 2017). Cette molécule a également été mise en évidence pour son rôle dans diverses pathologies tels que l'hypertension, les maladies cardiaques, les accidents vasculaires cérébraux, l'asthme bronchique, la maladie d'Alzheimer mais également dans l'angiogenèse, l'immunité anti-tumorale et le cancer (Fischer et al., 2002; Keshet & Erez, 2018; Maher et al., 2017; Onier et al., 1999; Torre et al., 2002) (Sennequier N., Vadon-le Goff S., (1998) Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle. *Biochemistry* 14 : 1185-95). Son implication dans le développement tumoral reste encore controversée puisqu'il est décrit aussi bien comme étant pro-tumoral qu'anti-tumoral, en modulant des mécanismes tels que la progression tumorale, l'invasion, la formation des métastases ou encore l'angiogenèse. Cette ambivalence semble dépendre de la concentration intracellulaire du NO, de la durée

d'exposition, du statut redox de la cellule, de la sensibilité des cellules au NO, et donc du type cellulaire mais aussi de l'origine du NO (Cheng et al., 2014; Dimmeler et al., 1997; Fukumura et al., 2001; Huerta et al., 2008; Jeannin et al., 2008; Millet et al., 2002). En effet à faible concentration, il favoriserait la prolifération et la migration des cellules cancéreuses, mais à forte concentration il provoquerait la mort cellulaire par apoptose (Wink et al., 1991). Les effets générés par le NO dans les systèmes biologiques sont dépendants (signalisation canonique) ou pas (signalisation non canonique) de l'isoforme cytosolique de la guanylate cyclase, sGC (soluble Guanylate Cyclase) (Keshet & Erez, 2018). Il s'agit d'un récepteur hétérodimérique, retrouvé dans le cytosol de plusieurs cellules, et formé de deux sous-unités ( $\alpha$  et  $\beta$ ) contenant chacune un groupement hème. C'est ce dernier qui est responsable de la fixation du NO. Une fois le NO lié, l'enzyme est activée et permet la production de cGMP (cyclic Guanosine MonoPhosphate) à partir du GTP (Guanosine TriPhosphate), qui à son tour permet l'activation de multiples kinases dépendante de cGMP et l'enclenchement de multiples autres voies de signalisations à l'intérieur de la cellule telle que la relaxation des muscles lisses (Gow et al., 2004; Murad, 2006). La deuxième voie (non canonique ou indirecte), est induite en réponse aux modifications post-traductionnelles telles que la nitrosylation ou la nitration, induite par ce radical libre au niveau d'un large éventail de protéines ou enzymes (Ischiropoulos, 2003). Parmi ces cibles on peut citer les protéines de stress, les protéines antioxydantes, la ferritine et les récepteurs à la transferrine. Il peut également influencer l'activité de certaines enzymes, tels que la GC, certains composants de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (exemple l'inhibition de la cytochrome c oxydase) et de la glycolyse, la ribonucléotide réductase, la COX2, la plupart des caspases, les protéines p53, Ras et Bcl-2, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, le cytochrome P-450, quelques canaux ioniques et d'autres encore (Gow et al., 2004; Holotiuk et al., 2019).

### 3.1.3.3. Modifications post-traductionnelles induites par le NO et rôle dans le cancer

#### 3.1.3.3.1. La nitration

La nitration correspond à la liaison covalente d'un groupement nitro ( $\text{NO}_2$ ) sur un des deux carbones en ortho du noyau aromatique de la tyrosine. Cette réaction semble être catalysée principalement par des métallo-protéases telles que la myéloperoxydase, l'éosinophile peroxydase, la myoglobine et le cytochrome P-450. Ces protéases vont donc induire l'oxydation des nitrites en dioxyde d'azote ( $\text{N}_2\text{O}_2$ ), qui à son tour induit la nitration des résidus de tyrosine. Il a été également montré que les myéloprotéases peuvent aussi catalyser cette réaction de nitration par l'intermédiaire des peroxy-nitrites (Gow et al., 2004; Ischiropoulos, 2003). En effet plusieurs études ont montré qu'outre le dioxyde d'azote, d'autres RNS tels que le trioxyde d'azote ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), les peroxy-nitrites ( $\text{ONOO}^-$ ) et le dioxyde d'azote (formé à partir de l'acidification des nitrites), font également partie des espèces nitrantes (Ischiropoulos, 2003; Turko & Murad, 2002). La nitration peut toucher un large éventail de protéines et peut ou non altérer l'activité de ces dernières (gain ou perte de fonction). Elle peut également empêcher ou stimuler d'autres modifications post-traductionnelles, telle que la phosphorylation, modifiant ainsi la fonction des protéines (Turko & Murad, 2002). Un autre mécanisme pouvant découler de cette modification post-traductionnelle est le changement de la structure conformationnelle de certaines protéines conduisant ainsi à l'apparition de nouveaux sites de clivage dépendants ou non des caspases (Prévozat et al., 2006). Plusieurs processus biologiques peuvent être touchés par ce type de modification post-traductionnelle, notamment la transduction de signal, la dégradation des protéines, le métabolisme énergétique, le dysfonctionnement de la mitochondrie, l'inactivation des enzymes, mais également la réponse immunitaire, la mort cellulaire par apoptose et l'apparition du cancer (Zhan et al., 2018). Une étude de 2012 a montré que TIMP-1 (Tissue Inhibitor matrix MetalloProteinase-1), un inhibiteur de l'activité protéolytique des métalloprotéases matricielles (MMPs) et jouant un rôle important dans l'activation de la voie de signalisation associée à la survie cellulaire (PI3K/Akt), prédisait une faible survie chez les patientes atteintes d'un cancer du sein. Cet effet était observé uniquement chez les patientes surexprimant l'iNOS. Ces chercheurs ont donc réalisé des expériences *in vitro* en traitant la protéine recombinante TIMP-1 par des donneurs de NO, et ont trouvé que cette protéine pouvait être nitrée. L'induction de cette nitration était corrélée

à sa fixation sur son récepteur CD63 et à l'activation de la voie oncogénique PI3K/Akt/Bad. En se servant de la technique de spectrométrie de masse, ces chercheurs ont réussi à identifier 2 résidus tyrosine nitrés indispensables à la fixation de TIMP-1 et à l'inactivation de la métalloprotéinase MMP-9 (Ridnour et al., 2012). Une autre étude a également montré que la nitration de cette protéine joue aussi un rôle dans la diminution de la fixation de TIMP-1 sur son récepteur et l'inhibition de MMP-3 dans les macrophages stimulées par le LPS (Patruno et al., 2012). Toutes ces observations montrent un rôle majeur de cette nitration induite par le NO sur les tyrosines de TIMP-1, réorientant ainsi son effet inhibiteur sur la métalloprotéinase MMP-9 vers l'activation de la voie de signalisation de survie PI3K/AkT et la progression tumorale (Switzer, Ridnour, et al., 2012). Une autre étude réalisée par notre équipe en 2006 a montré qu'à fortes concentrations (500  $\mu$ M) les GTN induit l'apoptose de cellules cancéreuses coliques humaines (Millet et al., 2002) via la tyrosine nitration de la  $\beta$ -caténine, protéine intervenant dans l'adhésion cellulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse des tumeurs. Ce processus génère ainsi un message de dégradation, impliquant des protéases, sensible aux inhibiteurs des caspases et des sérines-protéases (Prévotat et al., 2006).

#### 3.1.3.3.2. La nitrosylation

Deux types de nitrosylation sont à distinguer en fonction de la cible touchée par cette modification post-traductionnelle : la S-nitrosylation qui correspond à l'attachement covalent et réversible (dénitrosylation) d'un groupement nitrosyle ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) sur le groupement thiol des cystéines conduisant à la formation de groupement S-nitrosothiol (SNO) ; et la M-nitrosylation qui correspond à la fixation du  $\text{NO}^{\cdot}$  sur un métal (principalement le fer) conduisant à la formation de complexes métal-nitrosyles (Stamler, 1994). Tout comme la tyrosine nitration mais aussi d'autres modifications post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitinylation), la nitrosylation des cystéines altère le statut conformationnel de la protéine conduisant à une régulation de sa fonction (gain ou perte), de sa localisation ainsi que de sa stabilité (Rizza & Filomeni, 2020). La S-nitrosylation de résidus cystéines spécifiques a été mise en évidence dans plusieurs centaines de protéines de toutes classes et apparaît être le principal mécanisme par lequel le NO signale (Benhar & Stamler, 2005; Bettaieb et al., 2015; Stamler et al., 2001). Ainsi, plusieurs processus cellulaires ont été mis en évidence comme étant régulés par ce type de modification post-traductionnelle. Parmi ces processus, on peut citer le cycle cellulaire (Napoli et al., 2013; Raines et al., 2007), la reprogrammation du métabolisme tumoral (López-Sánchez



et al., 2020), la transcription génique (Sha & Marshall, 2012), la réparation de l'ADN (Tang et al., 2012), les fonctions mitochondriales (Piantadosi, 2012) et l'apoptose (Hara et al., 2005; Napoli et al., 2013; Raines et al., 2007; Tang et al., 2006). En effet, Tang *et al.*, ont montré qu'un donneur de NO, le nitrosylcobalamine (NO-Cbl), était capable d'induire la S-nitrosylation de la cystéine 336 du récepteur de mort Apo2L / TRAIL death receptor DR4 (TRAIL R1) dans 3 lignées cellulaires différentes, les cellules A375 (mélanome), ACHN (cancer rénal) et NIH-OVCAR-3 (cancer de l'ovaire). L'inhibition de cette S-nitrosylation via la mutation de la Cystéine 336 augmentait ainsi la résistance de ces cellules au traitement par NO-Cbl et à l'apoptose induite par Apo2L/TRAIL (Tang et al., 2006). Une autre molécule impliquée dans le mécanisme d'apoptose et pouvant être S-nitrosylée par le NO est la GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase). Cette modification post-traductionnelle déclenche la fixation de cette dernière sur l'ubiquitine ligase Siah1 menant à la translocation nucléaire de GAPDH et à l'initiation de la mort cellulaire par apoptose. L'inhibition du NO, par un inhibiteur d'iNOS (N-(3-(aminométhyl)benzyl)acetamide), empêche ainsi le déclenchement de toute cette signalisation (Hara et al., 2005). Le NO peut également jouer un rôle important dans la voie de signalisation impliquée dans la prolifération cellulaire EGFR / Ras / MAPK. Il a été montré que le NO provenant d'une forte expression de l'iNOS, était capable de phosphoryler EGFR au niveau de ses tyrosine 1045 et 1173 induisant son activation dans les cancers du sein RO- / iNOS<sup>hi</sup> (Glynn et al., 2010). En se basant sur ces résultats, ces auteurs ont voulu examiner plus en détail l'effet du NO sur l'activation d'EGFR, si d'autres voies sont impactées par cette signalisation et si ces modifications sont corrélées à l'apparition du phénotype basal like du cancer du sein. Effectivement, ils ont trouvé que, via la S-nitrosylation d'EGFR et de la kinase Src, le NO était capable d'activer ces dernières qui à leur tour activent les voies oncogéniques Akt, c-Myc, STAT3 and  $\beta$ -catenin, promouvant ainsi l'apparition du sous-type basal like du cancer du sein (Switzer, Glynn, et al., 2012). Li *et al.*, ont également montré un rôle majeur du NO dans la régulation de l'activité et de la stabilisation de HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1) pendant la progression tumorale. Ceci était lié à la S-nitrosylation de la cystéine 533 présente dans le domaine oxygène dépendant de HIF-1 (Li et al., 2007). La stabilisation de HIF-1 induite par le NO permet ainsi l'activation de plusieurs voies de signalisations impliquées dans la survie, la croissance, l'angiogenèse et le développement des cancers (Basudhar et al., 2017). Plusieurs autres molécules jouant un rôle important dans le cancer sont également susceptibles d'être S-nitrosylées. On cite ainsi la S-nitrosylation de Bcl-2 (protéine régulatrice de l'apoptose) au

niveau de ses cystéines 158 et 229. Cette S-nitrosylation était à l'origine de l'inhibition de son ubiquitylation, de sa dégradation ultérieure par le protéasome et de l'accentuation de son effet anti-apoptotique et pro-tumoral (Azad et al., 2006). Tout comme Bcl-2, FLIP (FLICE-Inhibitory Protein) une autre protéine régulatrice de l'apoptose, peut également être S-nitrosylée par le NO et échapper à la dégradation protéasomale dépendante de l'ubiquitine (Iyer et al., 2008). De plus, la S-nitrosylation de p53, un suppresseur de tumeurs, induit la perte de fonction de cette protéine, empêchant ainsi une réponse normale aux dommages à l'ADN et aux aberrations génomiques, et favorisant, indirectement, la carcinogenèse (Wang, 2012). Beaucoup d'autres protéines peuvent également subir ce type de modification post-traductionnelle telles que MKP-1 (MAPK phosphatases) au niveau de sa cystéine 258 (Guan et al., 2012), MKP-7 au niveaux de sa cystéine 244 (Pi et al., 2009), Fas au niveau de ces cystéines 199 et 304 (Leon-Bollotte et al., 2011), la dynamine-2 au niveau de sa cystéine 607 (Kang-Decker et al., 2007), c-Src au niveau de sa cystéine 498, c-Yes au niveau de sa cystéine 506 (Rahman et al., 2010), PTEN (Yu et al., 2005) et d'autres encore. Toutes ces modifications montrent que l'apparition du cancer est souvent dû à une altération de la balance S-nitrosylation / dénitrosylation de ces protéines (Rizza & Filomeni, 2018, 2020). Ainsi un stress nitrosatif accru serait corrélé à une augmentation de la progression tumorale, de la migration et du potentiel prolifératif des cellules cancéreuses (Rizza & Filomeni, 2020). Une surexpression de l'iNOS a, en effet, été retrouvée dans de nombreux types de cancer dont les mélanomes, le gliome, le cancer du col de l'utérus, le cancer du foie, des ovaires, du pancréas, du sein (Thomas & Wink, 2017) et du coloron (Ambs et al., 1998). Dans tous ces types de cancers, cette surexpression a été associée à un mauvais pronostic, une mauvaise survie, à la progression tumorale et à l'apparition de métastases (Ambs et al., 1998; Ekmekcioglu et al., 2000; Eyler et al., 2011; Glynn et al., 2010). L'augmentation de l'expression de l'iNOS a été retrouvée chez presque 70% des patientes atteintes de cancer du sein et représente un marqueur pronostic de mauvaise survie dans le cancer du sein RO- (Glynn et al., 2010). Une autre étude réalisée sur des patientes atteintes d'un CSTN a montré que l'expression de l'iNOS était corrélée à une augmentation de la récurrence de la maladie, à l'apparition de métastases et à la diminution de la survie de 209 patientes atteinte du sous-type TN de cancer du sein. Toutes ces modifications semblent être dû à la phosphorylation ERK dépendante d'EGFR induite par le NO (Garrido et al., 2017).

## II. Projet de recherche

Le laboratoire d'immunologie et immunothérapie des cancers travaille sur l'utilisation de donneurs de NO, tel que le glycéryl trinitrate (GTN), comme traitement anti-cancéreux en association ou non avec d'autres thérapies anti-tumorales. Le GTN, un médicament largement utilisé dans le traitement de certaines affections cardiaques telles que l'angine de poitrine, possède également une activité anti-tumorale. Cet effet a été mis en évidence par plusieurs équipes dont la nôtre, aussi bien *in vitro* qu'en préclinique chez la souris et en clinique chez les patients atteints de plusieurs types de cancer. Parmi les études précliniques montrant l'effet potentialisateur du NO sur l'efficacité anti-tumorale des chimiothérapies, on trouve toutes celles réalisées sur des modèles murins de xénogreffes tumorales humaines. On peut, par exemple, citer les études de Huerta *et al.*, Gao *et al.*, et Tesei *et al.*, qui ont montré une augmentation du taux d'expression des facteurs pro-apoptotiques dans plusieurs types de cancer (colon, pancréas et vessie) en réponse aux donneurs de NO, le DETA/NONate ou le NCX-4040, seuls ou associés à la radiothérapie, au cisplatine ou à l'oxaliplatine (Gao *et al.*, 2009; Huerta *et al.*, 2009; Tesei *et al.*, 2008). D'autres études ont également montré cet effet potentialisateur des donneurs de NO (GTN, DETA/NONate, GSNO et NCX-4040) en association avec la doxorubicine ou le cisplatine +/- radiothérapie dans d'autres types de cancers dont le NSCLC, le cancer de l'ovaire, de la tête et du cou et de la prostate (Bratasz *et al.*, 2008; Frederiksen *et al.*, 2007; Huerta-Yepey *et al.*, 2013; Kaliyaperumal *et al.*, 2015; Selvendiran *et al.*, 2008). En clinique, l'utilisation de patches de GTN s'est avérée aussi augmenter la survie des patients atteints de NSCLC traités par vinorelbine et cisplatine, couplés ou non à de la radiothérapie (Arrieta *et al.*, 2014; Yasuda *et al.*, 2006). L'utilisation de GTN, augmente également le temps de doublement du PSA (Antigènes spécifiques de la prostate) de patients atteints de cancer de la prostate (Siemens *et al.*, 2009). L'équipe de Huerta *et al.*, a également montré le rôle du NO dans la sensibilisation des cellules tumorales induite par TRAIL via l'inhibition du facteur de transcription Yin Yang 1 (Huerta-Yepey *et al.*, 2009). De même, dans notre équipe, il a été montré que le GTN induisait l'apoptose de cellules cancéreuses coliques humaines et rendait ces cellules plus sensibles à l'apoptose induite par le ligand du récepteur de mort Fas (Leon-Bollotte *et al.*, 2011; Millet *et al.*, 2002). Plus récemment, ils ont montré que des concentrations non toxiques de GTN induisaient la mort des cellules cancéreuses coliques lorsque le GTN est associé à un inhibiteur de kinase (Cortier *et al.*, 2015). Ils ont également mis

en évidence l'effet anti-tumoral du NO lorsqu'il est produit par l'iNOS via l'activation de la voie TLR4/IFN- $\gamma$  dans un modèle de métastases pulmonaires d'origine mammaire (Lamrani et al., 2016), ou impliquant le recrutement de neutrophiles dans des modèles de cancer colique chez le rat et la souris (Martin et al., 2018; Seignez et al., 2014). Dans ce contexte multifactoriel, mon travail de thèse se focalise sur l'étude de l'effet qu'il pourrait y avoir en associant le GTN à la doxorubicine dans le traitement de l'un des sous-types les plus agressifs du cancer du sein, le triple négatif.

Dans la première étape de mon travail de thèse, je me suis intéressée à l'étude de l'effet anti-tumoral du GTN en combinaison avec la doxorubicine *in vitro* et *in vivo*. J'ai ensuite étudié les modifications induites par cette combinaison sur le système immunitaire en me focalisant plus particulièrement sur les cellules immunosuppressives MDSCs. L'objectif *in fine* est de réussir à identifier les mécanismes à l'origine de l'effet anti-tumoral de cette combinaison afin de pouvoir mettre en place des biomarqueurs en faveur de l'utilisation du GTN, en combinaison avec la doxorubicine, en clinique.

# Résultats

### III. Résultats

#### 1. Effet anti-tumoral de la combinaison doxorubicine / GTN *in vitro* et *in vivo*

Afin de tester si l'utilisation d'un donneur de monoxyde d'azote (NO), le glycéryl trinitrate (GTN), peut améliorer l'efficacité thérapeutique de la doxorubicine, dans le cancer du sein triple négatif (CSTN), nous avons effectué une étude de l'efficacité anti-tumorale de ces traitements seuls ou associés dans un modèle de souris Balb/C porteuses de tumeurs sous cutanées, provenant de l'injection de cellules syngéniques 4T1 (**Figure 11A**). Comme attendu, le GTN en monothérapie n'induit aucune inhibition de la croissance tumorale (**Figure 11B**). En revanche, la doxorubicine seule, induit un ralentissement de la croissance tumorale, et de manière très intéressante, cet effet anti-tumoral de la doxorubicine, est significativement potentialisé lorsque nous combinons cette chimiothérapie au GTN (**Figure 11B**). Afin de confirmer l'effet potentialisateur de l'activité anti-tumorale de la doxorubicine, nous avons utilisé un autre modèle de cancer mammaire EMT6, injecté en sous-cutané dans les souris Balb/C (**Figure 11A et 11C**). De manière similaire au modèle 4T1, nous avons pu confirmer que l'ajout du GTN à la doxorubicine induit un fort effet anti-tumoral (**Figure 11C**). Nous nous sommes alors demandés de quelle manière le GTN pouvait potentialiser l'effet anti-tumoral de la doxorubicine et avons commencé à regarder si cet effet pouvait être direct sur les cellules tumorales, via l'augmentation de la cytotoxicité. Un marquage AnnexineV / 7AAD a été donc réalisé sur les cellules 4T1 (**Figure 11D**) et EMT6 (**Figure 11E**) après traitement par différentes concentrations de GTN et/ou doxorubicine. Les résultats ont montré que la doxorubicine induit la mort des cellules tumorales mammaires 4T1, alors que le GTN, à 10 ou 100  $\mu\text{M}$ , n'a aucun effet cytotoxique sur ces cellules (**Figure 11D**). La combinaison du GTN à la doxorubicine n'a induit aucune augmentation de la cytotoxicité dans ce modèle cellulaire (**Figure 11D**). De plus, alors qu'en préclinique le modèle EMT6 est sensible au traitement par la doxorubicine et/ou GTN, *in vitro*, la doxorubicine n'induit aucune cytotoxicité des cellules EMT6 lorsqu'elle est utilisée seule ou en combinaison avec le GTN (**Figure 11E**). Aucun effet synergique du GTN n'étant observé dans les deux types cellulaires, il semblerait que la potentialisation de l'efficacité anti-tumorale de la doxorubicine induite via l'ajout du GTN, ne soit pas corrélée à un effet direct sur les cellules tumorales. Notre hypothèse était que cette combinaison aurait plutôt un effet indirect, en agissant sur les autres cellules constituant le MET. Nous nous sommes alors

focalisés sur les modifications pouvant être induites par ces traitements au niveau du microenvironnement immunitaire associé aux tumeurs.

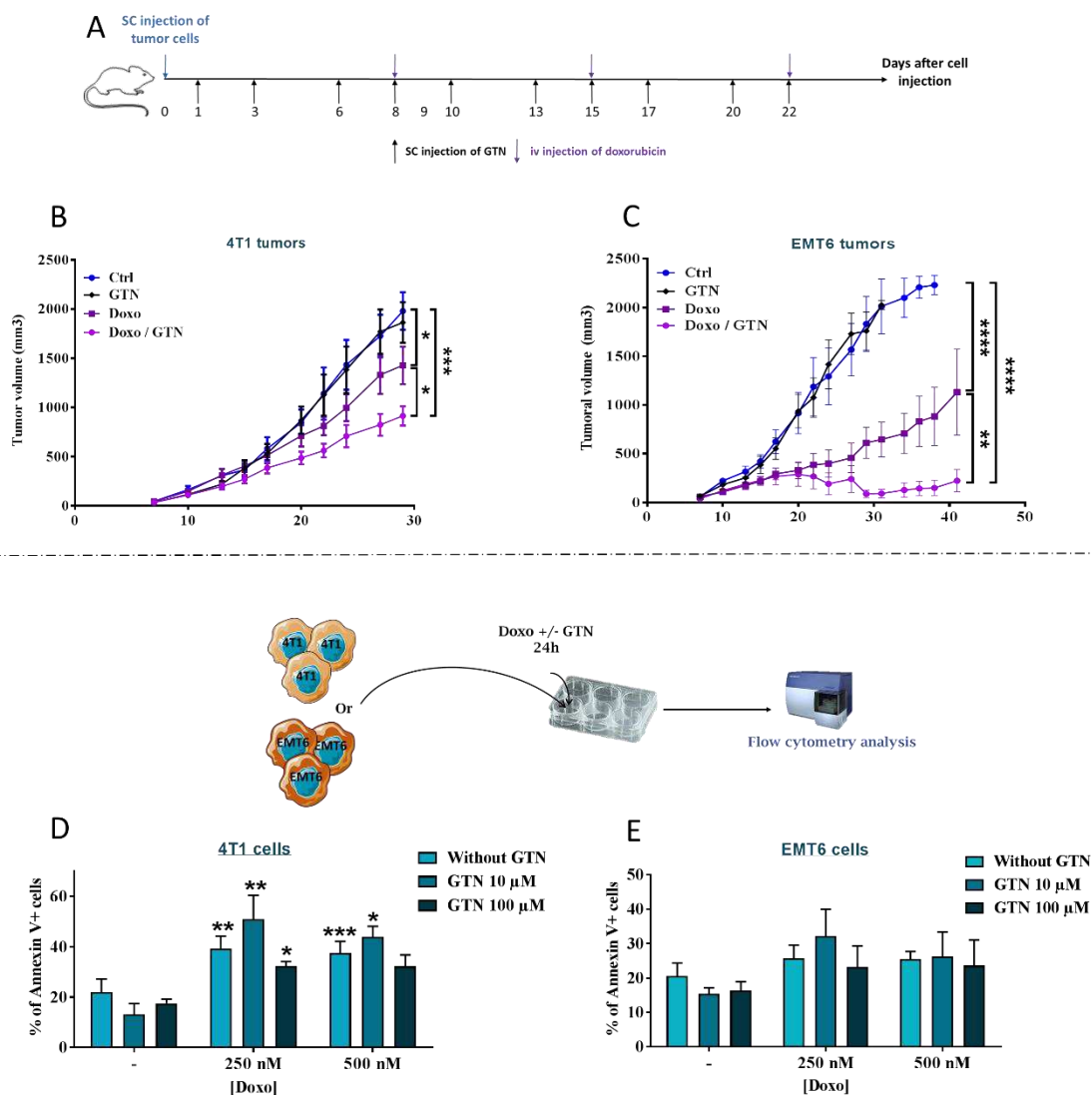


Figure 11 : Effet anti-tumoral de la combinaison doxorubicine / GTN dans deux modèles de cancer du sein. A. Planning des expériences in vivo. Des souris Balb/C porteuses de tumeurs sous-cutanées mammaires ( $5 \times 10^5$  cellules 4T1 ou EMT6) ont été traitées par du GTN (5 mg/kg, en s.c.) trois fois par semaine dès le lendemain de l'injection des cellules cancéreuses, suivi de la doxorubicine (8 mg/kg, en i.v.) lorsque le volume tumoral atteint environ  $50 \text{ mm}^3$  (renouvelée tous les 7 jours). Un suivi de la croissance tumorale a été réalisé 3 fois par semaine. B-C. Etude de l'effet anti-tumoral de la doxorubicine, du GTN ainsi que de la combinaison dans des souris porteuses d'une tumeur mammaire 4T1 (B,  $n=10$ ) ou EMT6 (C,  $n=5$ ) et traitées avec doxorubicine +/- GTN suivant le schéma d'injection présenté en A. Les souris ont été sacrifiées lorsque les tumeurs atteignaient un volume tumoral de  $2000 \text{ mm}^3$ . D-E. Cinq-cents milles cellules cancéreuses mammaires 4T1 (D) ou EMT6 (E) ont été traitées avec de la doxorubicine (250 ou 500 nM) +/- GTN (10 ou 100 µM) pendant 24h. La mort cellulaire induite par ces molécules a été évaluée par un marquage annexine V/7AAD et analysée par cytométrie en flux ( $n=4$ ). L'analyse statistique a été effectuée par un test two-way ANOVA (B-C) ou test t (D-E) : \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ . Les statistiques présentées sur les figures D-E représentent les différences significatives par rapport au Ctrl.

## 2. Modulation du microenvironnement immunitaire tumoral en réponse à la doxorubicine +/- GTN

### 2.1. Augmentation de la polarisation Th1 en réponse au GTN +/- doxorubicine

Pour déterminer si le traitement par la doxorubicine et/ou le GTN affecte le recrutement et/ou l'activité des cellules TCD4+, des tumeurs ont été récupérées à J16 et/ou J23 (respectivement 7 et 14 jours après l'injection de doxorubicine) à partir de souris Balb/C porteuses de tumeurs sous-cutanées 4T1 traitées ou non avec doxorubicine +/- GTN (**Figure 12A**). L'analyse par immunohistofluorescence sur les blocs de paraffine des tumeurs prélevées à J16, montre que le pourcentage des cellules TCD4+ recrutées au sein de ces tumeurs était significativement augmenté en réponse au GTN +/- doxorubicine (**figure 12B**). L'analyse plus fine réalisée par cytométrie en flux après dissociation des tumeurs prélevées à J16 et J23, révèle alors que seule la combinaison doxorubicine / GTN induit une augmentation des cellules CD4+/CD127+/CD25+ correspondants aux cellules TCD4+ activées (**figure 12C, stratégie de gating en annexe**). Ces LT CD4+ étant constitués d'une population hétérogène de cellules, formées suite à la différenciation des cellules TCD4+ naïfs et pourvues de fonctions pro- ou anti-tumorales spécifiques, nous avons alors décidé de regarder si nos traitements pouvaient moduler la composition intra-tumorale en ces différents sous-types (Th1, Th2, Treg et Tfh). Une analyse par cytométrie en flux a été alors réalisée sur les tumeurs récupérées à J16 et J23 à partir de souris injectées avec des cellules cancéreuses 4T1 et traitées ou non avec doxorubicine +/- GTN (**stratégie de gating en annexe**). Les résultats observés à J16 ont montré que l'association doxorubicine / GTN induit une augmentation significative de la polarisation intra-tumorale des cellules CD45+/CD4+/CCR6+/CXCR3+ (**Figure 12D**) et des cellules CD45+/CD4+/CD127-/CD25+ (**Figure 12F**) correspondant respectivement aux sous-types Th1 et Treg. Cet effet statistiquement significatif lié à ces deux populations cellulaires est perdu à J23, tout en maintenant une tendance à l'augmentation pour les cellules CD45+/CD4+/CD127-/CD25+ (**Figure 12F**). Concernant les cellules CD45+/CD4+/CCR6-/CXCR3-/ST2+ (**Figure 12E**) et CD45+/CCR6-/CXCR3-/CXCR5+/PD-1+ (**Figure 12G**), correspondants respectivement aux cellules Th2 et Tfh, une diminution de leur taux a été observée à J16 en réponse au GTN (Th2) et à l'association GTN / doxorubicine (Tfh). Cependant, à J23, la diminution des cellules Th2 semble cette fois être dépendante de la doxorubicine (**Figure 12E**), contrairement aux cellules Tfh qui voient leur pourcentage augmenter en réponse aux traitements seuls ou associés (**Figure 12G**).



La confirmation de ces résultats par RT-qPCR a alors été réalisée en recherchant, dans le lysat tumoral, l'expression de gènes spécifiques à chaque lignage chez des souris porteuses de tumeurs 4T1 et traitées ou non par doxorubicine +/- GTN. Ainsi, les résultats observés par cytométrie en flux pour les cellules Th1 et Th2, ont pu être confirmés par RT-qPCR. En effet, le GTN seul ou associé à la doxorubicine induit l'augmentation de l'expression du gène *Tbet*, statistiquement significatif à J23 (**Figure 12H**), alors que le GTN seul induit la diminution de l'expression du gène *GATA3* à J16 (**Figure 12I**), correspondant respectivement aux sous-types Th1 et Th2. Cependant, aucune différence significative dans le taux d'expression du gène *Foxp3* (Treg) n'a pu être mise en évidence en réponse aux traitements, ni à J16 ni à J23 (**Figure 12J**).

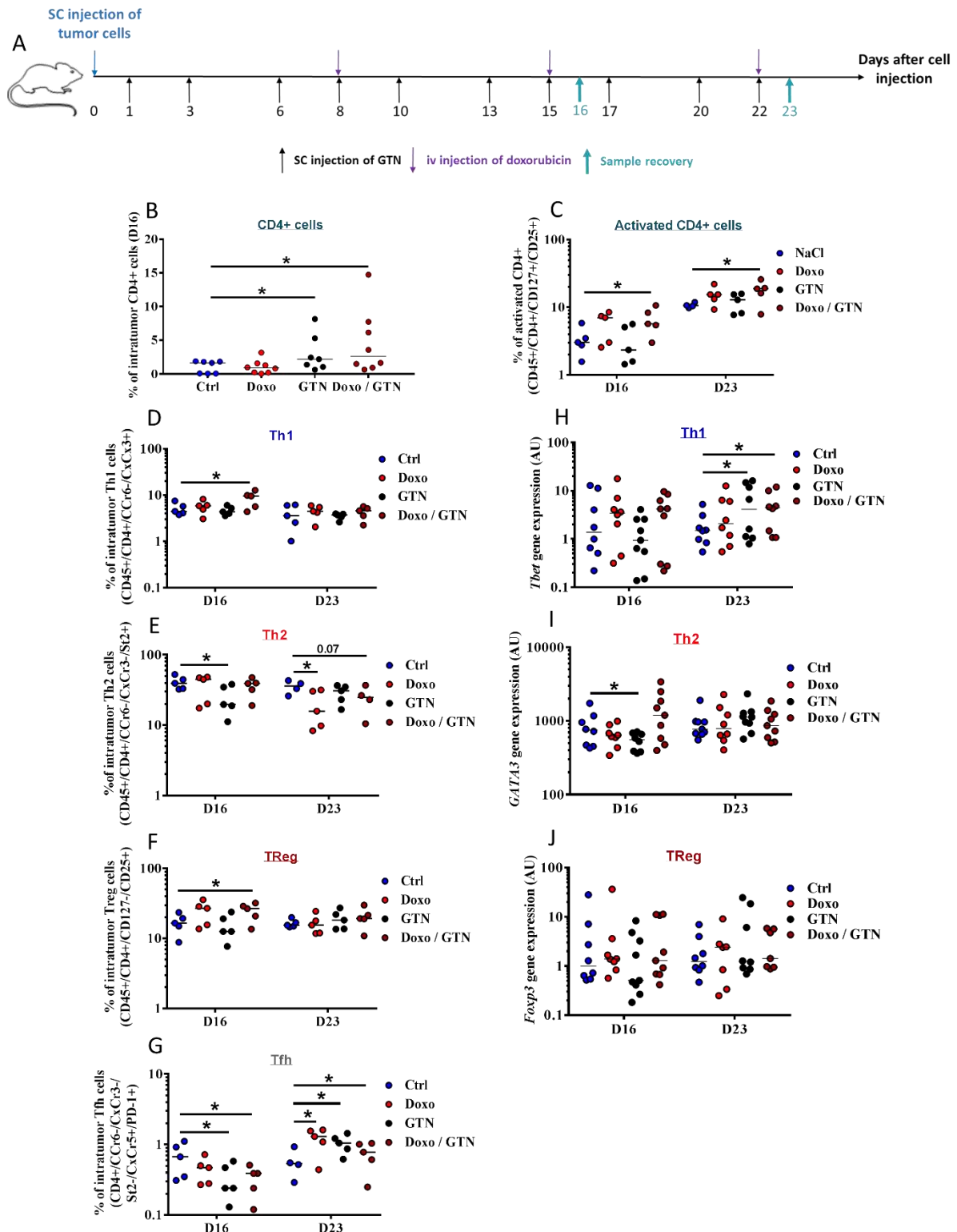


Figure 12 : *Modulation de l'infiltration intra-tumorale par les cellules TCD4+ en réponse à la doxorubicine +/- GTN.* A. *Planning des expériences in vivo.* Des souris Balb/C porteuses de tumeurs mammaires sous-cutanées 4T1 ont été traitées avec du GTN (5 mg/kg, en s.c.) 3 fois par semaine dès le lendemain de l'injection des cellules cancéreuses, suivi de la doxorubicine (8 mg/kg, en i.v.) lorsque le volume tumoral atteint environ 50 mm<sup>3</sup> (renouvelée tous les 7 jours). B-J. Les tumeurs ont été récupérées à J16 et/ou J23 post-injection des cellules tumorales 4T1 dans les souris Balb/C (Cf. A), et l'infiltration tumorale par des cellules TCD4+ (B), TCD4+ activées (C) et les différents sous-types (Th1, Th2, TReg et Tfh, D-J) en réponse à la doxorubicine +/- GTN, a été analysée. B. Analyse par immunohistofluorescence (n=8 souris). C-G. Analyse par cytométrie en flux (n=5 souris). H-J. Analyse par RT-qPCR (n=9 souris) de l'expression de facteurs de transcription spécifiques aux cellules TCD4+ de type Th1 (H), Th2 (I) et Treg (J). Analyses statistiques par t test : \*p ≤ 0,05.

Des expériences de différenciation des LT CD4<sup>+</sup> *ex vivo* ont été également effectuées afin de confirmer ces résultats. Pour ce faire, des LT CD4<sup>+</sup> naïfs ont été cultivés avec des cytokines et anticorps bloquants spécifiques à chaque sous-type cellulaire TCD4<sup>+</sup>, et traitées ou non avec doxorubicine +/- GTN. La polarisation des Th1, Th2, Treg et Tfh a été vérifiée grâce à l'analyse de l'expression des gènes *Tbet* (Figure 13A), *GATA3* (Figure 13B), *Foxp3* (Figure 13C) et *BCL6* (Figure 13D) respectivement. L'analyse par RT-qPCR a alors montré que le GTN induit une augmentation de l'expression du facteur de transcription *Tbet*, et donc de la différenciation de ces cellules T naïves en Th1 (Figure 13A). En revanche, l'expression des facteurs de transcription *GATA3* (Figure 13B), *Foxp3* (Figure 13C) et *BCL6* (Figure 13D) est significativement diminuée en réponse à la doxorubicine +/- GTN.

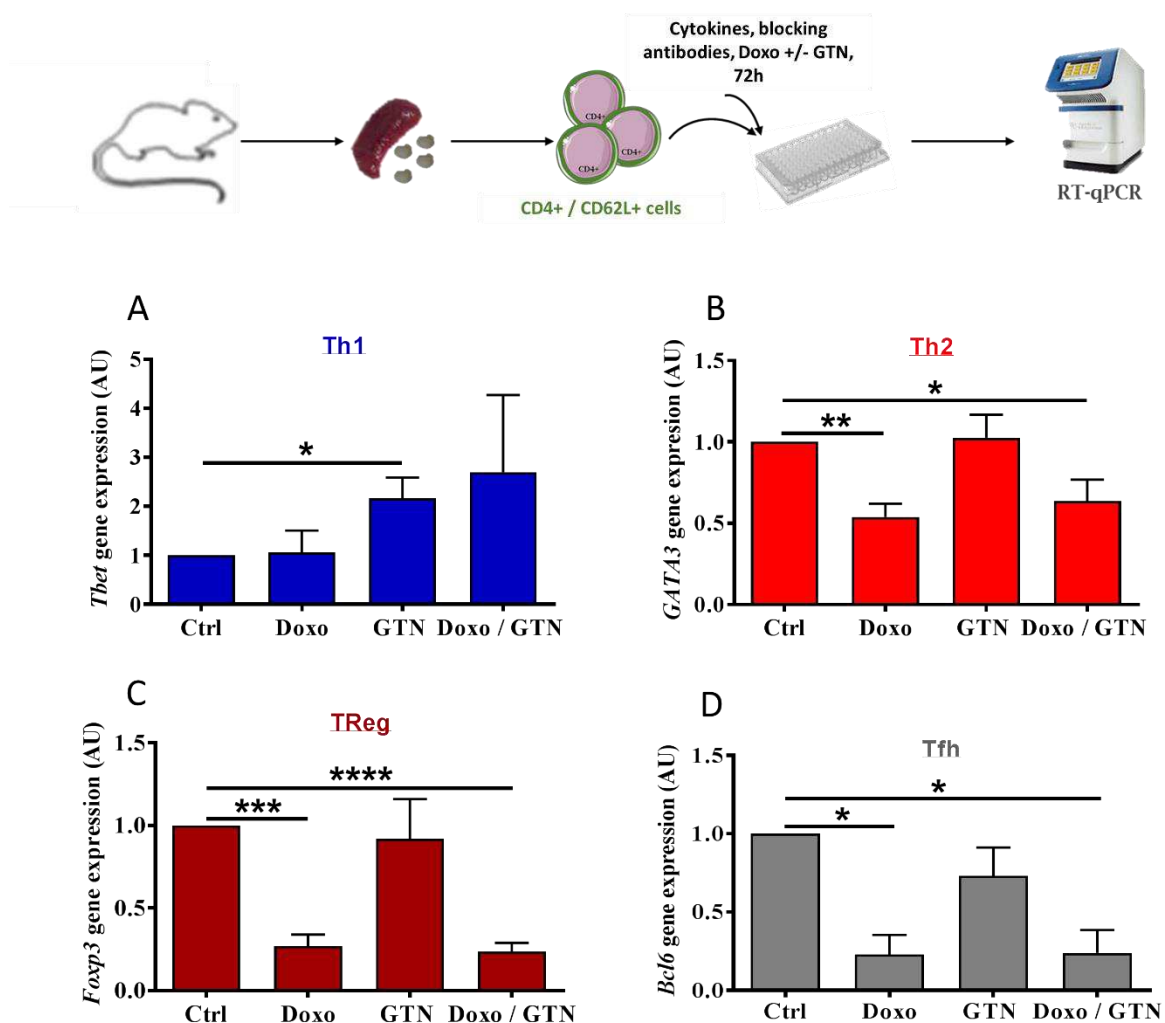


Figure 13 : Modulation de la différenciation des cellules TCD4<sup>+</sup> en réponse à la doxorubicine +/- GTN. A-D. Analyse par RT-qPCR de l'expression des facteurs de transcription clés dans les LT CD4<sup>+</sup> naïfs, isolés à partir de rates et de ganglions de souris Balb/C, différenciées *in vitro* en Th1 (A), Th2 (B), Treg (C) et Tfh (D) et traitées avec doxorubicine (500 nM) +/- GTN (100 μM) pendant 72h. Ces données sont normalisées par rapport aux Th0 traitées ou non par doxorubicine +/- GTN aux mêmes concentrations (A-B), ou par rapport aux LT naïfs (C-D). Analyses statistiques par t test : \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

L'ensemble des résultats obtenus sur la population de LT CD4+ montre que la combinaison du GTN à la doxorubicine, induisant un fort effet anti-tumoral, est corrélée à une augmentation du recrutement intra-tumoral et de l'activation des cellules TCD4+, en favorisant le lignage Th1 au détriment des lignages Th2, Treg et Tfh. Plusieurs études ont montré que le rôle majeur joué par les cellules Th1 au sein des tumeurs, correspond au soutien et à l'activation et de la réponse T cytotoxique induite par les cellules TCD8+. Une étude approfondie de la modulation et de l'implication de cette population immunitaire, en réponse aux traitements, a donc été entreprise.

## 2.2. Augmentation du taux intra-tumoral des cellules TCD8+/PD-1+ par l'association doxorubicine / GTN

Les cellules TCD8+ constituent une autre population de LT qui joue un rôle très important dans la réponse immunitaire adaptative anti-cancéreuse. Afin d'évaluer le rôle de ces cellules dans l'efficacité anti-tumorale de la combinaison doxorubicine / GTN, nous avons effectué un suivi de croissance tumorale sur des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées 4T1 et traitées avec doxorubicine / GTN en association ou non avec un Ac bloquant les LT CD8+ (**Figure 14A**). Les résultats de la **Figure 14B** mettent bien en évidence l'implication de ces cellules dans l'efficacité thérapeutique de cette combinaison de traitements. En effet, nous avons observé une inhibition partielle, mais significative, de l'effet anti-tumoral observé en réponse à la combinaison doxorubicine / GTN, lorsque nous associons ces traitements à l'anti-CD8 (**Figure 14B**). La présence de ces cellules dans les tumeurs a alors été mise en évidence par immunohistofluorescence (**Figure 14C**) et cytométrie en flux (**Figure 14D, stratégie de gating en annexes**), effectuées sur des tumeurs 4T1 récupérées, à J16 et/ou J23, à partir de souris Balb/C traitées ou non avec doxorubicine +/- GTN (**Figure 14A**). Une augmentation de l'infiltration intra-tumorale par les LT CD8+, a été observée à J23 en réponse à la combinaison doxorubicine / GTN (**Figure 14C**), mais également en réponse à la doxorubicine seule comme montré par analyse en cytométrie (**Figure 14D**).

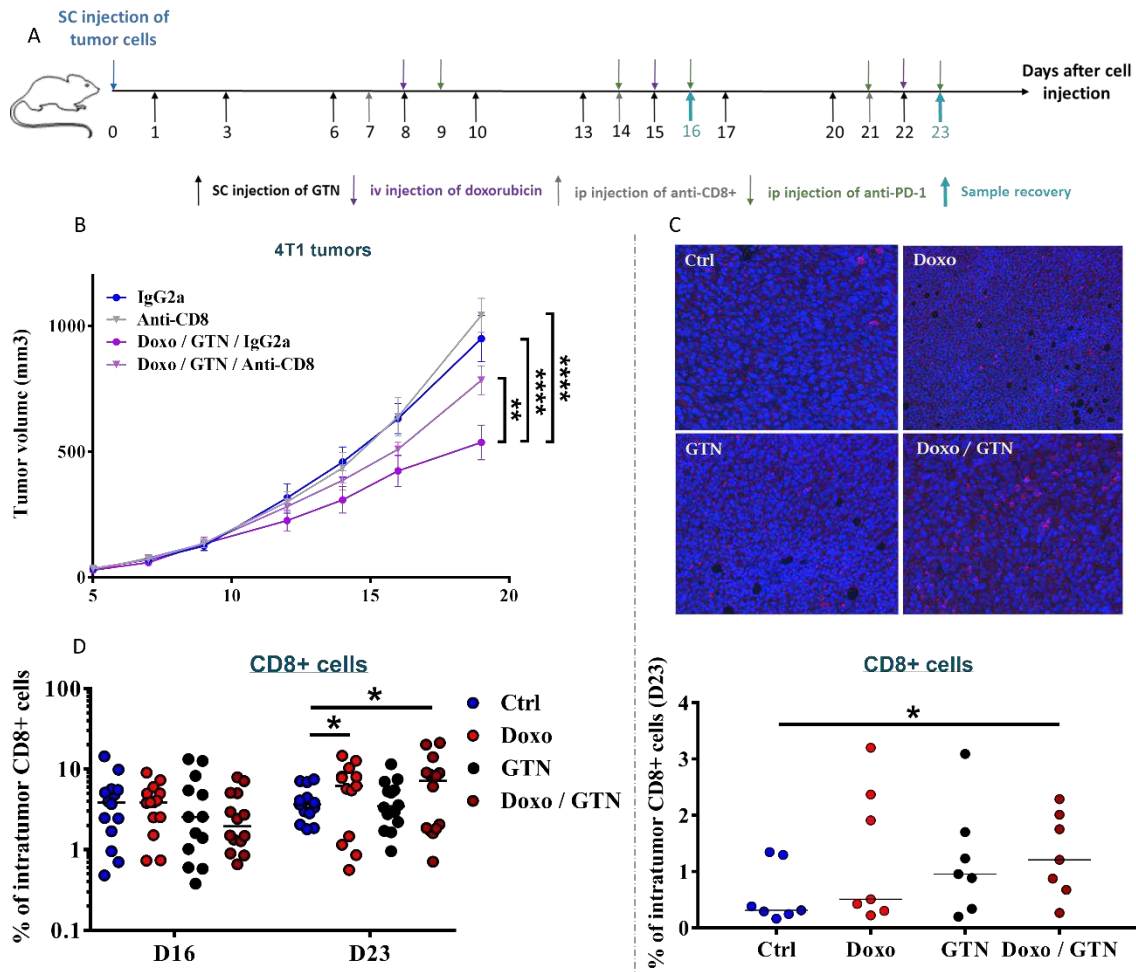


Figure 14 : Implication des cellules TCD8+ dans l'effet anti-tumoral de la combinaison doxorubicine / GTN. A. Planning des expériences in vivo. Des souris Balb/C porteuses de tumeurs mammaires triples négatives ( $5 \times 10^5$  cellules 4T1) ont été traitées par du GTN (5 mg/kg, en s.c.) trois fois par semaine dès le lendemain de l'injection des cellules cancéreuses, suivi de la doxorubicine (8 mg/kg, en i.v.) lorsque le volume tumoral atteint environ  $50 \text{ mm}^3$  (renouvelée tous les 7 jours), et/ou d'un anticorps anti-CD8 ou de son isotype contrôle IgG2a (5 mg/mL, en i.p) une fois par semaine dès la veille du début du traitement par la doxorubicine ou NaCl, et/ou de l'anti-PD-1 (10 mg/Kg, en i.p) deux fois par semaine dès le lendemain du début du traitement par la doxorubicine ou NaCl. Un suivi de la croissance tumorale a été réalisé 3 fois par semaine (B). Les tumeurs ont été récupérées à J16 et/ou J23 et analysées par immunofluorescence à J23 (C) ou cytométrie en flux à J16 et J23 (D). B. Etude de l'effet anti-tumoral de la combinaison doxorubicine / GTN en association ou non avec un anticorps anti-CD8, dans des souris porteuses d'une tumeur mammaire 4T1 ( $n=10$  souris) et traitées avec doxorubicine +/- GTN +/- anti-CD8 ou isotype contrôle IgG2a, suivant le schéma d'injection présenté en A. Les souris ont été sacrifiées lorsque les tumeurs atteignaient un volume tumoral de  $2000 \text{ mm}^3$ . C-D. Analyse par IHC (C,  $n=8$  souris) et cytométrie en flux (D,  $n=14$  souris) de l'infiltration intra-tumoral des LT CD8+ en réponse à la doxorubicine +/- GTN à J16 et/ou J23 post-injection des cellules tumorales 4T1 dans les souris Balb/C (Cf. A). Analyses statistiques par test Two-way ANOVA (B) ou t test (C-D): \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

Il est connu que les cellules TCD8+, tout comme d'autres populations immunitaires, expriment des PCIs à leur surface pour réguler leur activité. Dans notre étude nous nous sommes focalisés sur l'expression de PD-1 en réponse à nos traitements. La modulation de l'expression de ce dernier par les cellules TCD8+ a été étudiée par cytométrie en flux aussi bien *ex vivo*, à J16 sur des souris Balb/C porteuses de tumeurs 4T1 et traitées avec doxorubicine +/- GTN, qu'*in vitro*, sur des LT CD8+ récupérées à partir de rates et ganglions de souris Balb/C naïves, et traitées, après activation par des billes anti-CD3/CD28, avec doxorubicine +/- GTN. Une augmentation significative de l'expression de PD-1 par les cellules TCD8+ infiltrant les tumeurs (**Figure 15A**) ou naïves (**Figure 15B**), a été alors observée en réponse au GTN seul ou associé à la doxorubicine. L'effet anti-tumoral de ces LT CD8+/PD-1+ pouvant-être régulé négativement par PD-L1, un de ses ligands présents sur un certain nombre de cellules immunitaires mais également sur les cellules tumorales, l'impact de la combinaison sur l'expression de PD-L1 dans les cellules tumorales a alors été testé *ex vivo* (**Figure 15C**) et *in vitro* (**Figure 15D**). Les traitements seuls ou en combinaison induisent une forte diminution de l'expression membranaire de PD-L1 sur les cellules tumorales (**Figure 15C et 15D**). La modulation de l'expression de PD-1 sur les cellules TCD8+ et PD-L1 sur les cellules tumorales pourrait être à l'origine de l'absence de potentialisation de l'efficacité anti-tumorale de la combinaison doxorubicine / GTN lorsqu'elle est associée à un anti-PD-1. En effet, l'effet anti-tumoral de la doxorubicine est amélioré, mais de manière non-significative, lorsqu'elle est associée à un anti-PD-1, et l'association doxorubicine / GTN / Anti-PD-1 n'induit pas d'amélioration de l'efficacité comparée à celle de la combinaison doxorubicine / GTN (**Figure 15E**). Tous ces résultats suggèrent que l'efficacité anti-tumorale observée en associant le GTN à la doxorubicine est dépendante du recrutement mais également de l'activation des cellules TCD8+ dans les tumeurs.

Au sein des tumeurs, nous avons donc vu que la combinaison de traitements favorise la présence de cellules TCD4+ de type Th1, ayant un rôle activateur sur les cellules TCD8+, et au contraire inhibait le lignage Treg présentant des caractéristiques immunosuppressives. Dans le MET, il existe d'autres cellules immunosuppressives pouvant jouer un rôle inhibiteur sur ces LT CD8+, telles que les MDSCs.

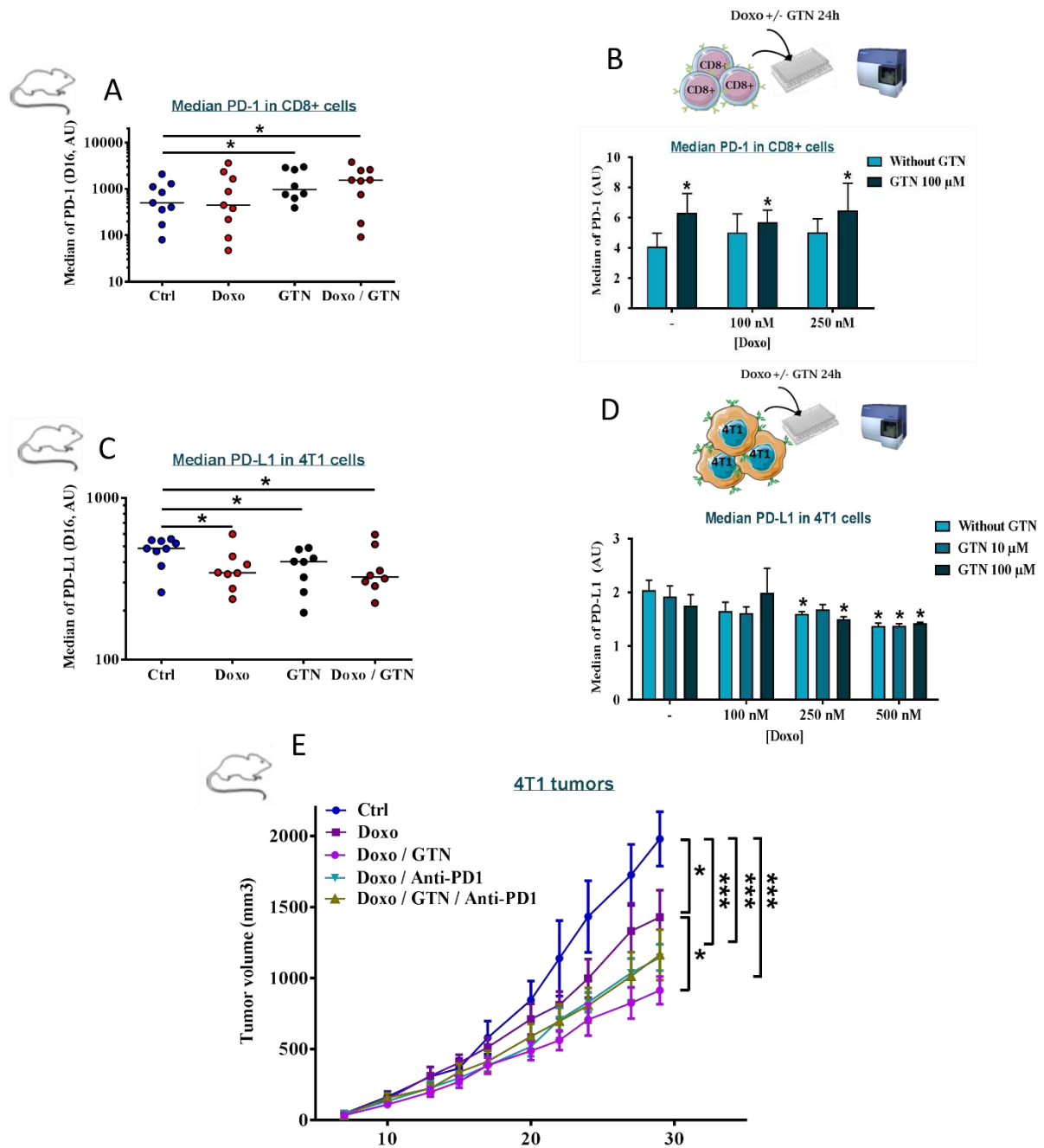


Figure 15 : Implication du couple PD-1/PD-L1 dans l'effet anti-tumoral de la combinaison doxorubicine / GTN. A. Analyse par cytométrie en flux de l'expression de PD-1 sur les cellules CD8+ infiltrant les tumeurs 4T1 à J16 en réponse à la doxorubicine +/- GTN (Cf. Figure 14A, n=9). B. Analyse de l'expression de PD-1 sur les cellules CD8+ récupérées à partir de rates et ganglions de souris naïves et traitées in vitro, après activation avec des billes CD3 / CD28, par doxorubicine (100 ou 250nM) +/- GTN (100μM) pendant 24h (n=3). C-D. Analyse par cytométrie en flux de l'expression de PD-L1 dans les tumeurs 4T1 récupérées à partir de souris Balb/C traitées avec doxorubicine +/- GTN à J16 (Cf. Figure 14A) (C, n=9), ou in vitro sur les cellules 4T1 traitées avec de la doxorubicine (100, 250 ou 500nM) +/- GTN (10 ou 100 μM) pendant 24h (D, n = 4). E. Etude de l'effet anti-tumoral de la doxorubicine +/- GTN en association ou non avec de l'anti-PD-1, dans des souris porteuses d'une tumeur mammaire 4T1 (n=10 souris) et traitées avec doxorubicine +/- GTN +/- anti-PD-1, suivant le schéma d'injection présenté en Figure 14A. Les souris ont été sacrifiées lorsque les tumeurs atteignaient un volume tumoral de 2000 mm<sup>3</sup>. Analyses statistiques par test Two-way ANOVA (E) ou t test (A-D): \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01, \*\*\*p ≤ 0,001, \*\*\*\*p ≤ 0,0001. Les statistiques présentées sur les figures B et D représentent les différences significatives par rapport au Ctrl.

### 2.3. Augmentation du taux intra-tumoral de G-MDSCs corrélée à la diminution de leur activité immunosuppressive en réponse à l'association doxorubicine / GTN

Les cellules MDSCs font partie des cellules immunitaires d'origine myéloïde jouant un rôle dans l'immunité innée immunosuppressive et pro-tumorale. L'étude de l'impact de la doxorubicine +/- GTN sur cette population cellulaire a alors été réalisée. Une analyse par cytométrie en flux a été réalisée sur les tumeurs 4T1 récupérées, à J16 et J23, à partir de souris injectées avec des cellules 4T1 et traitées ou non avec doxorubicine +/- GTN. Comme le montre la **Figure 16A**, aucun effet des traitements, seuls ou en combinaison, sur le taux de cellules CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Gr1<sup>+</sup>, correspondant aux cellules MDSCs totales, n'a pu être détecté. Ces MDSCs regroupant deux sous-types, les MDSCs monocytaires (M-MDSC) et granulocytaires (G-MDSC), nous avons décidé de caractériser plus finement ces deux populations de MDSCs en réponse aux traitements. De manière très intéressante, nous avons trouvé que le rapport intra-tumoral des cellules CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Gr<sup>+</sup>/Ly6G<sup>hi</sup> (G-MDSCs) / CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Gr<sup>+</sup>/Ly6G<sup>lo</sup> (M-MDSCs) augmente significativement en réponse à la combinaison doxorubicine / GTN à J16 et à J23, ce ratio augmentant également à J23 en réponse à la doxorubicine seule ou combinée au GTN (**Figure 16B, stratégie de gating en annexe**). Ces cellules immunosuppressives pouvant inhiber l'activité des LT CD8<sup>+</sup>, via l'expression de PD-L1, nous avons analysé l'expression de ce ligand sur ces cellules par cytométrie en flux. De manière intéressante, nous avons constaté que le taux de PD-L1 membranaire diminue sur les G-MDSCs intra-tumorales, et non sur les M-MDSC, en réponse à la doxorubicine, associée ou non au GTN (**Figure 16C**). Cette observation est d'autant plus intéressante que nous avons pu montrer, par RNAseq, un effet très important du GTN +/- doxorubicine sur la diminution d'expression des gènes associés à l'activité immunosuppressive des MDSCs, tels que *S100A9*, le récepteur à la PGE2 (*PGE2R*), et *iNOS* (**Figure 17A**). L'expression d'autres gènes associés au recrutement des MDSCs au sein des tumeurs est également diminuée en réponse aux traitements seuls ou associés, comme par exemple les chimioattractants (*CXCL1-3, 5, CCL2-3, 5*) et le récepteur *CXCR2* (**Figure 17A**). La modulation de l'expression de ces gènes a alors été confirmée par RT-qPCR à partir des lysats tumoraux obtenus à J16 et J23 (**Figure 17B**). Concernant leur potentiel immunosuppresseur, la diminution de l'expression génique de *CXCR2* et de *iNOS* en réponse au GTN +/- doxorubicine a été confirmée *in vitro* en utilisant une lignée cellulaire de MDSC, les cellules MSC2 (**Figure 17C**). Même si nous n'avons pas pu observer de diminution significative en réponse aux traitements, du taux d'expression de *CXCR2* et de *iNOS* dans des G-MDSC récupérées à partir



de tumeurs 4T1, une tendance à la baisse est détectée en réponse à la combinaison doxorubicine / GTN (**Figure 17D**). Tous ces résultats sont en faveur d'une inhibition de l'activité immunosuppressive des G-MDSC en réponse à la combinaison de traitement doxorubicine / GTN. Nous avons alors testé la capacité de ces cellules à inhiber la prolifération des LT CD8+. Comme attendu, nous avons pu montrer que les G-MDSC provenant de tumeurs 4T1 récupérées à partir de souris Balb / C traitées avec doxorubicine / GTN, restaure en partie et de manière significative, la prolifération des LT CD8+ lorsqu'elles sont co-cultivées avec les G-MDSCs (**figure 17E**).

Tous ces résultats montrent que la combinaison du GTN à la doxorubicine favorise la présence des G-MDSC intra-tumoraux au détriment des M-MDSC et inhibe leur fonction immunosuppressive aussi bien en diminuant le taux de PD-L1 exprimé par ces cellules, qu'en diminuant leur capacité à inhiber la prolifération des LT CD8+. Nous avons alors émis l'hypothèse que cette combinaison de traitement pouvait induire un switch dans l'activité immunosuppressive de ces cellules G-MDSCs au sein des tumeurs 4T1.

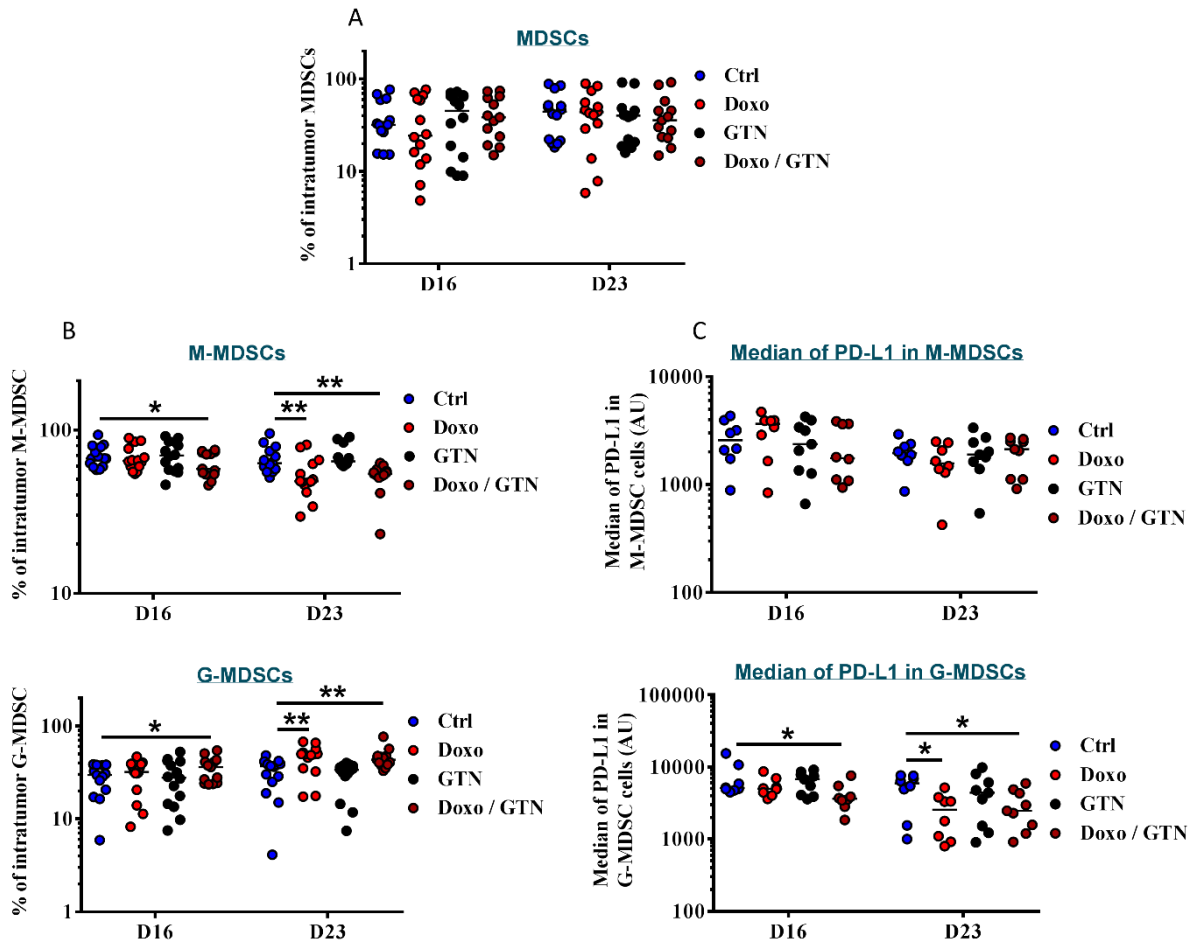


Figure 16 : *Impact de la combinaison doxorubicine / GTN sur la composition intra-tumorale en G-MDSC vs M-MDSC et l'expression de PD-L1. A-C. Analyse par cytométrie en flux (n=14 souris) de l'infiltrat intra-tumoral des cellules MDSCs (A), des sous-types de G-MDSC et M-MDSC (B) ainsi que de l'expression de PD-L1 à leur surface (C) en réponse à la doxorubicine +/- GTN à J16 et J23 post-injection des cellules tumorales 4T1 dans les souris Balb/C (Cf. Figure 14A). Analyses statistiques par t test : \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01.*

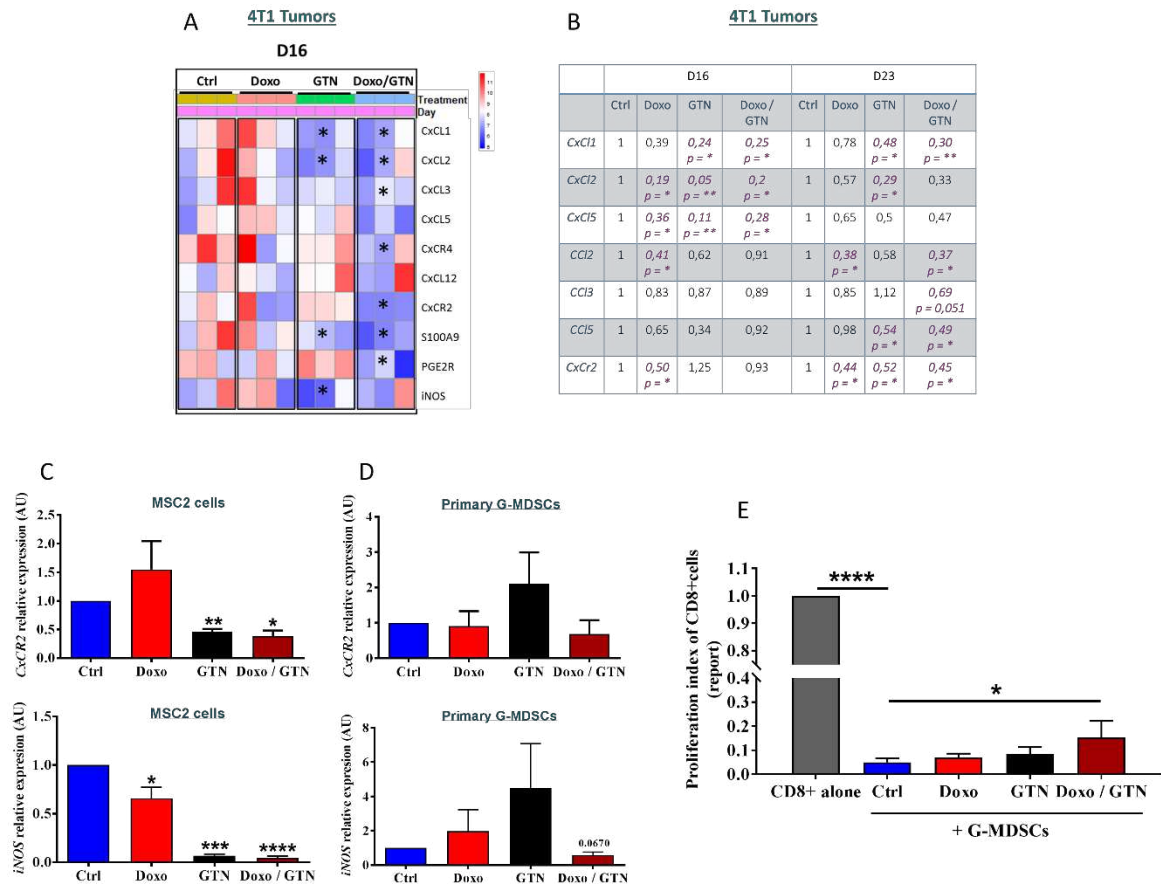


Figure 17 : Impact de la combinaison doxorubicine / GTN sur le recrutement intra-tumoral et le potentiel immunosuppresseur des MDSCs. A-B. Analyse par RNAseq (A, n=3 souris) et RT-qPCR (B, n=6 souris) de l'expression intra-tumorale de gènes intervenant dans le recrutement et l'activité des MDSCs, en réponse à la doxorubicine +/- GTN à J16 et/ou J23 post-injection des cellules tumorales 4T1 dans les souris Balb/C (Cf. Figure 14A). C-D. Analyse de l'expression des gènes CxCR2 et iNOS par RT-qPCR sur les cellules MSC2 (C, n=3) ou G-MDSCs de tumeurs 4T1 de souris non traitées (D, n=3), traitées *in vitro* avec doxorubicine (100 nM) +/- GTN (100µM) pendant 24h. E. Analyse par cytométrie en flux de l'immunosuppression induite par les G-MDSCs (purifiées à J23 à partir de tumeurs 4T1 de souris traitées ou non (Ctrl) avec doxorubicine +/- GTN (Cf. Figure 14A)) sur les cellules CD8+ purifiées à partir de rates et ganglions de souris naïves, activées *in vitro* avec des billes CD3 / CD28 et marquées avec cell trace violet (n=6 souris pour le groupe Ctrl, et n=3 souris pour les groupes traités). Analyses statistiques par t test : \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ . Les statistiques présentées sur les figures A-D représentent les différences significatives par rapport au Ctrl.

### 3. Inhibition de la voie de signalisation régulant l'activité immunosuppressive des G-MDSC par la combinaison doxorubicine / GTN

#### 3.1. Diminution de la voie de signalisation FATP2 en réponse au GTN +/- doxorubicine

Une revue assez récente parue dans Nature (Veglia et al., 2019), a montré que la capacité immunosuppressive des cellules PMN-MDSCs est sous la dépendance de l'expression d'un transporteur d'acide gras, la protéine FATP2 (Fatty Acid Transport Protein 2). Nous avons alors regardé si la combinaison GTN / doxorubicine pouvait moduler l'expression de cette protéine. L'analyse par RT-qPCR, western blot et cytométrie en flux dans la lignée cellulaire MSC2, a montré que l'expression, respectivement, génique (**Figure 18A**), protéique (**Figure 18B**) et membranaire (**Figure 18C**) de FATP2 était fortement inhibée en réponse au GTN +/- doxorubicine. Cette diminution de l'expression membranaire de FATP2, en réponse au GTN +/- doxorubicine, a été également confirmée dans les cellules primaires G-MDSCs récupérées à partir de souris porteuses de tumeurs 4T1 et traitées *in vitro* avec doxorubicine +/- GTN (**Figure 18D**).

L'expression de FATP2 étant sous la dépendance de la voie de signalisation du facteur de transcription STAT5, qui après activation par phosphorylation (P-STAT5) permet la transcription du gène *Slc27A2* et sa traduction en protéine FATP2. Cette dernière va alors permettre l'absorption de l'acide arachidonique par les G-MDSCs conduisant ainsi à la production de PGE2, un acide gras responsable de la suppression des cellules TCD8+. L'étude de cette voie de signalisation en aval (PGE2) et en amont (STAT5) de FATP2, en réponse au GTN +/- doxorubicine, a été réalisée. Les résultats des **Figures 18E-F**, montrent bien une diminution significative de la quantité de la PGE2 (**Figure 18E**) mais également de STAT5 phosphorylée (P-STAT5) ou totale (**Figure 18F**), en réponse au GTN seul ou associé à la doxorubicine. Le GTN, seul ou associé à la doxorubicine, semble donc bien pouvoir inhiber la voie de signalisation FATP2, régulant l'activité immunosuppressive des G-MDSC. De manière très intéressante, nous avons également mis en évidence que cette diminution du taux de STAT5 était associée à l'apparition d'un produit de clivage à 50KDa (**Figure 18F**). Tout comme la diminution de FATP2, de STAT5 et de PGE2, ce clivage de STAT5 est retrouvé en présence du GTN, associé ou non à la doxorubicine (**Figure 18F**). Ce clivage de STAT5, dépendant du GTN, semble être spécifique aux cellules myéloïdes MDSCs, puisque ce donneur de NO n'induit aucun clivage de STAT5 dans les cellules lymphoïdes de type TCD8+ purifiés à partir de rates de souris naïves et traités *in vitro*, après activation avec des billes anti-CD3/CD28, avec doxorubicine +/- GTN (**Figure 18G**).

Tous ces résultats suggèrent fortement le rôle du GTN dans l'inhibition de l'effet immunosuppresseur des G-MDSC par inhibition de la voie de signalisation FATP2, via le clivage de STAT5 et l'inhibition de toute la voie de signalisation.

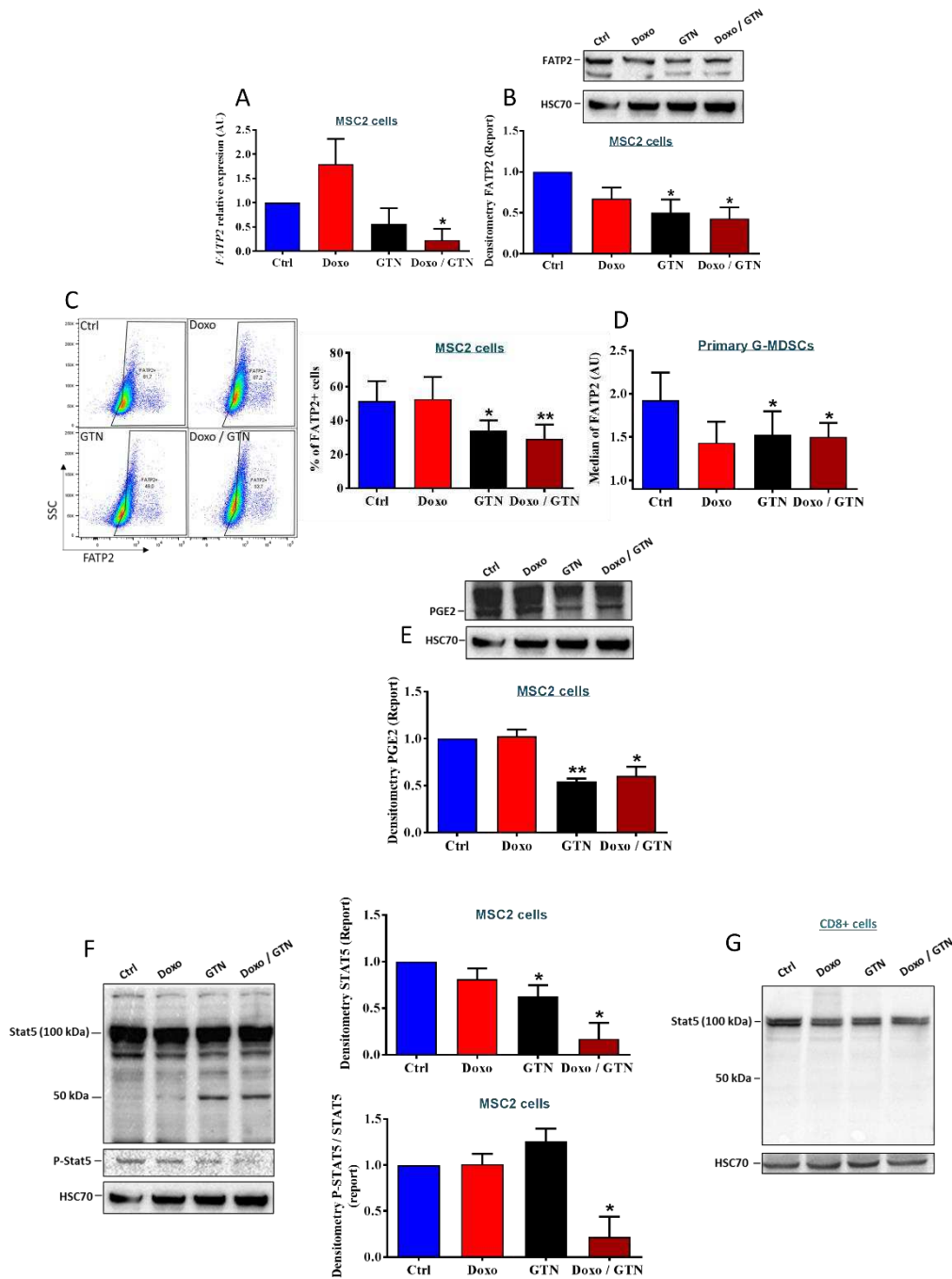


Figure 18 : L'association doxorubicine / GTN induit une inhibition de la voie de signalisation FATP2 dans les G-MDSC. A-B. Analyse de l'expression de FATP2 au niveau génique (A, RT-qPCR, n=3) et protéique (B, Western-blot, n=3) dans les cellules MSC2 traitées pendant 24h (A) ou 48h (B) avec doxorubicine (100nM) +/- GTN (100µM). C-D. Analyse par cytométrie en flux de l'expression membranaire de FATP2 sur les MSC2 (C, n=4) ou les G-MDSCs récupérées à partir de souris non traitées porteuses de tumeurs 4T1 (D, n=5 souris), traitées in vitro avec doxorubicine (100 nM) +/- GTN (100 µM) pendant 24h. E-F. Analyse par Western blot du taux de PGE2 (E, n=3) et STAT5/PSTAT5 (F, n=3) dans les cellules MSC2 traitées pendant 48h avec doxorubicine (100nM) +/- GTN (100µM). G. Analyse par western blot de l'expression de de STAT5 dans les cellules TCD8+ purifiées à partir de rate de souris naïve (n=1), et traitées in vitro avec doxorubicine (100nM) +/- GTN (100µM) pendant 48h. La révélation avec l'Ac anti-Hsc70 sert de contrôle de charge pour toutes les expériences de western blot (B, E-G). Analyse statistique par test t : \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01. Les statistiques présentées sur les figures A-F représentent les différences significatives par rapport au Ctrl.

### 3.2. Rôle de la S-nitrosylation de STAT5 dans son clivage

La doxorubicine (Ichikawa et al., 2014; Singal & Iliskovic, 1998; Songbo et al., 2019; Tang et al., 2020), tout comme les cellules G-MDSCs (Sica et al., 2019) sont connue pour produire des ROS qui, en se combinant avec du NO (provenant du GTN), produisent des RNS (peroxynitrites ONOO-, le trioxyde d'azote (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) et le dioxyde d'azote (N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)) qui peuvent générer des modifications post-traductionnelles au niveau des protéines. L'implication des ROS dans le clivage de la protéine STAT5, ainsi que la diminution de l'expression de FATP2 a été donc étudiée via l'utilisation d'un anti-oxydant, la N-acétyl cystéine (NAC). Ainsi, nous avons pu montrer par Western-blot dans les cellules MSC2 qu'en présence de NAC, l'association du GTN à la doxorubicine n'induit plus l'apparition de la forme clivée de STAT5 à 50 KDa (**Figure 19A**). En présence de NAC, il a été également montré que la combinaison du GTN à la doxorubicine n'est plus capable d'inhiber l'expression membranaire de FATP2 dans ces cellules (**Figure 19B**). Ce dernier résultat a également été retrouvé, *ex vivo*, dans les cellules primaires G-MDSCs récupérées à partir de tumeurs de souris 4T1, et traitées *in vitro* avec doxorubicine +/- GTN (**Figure 19C**). Ces résultats sont en faveur d'un rôle clé des espèces réactives de l'oxygène dans le clivage de STAT5. Afin de confirmer l'implication des ROS dans l'efficacité anti-tumorale de la combinaison du GTN à la doxorubicine, un suivi de croissance tumorale a été effectué dans des souris Balb/C porteuses de tumeurs 4T1 et traitées avec doxorubicine / GTN +/- NAC. Une inhibition de l'efficacité anti-tumorale de l'association doxorubicine / GTN a été observée lorsque nous la combinons avec la NAC (**Figure 19D**).

Nous savons que le NO, en présence de ROS, est capable d'induire plusieurs modifications post-traductionnelles pouvant moduler l'activité des protéines. Parmi ces modifications, on trouve la S-nitrosylation. Nous avons alors regardé si STAT5 pouvait être S-nitrosylée par du GTN ou un autre donneur exogène de NO comme le Cys-NO en utilisant la technique du biotin switch assay (BSA). Nous avons alors pu montrer que le GTN et le Cys-NO induisent la S-nitrosylation de STAT5 après 24h ou 15 min de traitement des cellules MSC2, respectivement (**figure 19E**). Tous ces résultats sont en faveur de l'implication des ROS et du NO, via la S-nitrosylation et le clivage de STAT5, dans la régulation négative de l'activité immunosuppressive des G-MDSC et ainsi dans l'activité anti-tumorale de l'association doxorubicine / GTN.

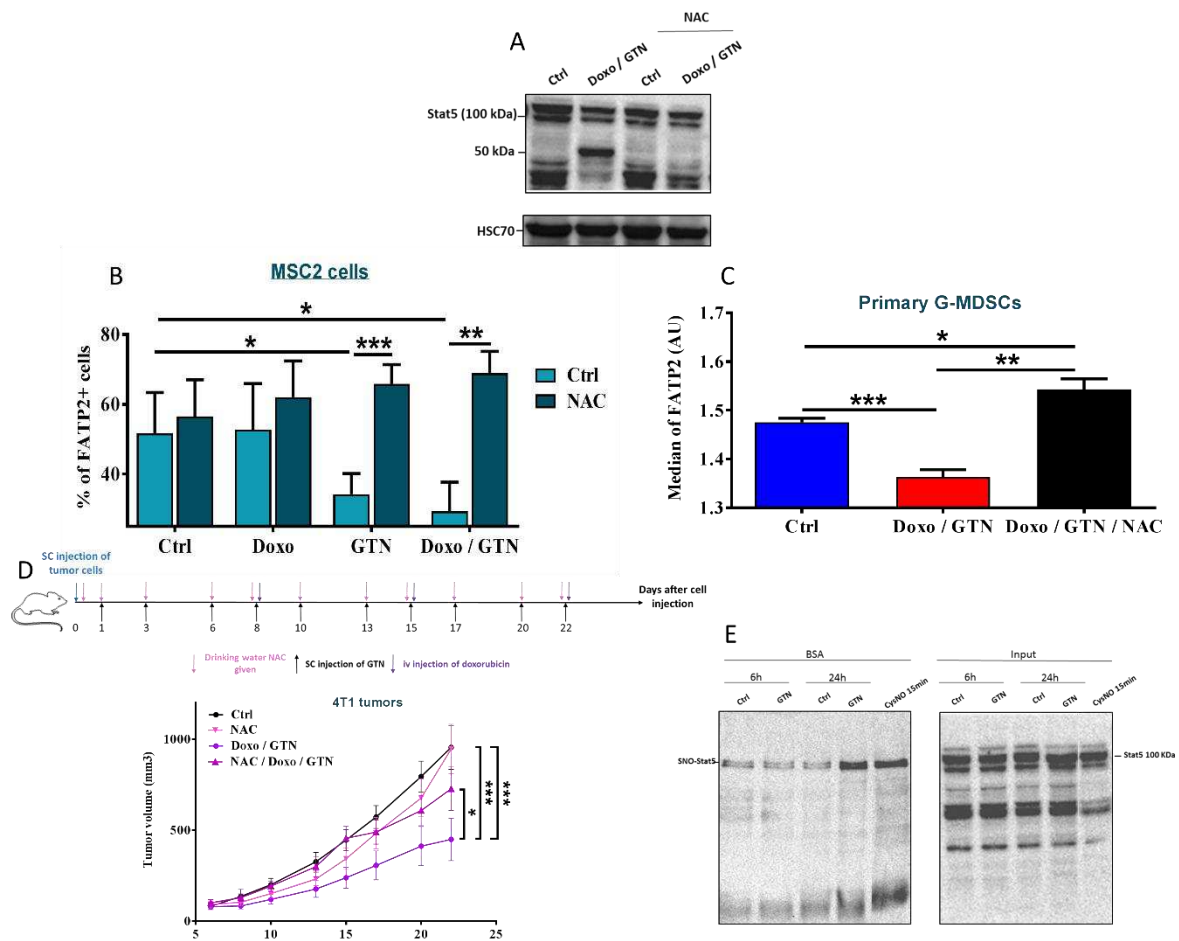


Figure 19 : Modulation de la voie STAT5 en réponse au GTN associé ou non à la doxorubicine. A. Analyse par western blot du clivage de STAT5 dans les cellules MSC2 ( $n=1$ ) traitées avec doxorubicine (100nM) +/- GTN (100 $\mu$ M) +/- NAC (10mM) pendant 48h. B-C. Analyse par cytométrie en flux de l'expression membranaire de FATP2 dans les cellules MSC2 (B,  $n=4$ ) et les cellules G-MDSCs récupérées à partir de souris non traitées porteuses de tumeurs 4T1 (C,  $n=5$  souris) traitées *in vitro* avec doxorubicine (100 nM) +/- GTN (100  $\mu$ M) +/- NAC (10 mM) pendant 24h. D. Etude de l'effet anti-tumoral de la combinaison doxorubicine / GTN en association ou non avec la NAC, dans des souris porteuses de tumeur mammaire 4T1 ( $n=7$ ) et traitées avec doxorubicine (8 mg/kg) +/- GTN (5 mg/kg) +/- NAC (3.5 mg/mL, dans l'eau de biberon), suivant le schéma d'injection présenté au-dessus du graphe. E. Analyse par biotin switch assay et western blot de la S-nietyosylation de STAT-5 dans les cellules MSC2 traitées avec GTN (100  $\mu$ M) pendant 6 ou 24h ou Cys-NO (1 mM, 15min). Analyses statistiques par t test (A-C) ou Two-way ANOVA (D) : \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .

# Discussion



#### IV. Discussion

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont porté sur la capacité d'un donneur de monoxyde d'azote, le GTN, à augmenter l'efficacité anti-tumorale d'une chimiothérapie de référence, la doxorubicine, dans le traitement du cancer du sein triple négatif (CSTN). Pour cela, nous avons réalisé une étude de croissance tumorale, afin de voir si l'association du GTN à la doxorubicine pouvait améliorer l'efficacité thérapeutique de cette chimiothérapie dans un modèle de cancer du sein établi via l'injection sous-cutanée de cellules mammaires TN 4T1 dans des souris Balb/C. Comme attendu, le GTN seul n'a induit aucun effet anti-tumoral contrairement à la doxorubicine seule pour laquelle la croissance tumorale était significativement ralentie. De manière très intéressante, l'ajout du GTN a potentialisé significativement ce ralentissement de la croissance tumorale observé avec la doxorubicine. Le même effet a été observé dans un autre modèle de cancer du sein obtenu par l'injection de cellules EMT6 dans des souris Balb/C. L'effet potentialisateur des donneurs de NO sur l'efficacité anti-tumorale de chimiothérapie a déjà pu être démontré en préclinique dans plusieurs modèles de cancers telles que le cancer du poumon non à petites cellules, colo-rectal, ovaire, tête et cou, prostate, sein... (Bratasz et al., 2008; Frederiksen et al., 2007; Gao et al., 2009; Huerta et al., 2009; Huerta-Yeppez et al., 2013; Kaliyaperumal et al., 2015; Selvendiran et al., 2008; Tesei et al., 2008). Cependant, à ce jour nous sommes la seule équipe à avoir mis en évidence l'importance de l'association d'un donneur de NO à la doxorubicine, dans le traitement du sous-type le plus agressif du CS, le TN. Une unique étude utilisant des nanoparticules libérant du NO (SMA-tDodSNO) ou chargées de doxorubicine (SMA-Dox) a été réalisée dans le modèle de souris porteuses de tumeurs 4T1. Dans cette étude, le donneur de NO utilisé (NO-releasing *tert*-dodecane S-nitrosothiol) semble avoir une tendance à freiner la croissance tumorale, contrairement à la doxorubicine encapsulée qui n'induit aucun effet. L'association des deux nanoparticules n'induit une diminution de la croissance tumorale qu'à un temps très précoce (6 jours post injection), cet effet étant ensuite perdu (Alimoradi et al., 2018). A part cette étude peu concluante, aucun autre travail de recherche n'a pu mettre en évidence l'importance du NO dans le traitement du cancer du sein et encore moins dans le cas particulier du cancer du sein triple négatif. En revanche, un certain nombre d'essais cliniques ont montré l'effet bénéfique d'associer des donneurs de NO à de la radiothérapie ou de la chimiothérapie, dans le traitement de différents types de cancers. Parmi ces études, nous retrouvons les essais cliniques de phase II, réalisés

chez des patients atteints d'un cancer de poumon non à petites cellules, combinant du GTN à des chimiothérapies comme la vinorelbine/cisplatine (Reinmuth et al., 2014; Yasuda et al., 2006) et/ou de la radiothérapie (Arrieta et al., 2014). D'autres essais cliniques, montrant les bénéfices à associer un donneur de NO à des traitements conventionnels, ont été également mis en place chez des patients atteints de cancer rectal (Illum et al., 2015), de cancer de la prostate (Siemens et al., 2009), ou de cancer du foie (Y. S. Liu et al., 2012).

Nous nous sommes, par la suite, demandés par quel mécanisme le GTN pouvait induire une augmentation de l'efficacité thérapeutique de la doxorubicine et avons commencé par l'étude de son effet sur la mort des cellules tumorales. Aux concentrations que nous avons utilisées, aucun effet synergique n'a pu être montré sur la mort des cellules 4T1 ou EMT6 *in vitro*, contrairement à l'équipe de Alimoradi H *et al.*, qui montrait un effet synergique de SMA-tDodSNO et doxorubicine dans l'induction de l'apoptose et la diminution de la viabilité des cellules 4T1. Dans cette étude, aussi bien le donneur de NO que la doxorubicine, étaient encapsulées dans des nanoparticules (Alimoradi et al., 2018). Plusieurs travaux ont montré que la densité des TILs et leur profil phénotypique constituaient un facteur pronostic et prédictif de la réponse aux chimiothérapies dans le cancer du sein (Asano et al., 2017; Kashiwagi et al., 2017; Kochi et al., 2018; Mao et al., 2014; McLemore et al., 2018). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'effet anti-tumoral de la combinaison du GTN à la doxorubicine, pouvait être dépendant de son effet sur la composition du paysage immunitaire de la tumeur. Nous avons alors regardé les modulations induites par cette combinaison sur ce paysage immunitaire en focalisant notre attention sur les cellules adaptatives CD4+ et CD8+, mais également sur des cellules de l'immunité innée telles que les MDSCs. Nos résultats indiquent que le GTN seul ou associé à la doxorubicine augmente significativement le recrutement intra-tumoral des LT CD4+ totaux, mais que seul la combinaison doxorubicine / GTN était capable d'augmenter les cellules T CD4+ activées. Par des expériences de différenciation des cellules TCD4+ *in vitro*, nous avons montré que le GTN induit l'augmentation de la différenciation des cellules T CD4+ naïfs en cellules Th1, alors que la doxorubicine induit une diminution de leur polarisation en cellules Th2, TReg et Tfh. L'identification de ces différentes sous-populations de cellules CD4+ dans la tumeur a été également réalisée, et a permis de confirmer les résultats obtenus sur les populations Th1 et Th2. En ce qui concerne les Tfh infiltrants les tumeurs, la diminution observée semble dépendre de la durée des traitements, puisqu'à J16 ce taux de Tfh est diminué en réponse au GTN alors qu'une augmentation de cette population est observée sous l'effet de

tous les traitements à J23. La présence de ces cellules Tfh dans les tumeurs est une donnée très intéressante puisque dans le cancer du sein, il a été montré que la présence des Tfh pouvait être un marqueur prédictif de survie des patientes (Gu-Trantien et al., 2013). En effet, le rôle principal décrit pour ces cellules serait de permettre le recrutement et l'activation des LB sécréteurs d'anticorps (Crotty, 2011). Ces LB semblent avoir un rôle controversé dans la prédiction et le pronostic du cancer du sein. En effet, plusieurs recherches précliniques (Tadmor et al., 2011) et cliniques (Guan et al., 2016) suggèrent que les LB jouent un rôle important dans l'inhibition de la réponse immunitaire, et peuvent être associés à mauvais pronostic dans le cancer du sein. Or, des données récentes de la littérature mettent en évidence que la présence de ces LB dans les tumeurs était corrélée à un bon pronostic chez les patientes atteintes d'un CSTN ou HER2+ (Garaud et al., 2019). Concernant les lymphocytes Tregs, contrairement à ce qui a pu être observé par la technique de différenciation *in vitro*, le taux des cellules CD45+/CD127-/CD25+ est augmenté à J16 dans les tumeurs de souris traitées par la combinaison de traitements. Cependant, cet effet ne semble être que transitoire puisqu'à J23, plus aucune différence significative n'a été observée. Ces cellules sont décrites pour jouer un rôle important dans l'inhibition du système immunitaire (Lee & Lee, 2018; Li et al., 2015; Qu et al., 2018). Elles ont ainsi été associées à un mauvais pronostic et une faible survie des patients, ou encore à une survie sans progression plus courte, ou à un risque de récurrence plus élevé, dans de nombreux types de cancers dont le cancer du sein (Bates et al., 2006; Kotsakis et al., 2016; Li et al., 2015; Woo et al., 2001). De plus, la présence des cellules Treg Foxp3+ est associée aux stades les plus avancés du cancer du sein (Li et al., 2018). McCoy et al., quant à eux, ont mis en évidence que les patients présentant une faible infiltration par les Treg étaient 5 fois plus susceptibles d'atteindre une réponse pathologique complète en réponse à la chimiothérapie néoadjuvante dans le cancer rectal (McCoy et al., 2015). Les résultats obtenus pour ces deux dernières sous-populations, qui sont les TReg et les Tfh, sont donc intéressants et mériteraient d'être approfondis et confirmés puisqu'ils sont issus d'une seule expérience réalisée sur 5 souris par groupe.

Pour revenir aux sous-populations Th1 et Th2, exactement les mêmes résultats ont été retrouvés avec la technique de différenciation *in vitro* et l'identification des cellules présentes dans les tumeurs. En effet, une augmentation intra-tumorale dépendante du GTN a été observée pour les cellules CD45+/CD4+/CCR6+/CXCR3+ (sous-population Th1) alors qu'une diminution des cellules CD45+/CD4+/CCR6-/CXCR3-/ST2+ (sous-population Th2), dépendante

du GTN (J16) ou de la doxorubicine (J23), a été observée. Ces résultats suggèrent que le donneur de NO pourrait favoriser précocement (J16), un profil immunitaire anti-tumoral riche en Th1 et pauvre en Th2, au sein du MET, contrairement à la doxorubicine qui agit un peu plus tardivement (J23) pour diminuer la polarisation de type Th2. En effet, il a été montré qu'un rapport élevé IFN- $\gamma$ /IL-4, deux cytokines produites respectivement par les Th1 et les Th2, était fortement associé à une diminution du risque de croissance tumorale ou de formation de métastases dans le cancer mammaire (DeNardo et al., 2009; Mandal et al., 2018; Pardoll, 2009; Zhang et al., 2015). En plus, une forte corrélation de la survie prolongée sans récurrence avec la présence des cellules Th1 a été observée dans le cancer colorectal (Tosolini et al., 2011), mais aussi dans de nombreux autres cancers (Ostrand-Rosenberg, 2005), y compris le cancer de sein (Yu et al., 2014; Zhao et al., 2019). Ces cellules Th1 exercent leur activité anti-tumorale, via la sécrétion de plusieurs cytokines dont l'IFN- $\gamma$ , soit directement sur les cellules tumorales pour induire un arrêt permanent de leur croissance (Braumüller et al., 2013), soit indirectement via la polarisation et l'activation des macrophages M1 (DeNardo et al., 2009), ou encore via le recrutement, l'expansion, la différenciation ainsi que l'activation des cellules cytotoxiques NK et TCD8+ (Dushyanthen et al., 2015; Lowenfeld et al., 2019; Lu, 2017), qui à leur tour se chargent de l'élimination des tumeurs. L'effet des Th1 sur le recrutement, la prolifération et l'activation des cellules TCD8+ a été mis en évidence dans plusieurs autres études, dont celle de Bos et Sherman, qui a montré que cet effet sur les cellules TCD8+ est lié à la capacité des cellules T CD4+ à sécréter de l'IFN- $\gamma$  mais aussi de l'IL-2 (Bos & Sherman, 2010). L'augmentation du taux intra-tumoral de cellules Th1 que nous avons observé en réponse au GTN nous a incité à tester l'implication des cellules TCD8+ dans l'effet anti-tumoral de l'association doxorubicine / GTN. Les résultats du suivi de croissance tumorale ont confirmé l'implication de ces cellules dans cet effet anti-tumoral, comme l'a montré l'inhibition de l'efficacité de la combinaison doxorubicine / GTN sur la progression tumorale, lorsque nous l'associons à un inhibiteur de LT CD8+. De plus, une augmentation significative de l'infiltration tumorale par des cellules TCD8+, dépendante de la combinaison doxorubicine / GTN, a été observée et confirmée par deux techniques différentes, la cytométrie en flux et l'immunohistofluorescence. L'infiltration de ces cellules dans les tumeurs représente un résultat très positif puisqu'il a été montré par une méta-analyse, sur environ 3000 patientes atteintes de cancer du sein HER2+ et TN, que des taux élevés de cellules TCD8+ au sein des tumeurs représentaient un biomarqueur pronostic de survie de ces patientes et prédictif de la réponse aux anthracyclines (Mao et al., 2016). Une

autre étude a également montré que des taux accrus de LT CD8 + infiltrant les tumeurs sont associés à une amélioration de la survie chez les patientes atteintes de cancer du sein, quel que soit le sous-type moléculaire (Ali et al., 2014). Dans le cas de traitements néoadjuvants du cancer du sein, il a été également montré qu'un rapport élevé de LT CD8+/Treg est corrélé à une réponse pathologique complète et à une meilleure survie des patientes (Asano et al., 2016). Globalement, la plupart des travaux mettent en évidence que des tumeurs riches en Th1 et en cellules TCD8+ et pauvres en Th2 constituent un profil de bon pronostic et prédisent une meilleure réponse des patientes aux traitements.

Les LT CD8+ font partie des cellules immunitaires qui expriment des points de contrôle immunitaire négatifs (PCI) à leur surface pour réguler leur activité. Parmi ces PCI on retrouve le PD-1, qui s'exprime de manière inductible sur ces LT afin de permettre la tolérance périphérique et éviter l'apparition des maladies auto-immunes (Haanen & Robert, 2015). Une étude de l'expression de ce PCI au niveau de ces cellules TCD8+ a été donc effectuée aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, et les deux expériences ont montré une augmentation, dépendante du GTN, de l'expression de PD-1 à la surface de ces cellules. L'expression de ce PCI au niveau des cellules T infiltrant les tumeurs est souvent corrélée à un épuisement de ces cellules et à l'inhibition de leur activité anti-tumorale (Ribas & Wolchok, 2018). Néanmoins dans les tumeurs mammaires humaine, il a été montré que les cellules TCD8+/PD-1+ restent toujours fonctionnelles avec une production de cytokines et une capacité de dégranulation accrue (Egelston et al., 2018). Une autre étude très récente a montré que l'infiltration tumorale par des LT CD8+/PD-1+ est un marqueur prédictif de la réponse aux chimiothérapies néoadjuvantes dans le cancer du sein (Liang et al., 2020). Ceci pourrait donc expliquer l'augmentation de l'efficacité thérapeutique de la doxorubicine que nous avons observé lorsqu'elle est associée au GTN. Ces résultats suggèrent que l'association de cette combinaison de traitements avec un inhibiteur de PD-1 pourrait améliorer encore plus son effet anti-tumorale. En effet, plusieurs études, dont celle d'Ottonello *et al.*, ont montré que l'expression de PD-1 sur les cellules T peut être considéré comme un marqueur de prédiction pour l'utilisation des Acs bloquants PD-1 (Ottonello et al., 2020). Malheureusement, aucune potentialisation de l'efficacité anti-tumorale n'a pu être observée lorsque nous avons associé un anti-PD-1 à la doxorubicine +/- GTN, même si une amélioration, non significative, a été observée lorsque nous comparons la doxorubicine seule à la combinaison doxorubicine / anti-PD-1 ou doxorubicine / GTN / anti-PD-1. Nous nous sommes donc demandés si cette absence d'effet induite par l'utilisation de l'anti-PD-1 n'était

pas dû à une diminution de l'expression d'un de ses ligands, PD-L1, sur les cellules tumorales. En effet, Chatterjee *et al.*, ont montré que les cellules cancéreuses mammaires avaient un potentiel immunosuppresseur dépendant de leur capacité à sécréter, sous la dépendance de TGF- $\beta$ , des vésicules extracellulaires sous forme d'exosomes contenant du PD-L1 (Chatterjee *et al.*, 2020). De nombreuses autres études, ont mis en évidence que l'expression de PD-L1, au niveau des tumeurs, représentait un biomarqueur d'efficacité des thérapies inhibant PD-1 (Carbone *et al.*, 2017; Garon *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2015; Topalian *et al.*, 2012). De plus, Migali *et al.*, ont montré que certaines chimiothérapies (le paclitaxel, l'étoposide, le 5-fluorouracile) peuvent sensibiliser à l'effet anti-tumoral des anti-PD-1/PD-L1 via l'augmentation de l'expression de PD-L1 sur les lignées cellulaires de cancer mammaire (Migali *et al.*, 2016). Nous avons donc regardé si nos différents traitements pouvaient moduler l'expression de ce ligand sur les cellules tumorales *ex vivo* et *in vitro*. De manière très intéressante, nous avons montré que les traitements par le GTN et la doxorubicine, seuls ou associés, induisent une diminution significative de l'expression de PD-L1 sur les cellules 4T1. Ces résultats concordent bien avec l'absence d'efficacité de l'anti-PD-1 lorsqu'il est rajouté à la combinaison doxorubicine / GTN. Tous ces résultats sont en faveur du rôle du NO dans l'augmentation intratumorale du taux de cellules TCD8+/PD-1+ non anergiques conduisant à l'élimination des cellules tumorales 4T1. De plus, l'expression de PD-1 sur ces cellules, et ainsi leur inhibition, peut-être en partie contrée par l'effet du GTN et/ou de la doxorubicine sur l'expression de PD-L1 dans les cellules tumorales.

Cependant, les cellules tumorales ne sont pas les seules cellules exprimant PD-L1. En effet, une autre population cellulaire connue pour exprimer ce ligand à sa surface, et jouant un rôle très important dans l'inhibition des cellules TCD8+ et la progression tumorale, est la population de cellules myéloïdes immunosuppressives MDSCs (Lu *et al.*, 2016). En effet, il a été montré que l'inhibition de l'expression de PD-L1 dans les cellules tumorales ne semble pas impacter l'efficacité thérapeutique des anti-PD-1 contrairement à ce qui peut être observé dans les MDSCs (Tang *et al.*, 2018). L'expression de PD-L1 représenterait donc un des mécanismes par lesquels ces cellules exercent leur fonction immunosuppressive sur les cellules T effectrices (Sica *et al.*, 2019). Nous avons alors focalisé notre attention sur cette population cellulaire et avons pu montrer que les traitements seuls ou combinés n'induisent pas de modifications du taux intratumoral des cellules CD45+/CD11b+/Gr-1+ qui correspondent aux cellules MDSCs totales. Cette population de cellules MDSCs comprenant les MDSCs d'origine monocyttaire (M-MDSCs) et

celles d'origine granulocytaire (G-MDSCs), nous avons alors regardé si le rapport entre ces deux sous-populations pouvait être modifié en réponse à nos traitements. De manière très intéressante, nous avons pu montrer qu'à J16, la combinaison doxorubicine / GTN induisait une diminution significative de l'infiltration tumorale par les cellules CD45+/CD11b+/Gr+/Ly6G- (M-MDSCs), et à l'inverse une augmentation significative de l'infiltration tumorale par les cellules CD45+/CD11b+/Gr+/Ly6Ghigh (G-MDSCs). Cet effet semblait assez stable dans le temps même si, à J23, il est également observé, mais cette fois-ci sous la dépendance de la doxorubicine. Cet effet de la doxorubicine dans l'augmentation des G-MDSCs a été retrouvé également dans le sang de patientes atteintes de différents sous-types de cancer du sein dont le TN (Wesolowski et al., 2017). De plus, une étude assez récente, réalisée sur un modèle préclinique de carcinome épidermoïde de la tête et du cou associé au papillomavirus humain, a montré que la combinaison de la chimioradiothérapie (10 fractions of 3 Gy + cisplatine) à un inhibiteur de l'iNOS, induit la diminution des G-MDSCs, et une augmentation du ratio LT CD8+/Treg et des cellules anti-tumorales M1 (Hanoteau et al., 2019). L'effet des traitements sur le recrutement et l'activation des différentes populations immunitaires au sein des tumeurs semble donc être dépendant du type du cancer et des interactions entre ces différentes cellules. Nous avons alors regardé l'expression de PD-L1 sur ces cellules, et avons trouvé que seules les G-MDSCs voient leur taux de PD-L1 membranaire diminuer en réponse à la doxorubicine seule (J23) ou en combinaison au GTN (J16 et J23). L'activité immunosuppressive des G-MDSC est dépendante de l'expression de PD-L1 mais est également associée à l'expression d'un certain nombre de gènes tels que *S100A9*, le récepteur à la PGE2 (*PGE2R*) et l'*iNOS*. Nous avons alors pu montrer, par RNAseq réalisé sur la tumeur entière, que la combinaison doxorubicine / GTN induisait la diminution de l'expression de ces gènes à J16. *S100A9* (MRP14 (myeloid-related protein 14) ou calgranulin B), tout comme son partenaire de dimérisation *S100A8* (MRP8, ou calgranulinA), est un membre de la famille des protéines S100 dépendantes du calcium, exprimé dans le cytoplasme des neutrophiles et des monocytes circulants. En réponse à une augmentation du calcium intracellulaire, ces deux protéines migrent du cytoplasme à la membrane plasmique des cellules myéloïdes, pour être libérées sous forme d'hétérodimères (calprotectine) et permettre le recrutement des leucocytes au sein des tumeurs (P. Cheng et al., 2008; Laouedj et al., 2017). Une augmentation de l'expression de ces deux protéines a été retrouvée dans de nombreux types de cancers, y compris les cancers de la prostate, du côlon, du pancréas, de la peau et du sein, où elles stimulent le recrutement des cellules myéloïdes, ainsi que des MDSCs.

La présence de ces protéines est donc associée à une augmentation de la croissance tumorale, à la formation de métastases et est dans la majorité des cas corrélée à un mauvais pronostic et une faible survie (Bergenfels, Gaber, et al., 2015; P. Cheng et al., 2008; Gebhardt et al., 2006; Gunaldi et al., 2015; Hermani et al., 2006; Hiratsuka et al., 2006; Ichikawa et al., 2011; Moris et al., 2016; Shabani et al., 2018; Srikrishna, 2012; Y. Wang, K. Yin, et al., 2019; Zhang et al., 2017). Outre l'accumulation des cellules MDSCs, l'augmentation de l'expression de S100A9 induit également une inhibition de la différenciation intra-tumorale des CD et des macrophages (P. Cheng et al., 2008).

La PGE2, quant à elle, joue un rôle important dans la progression tumorale. Cet acide gras peut être produit aussi bien par les cellules tumorales que par les MDSCs, et joue un rôle important dans la suppression, directe ou indirecte, des cellules T. En effet, outre son puissant rôle immunosuppresseur direct, cette molécule induit également le recrutement intra-tumoral des MDSCs via l'induction de CXCL12 / SDF1, mais également l'induction et la stabilisation du récepteur à CXCL12, CXCR4, sur les MDSCs associées aux tumeurs (Obermajer et al., 2012). Cette PGE2 sécrétée par les tumeurs, joue également un rôle très important dans la reprogrammation, dépendante de la voie p50 NF- $\kappa$ B, des cellules M-MDSCs vers un phénotype immunosuppresseur (Porta et al., 2020), ainsi que la potentialisation de leur fonction immunosuppressive et l'augmentation de leur capacité à induire la prolifération des cellules Treg (Tomić et al., 2019). Les cellules les plus affectées par la PGE2 sont les cellules myéloïdes immunosuppressives (CMI), exprimant à leurs surfaces les récepteurs prostanoides de type E, tel que EP4. L'interaction PGE2-EP4 joue ainsi un rôle très important dans le switch fonctionnel au niveau des cellules myéloïdes en faveur de l'immunosuppression. En effet, elle favorise la différenciation intra-tumorale des cellules pro-tumorales, les macrophages associés aux tumeurs et les MDSCs, au détriment des cellules anti-tumorales, les macrophages M1. Ainsi, l'équipe de Lu *et al.*, a montré que l'utilisation d'un antagoniste sélectif d'EP4 (TP-16), induisait une inhibition de l'activité immunosuppressive des CMI et une augmentation de l'élimination des tumeurs colorectales, dépendante des cellules T cytotoxiques (Lu et al., 2020). La PGE2 a été également mise en évidence pour jouer un rôle important dans l'expression de plusieurs molécules intervenant dans l'immunosuppression induite par les MDSCs, telles que PD-L1 (Prima et al., 2017), l'arginase, l'IDO et l'iNOS (Donkor et al., 2009; Obermajer et al., 2012; Ochoa et al., 2007). En ce qui concerne l'iNOS, l'étude de Raber et al., a montré que l'activité immunosuppressive des deux populations de MDSCs passe en grande partie par la voie du NO,



même si les mécanismes d'inhibition restent un peu différents et spécifiques de chaque population cellulaire. Ainsi, ils ont montré que le mécanisme des G-MDSCs passe par la production des péroxinitrites dépendante de la phagocyte oxydase gp91<sup>phox</sup> (NOX2) et de la eNOS, contrairement à celui des M-MDSCs qui est plus lié à la production du NO via l'expression de l'iNOS (Raber et al., 2014). Dans ce même article, ils ont également montré, à partir de modèles de cancer du poumon (cellules 3LL), du colon (MCA-38) mais aussi de thymome (EL-4) et de mélanome (B16), que les G-MDSCs exerçaient une activité inhibitrice sur les cellules T beaucoup plus importante que les M-MDSCs (Raber et al., 2014). Cependant d'autres études (Dolcetti et al., 2010; Kumar et al., 2016; Law et al., 2017), tout comme la nôtre (données non montrées), ont montré qu'au contraire la fonction immunosuppressive des M-MDSC était largement supérieure à celle des G-MDSC. Cette différence d'activité immunosuppressive peut-être dépendante du type de cancer étudié. Dans notre modèle elle est en faveur d'une diminution du potentiel immunosuppresseur du MET puisque le ratio G-MDSC / M-MDSC augmente en réponse au traitement par la combinaison doxorubicine / GTN. De plus, nous avons également pu montrer que cette combinaison de traitement induisait une diminution significative de la capacité suppressive de ces G-MDSCs sur les cellules TCD8+. Ce résultat concorde bien avec l'étude de De Santo *et al.*, qui a montré une restauration de la prolifération des LT lorsqu'ils sont co-cultivés avec les MDSCs, une augmentation de l'activité cytotoxiques des LT CD8+, ainsi qu'une diminution de l'activité des MDSCs *in vivo* et *in vitro*, en réponse au NO. Cette équipe a utilisé deux nitroaspirines, la NCX4060 et la NCX4016, correspondant à des donneurs de NO liés de manière covalente à des molécules d'aspirine (De Santo et al., 2005). Tous ces résultats sont donc en faveur d'un rôle inhibiteur de la capacité immunosuppressive des MDSC en modifiant le rapport G-MDSC/M-MDSC intra-tumoral et en inhibant la capacité des G-MDSC à inhiber la prolifération des LT CD8+.

Plusieurs théories ont été proposées afin d'expliquer l'origine et la nature des G-MDSCs. La première et la plus connue est que ces G-MDSCs correspondent à une proportion de neutrophiles immatures provenant d'une myélopoïèse d'urgence et aberrante, en réponse à certaines cytokines et facteurs de croissances secrétés par les tumeurs (Pillay et al., 2013). La deuxième serait que ces G-MDSCs correspondent à un sous-ensemble hétérogène de neutrophiles alternativement activés (Condamine et al., 2016; Millrud et al., 2017; Pillay et al., 2012; Rodriguez et al., 2009), ou encore à des neutrophiles présents à des stades de maturation distincts mais avec un profil spécifique à la maladie (Mehmeti-Ajradini et al., 2020). L'étude de

l'expression des chimiokines par RNAseq et RT-qPCR a montré la diminution de plusieurs chemoattractants des MDSCs reflétant une diminution du recrutement tumoral des G- et M-MDSCs. Une reprogrammation intra-tumorale des G-MDSCs en faveur d'une diminution de l'immunosuppression est donc très probable. A ce jour il n'existe pas un moyen efficace pour distinguer les neutrophiles immatures et/ou G-MDSCs, de ceux matures ou activés au sein de la tumeur, contrairement à ce qui peut être réalisé dans le sang. En effet, l'utilisation de la technique des centrifugations en gradient de Ficoll, a permis d'associer les G-MDSCs aux granulocytes ayant une faible densité (LDG (low density granulocytes)), contrairement aux neutrophiles qui sont de haute densité (HDG (high density granulocytes)) (Sagiv et al., 2015). Néanmoins, deux sous-types de cellules CD11b<sup>+</sup>/Ly6G<sup>+</sup>/Ly6C<sup>low</sup> infiltrants les tumeurs ont été distingués dans les adénocarcinomes pulmonaires chez la souris, en se basant sur l'intensité d'expression de la protéine fixant l'acide sialique SiglecF : les cellules SiglecF<sup>low</sup> (cellules spectatrices sans aucun rôle sur la progression tumorale) et les cellules SiglecF<sup>high</sup> (pro-angiogéniques et pro-tumorales). La surexpression de cette protéine chez les patients atteints d'un adénocarcinome pulmonaire était également associée à une aggravation de la maladie et à un faible pronostic (Engblom et al., 2017). Même si l'origine de ces cellules et leur caractérisation n'ont pas été identifiées, ces G-MDSC intra-tumorales en réponse à la combinaison doxorubicine/GTN perdent leur capacité immunosuppressive. Récemment, l'impact du métabolisme lipidique dans la reprogrammation des cellules immunitaire, dans la progression tumorale et dans la réponse aux traitements a été mise en évidence (Chalmin et al., 2018). Citons à titre d'exemple l'étude de Veglia *et al.*, qui a mis en évidence le rôle primordial d'un des transporteurs d'acides gras, la protéine FATP2 (Fatty Acid Transport Protein 2), dans l'activation et la reprogrammation des G-MDSCs. Une augmentation de cette protéine semble ainsi jouer un rôle important dans l'augmentation de la fonction immunosuppressive de ces cellules, et de la croissance tumorale (Veglia et al., 2019). L'expression de cette protéine pourrait être utilisée comme un marqueur pour différencier les G-MDSCs immunosuppresseurs de ceux dépourvus de cette activité. Nous nous sommes donc intéressés à cette protéine dans une lignée de MDSCs, les cellules MSC2 mais également dans des G-MDSCs primaires. De manière très intéressante, nous avons montré qu'en réponse au GTN +/- doxorubicine, l'expression du gène *FATP2* est diminuée, tout comme la protéine totale ou membranaire. Cette diminution de FATP2 conforte nos résultats quant à la diminution de la suppression induite par les G-MDSCs sur les LT CD8+, en réponse à la combinaison doxorubicine / GTN. Nous

avons alors entrepris d'étudier le mécanisme par lequel le GTN diminue FATP2. La voie de signalisation à l'origine de l'expression membranaire de ce transporteur d'acides gras a été décrite dans l'article de Veglia *et al.*, et mettait en évidence qu'elle était sous le contrôle du GM-CSF. Ce dernier allait alors activer STAT5 des G-MDSCs qui, une fois phosphorylé (P-STAT5), va induire la transcription du gène *Slc27A2* et sa traduction en protéine FATP2. Une fois exprimée à la membrane, cette dernière va permettre l'entrée de l'acide arachidonique et la formation de la PGE2, qui à son tour permet l'inhibition des cellules TCD8+ (Veglia *et al.*, 2019). Nous avons alors pu montrer que les taux de STAT5, P-STAT5 et PGE2 étaient tous diminués en réponse au GTN +/- doxorubicine. De manière inattendue, la diminution du taux de STAT5 était accompagnée par l'apparition, toujours sous la dépendance du GTN, d'une bande à 50 KDa, correspondant probablement à une forme clivée de STAT5. La voie de signalisation STAT5 n'étant pas impliquée uniquement dans les cellules myéloïdes de type G-MDSCs/neutrophiles, mais également dans les cellules lymphoïdes tels que les LT CD8+ (Burchill *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2003; Verdeil *et al.*, 2019), nous nous sommes demandés si le clivage de STAT5 était spécifique des cellules myéloïdes. La présence de la bande à 50 KDa, en réponse au GTN +/- doxorubicine dans les cellules TCD8+ a été donc recherché, et les résultats n'ont montré aucun effet du GTN sur le clivage de STAT5 dans ces cellules lymphoïdes. Ces résultats confirment donc notre hypothèse que le clivage de STAT5 est spécifique aux cellules myéloïdes MDSCs. Tous ces résultats suggèrent que l'effet du GTN sur la diminution de l'expression de FATP2 dans les G-MDSCs, est lié à sa capacité à inhiber STAT5 en diminuant sa phosphorylation et/ou en la clivant. Il est connu que le NO, dans un environnement oxydant, induit la production des RNS, tels que les peroxynitrites ONOO-, le trioxyde d'azote N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et le dioxyde d'azote N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces derniers, sont connus pour induire des modifications post-traductionnelles sur différentes protéines, dont les plus connus sont la tyrosine nitration (Dilek *et al.*, 2012; Ischiropoulos, 2003; Markowitz *et al.*, 2017; Nagaraj *et al.*, 2007; Turko & Murad, 2002) et la S-nitrosylation (Fernando *et al.*, 2019). Ces modifications sont donc très dépendantes de l'état redox de la cellule, qui sont régulées par les systèmes NADPH/NADP+, GSH/GSSG et le système thioredoxine (T/TR) (Böhm *et al.*, 1998; Schafer & Buettner, 2001; Yasinska *et al.*, 2004). Nous savons que la doxorubicine est une chimiothérapie capable de produire de fortes quantités de ROS, qui sont à l'origine de la cardiocytotoxicité observée chez les patients traités avec cette chimiothérapie (Ichikawa *et al.*, 2014; Singal & Iliskovic, 1998; Songbo *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2020). Nous avons donc émis l'hypothèse que les ROS, provenant de la doxorubicine ou encore

produits en basal par les G-MDSCs (Sica et al., 2019), interagissent avec le NO, provenant du GTN, afin d'induire des modifications post-traductionnelles à l'origine du clivage de STAT5. Afin de confirmer cela, nous avons utilisé un anti-oxydant, la N-acétyl cystéine (NAC), et avons montré qu'en présence de NAC, le GTN +/- doxorubicine n'induit plus le clivage de STAT5, ni la diminution de l'expression de FATP2 membranaire. De plus, en présence de la NAC, une perte de l'efficacité anti-tumorale de la combinaison doxorubicine / GTN a été observée.

Nous nous sommes alors demandés si le GTN pouvait induire la S-nitrosylation de STAT5, et avons recherché, via l'utilisation d'un logiciel de prédiction de site de S-nitrosylation « GPS-SNO », si cette protéine contenait des cystéines potentiellement S-nitrosylables. Deux cystéines (C392 et C719) pour l'isoforme B et une (C392) pour l'isoforme A ont été prédites comme étant potentiellement S-nitrosylables. Une expérience de biotin switch assay, a été par la suite réalisée, et nous a permis de montrer que le GTN induit la S-nitrosylation de STAT5. Afin de confirmer l'implication des ROS dans la S-nitrosylation de STAT5, nous prévoyons de réaliser un biotin switch assay sur des cellules MSC2 traitées avec GTN +/- NAC. Afin de confirmer l'implication de cette S-nitrosylation dans le clivage de STAT5, nous envisageons également de muter la cystéines 392 et confirmer la perte du clivage en réponse au traitement par GTN (**Figure 20**). Une étude de la tyrosine nitration de cette protéine en réponse au GTN est à prévoir aussi, si nous excluons l'implication de la S-nitrosylation, puisque nous avons montré que la phosphorylation de STAT5 diminue en réponse au GTN. Une déphosphorylation suite à la nitration de ces tyrosines est donc très probable, d'autant plus que ce même logiciel GPS-SNO nous a sorti trois tyrosines (Tyr 171, Tyr 90 et Tyr 225) pouvant être potentiellement nitrées.

Ce travail nous a donc permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme très original de reprogrammation des G-MDSCs vers un phénotype moins immunosuppresseur. Ce mécanisme complètement dépendant du GTN, semble être à l'origine de l'effet anti-tumoral observé lorsque nous associons le GTN à une des chimiothérapies couramment utilisées dans le traitement du CSTN, la doxorubicine. Cet effet reposant principalement sur le rôle du GTN, en présence des ROS, à moduler le métabolisme lipidique dépendant de la protéine FATP2, via la S-nitrosylation de STAT5 et l'inhibition de toute la voie de signalisation qui en découle (FATP2, PGE2). Cette reprogrammation serait à l'origine de l'augmentation de l'infiltration tumorale par des cellules TCD8+/PD-1+ (**Figure 20**). En parallèle nous sommes en train de réaliser une étude de RNAseq sur une cohorte de patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif (28 patientes) ou de cancer de sein RH+ et HER2+ (11 patientes) avant, pendant et après

traitements par des anthracyclines. Le but est de réussir à retrouver des biomarqueurs en faveur de l'utilisation du GTN en clinique, dans le traitement des patientes atteintes d'un cancer du sein.

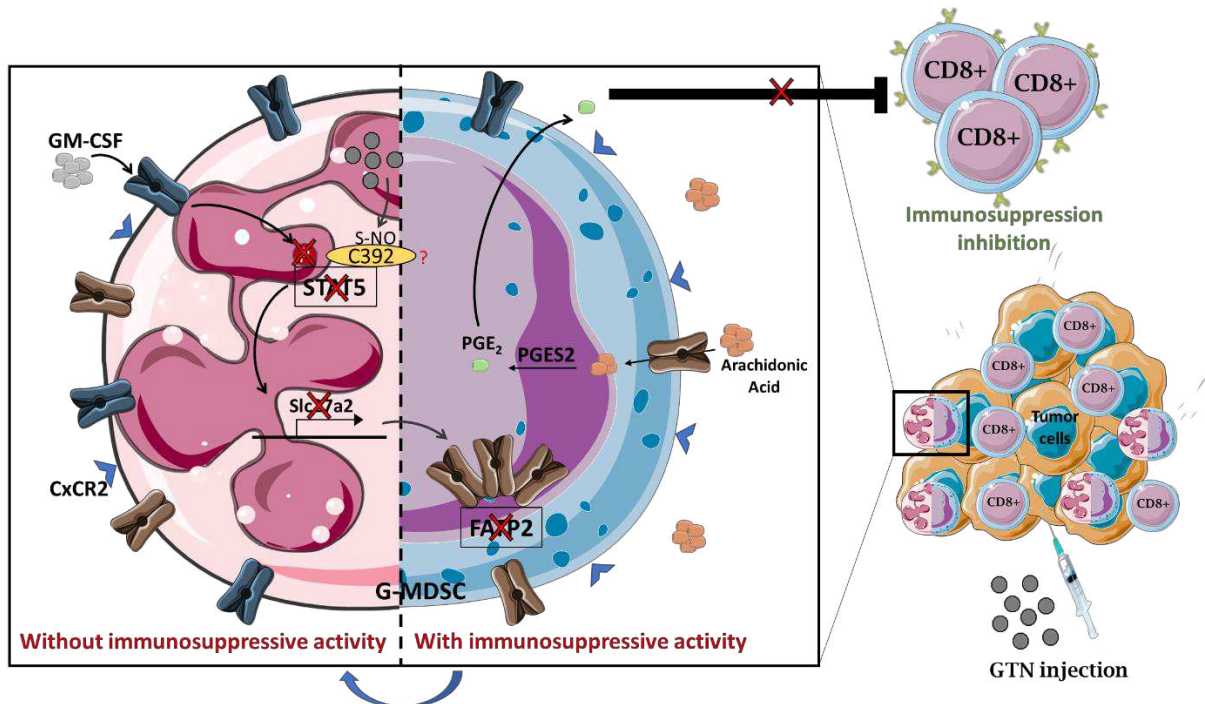


Figure 20 : *Reprogrammation des G-MDSCs en cellules moins immunosuppressives en réponse au GTN.* Le GTN, en S-nitrosylant STAT5 induit une diminution de la voie de signalisation responsable de l'expression du transporteur d'acides gras, FATP2. Il en découle donc une diminution de l'entrée d'acide arachidonique à l'intérieur des cellules, de la synthèse et de la sécrétion de la PGE2 et donc de l'immunosuppression induite par ces G-MDSCs sur les LT CD8+, et de la prolifération tumorale.

# Matériel et méthodes

## V. Matériel et méthodes

### 1. Modèles tumoraux et traitements

Des souris femelles Balb / C âgées de 6 à 8 semaines, obtenues auprès de l'animalerie centrale de l'université de Bourgogne ou de Charles River, ont été utilisées. Toutes les expérimentations animales ont été réalisées selon des protocoles approuvés par le comité d'éthique local et validés par le ministère (Apafis # 10666). Pour induire les tumeurs, des souris, préalablement anesthésiées à l'isoflurane, ont été injectées en sous-cutané avec  $5 \times 10^5$  cellules cancéreuses mammaires (4T1 ou EMT6). Le traitement en sous-cutané par le GTN (5 mg / kg) ou sérum physiologique (NaCl, Ctrl) a débuté le lendemain de l'injection des cellules tumorales et a été renouvelé 3 fois par semaine. L'injection intraveineuse de la doxorubicine (8 mg / kg dans 100  $\mu$ L de NaCl) ou de NaCl a commencé lorsque les tumeurs ont atteint un volume d'environ 50  $\text{mm}^3$  (~ jour 8) et a été renouvelée une fois tous les 7 jours. L'injection intrapéritonéale de l'anticorps anti-PD-1 (Bioxccl, 10 mg / kg dans 100  $\mu$ L de NaCl) ou de NaCl a débuté le lendemain de la première injection de la doxorubicine et a été renouvelée deux fois par semaine. Pour la déplétion des lymphocytes TCD8 +, l'injection intrapéritonéale de l'anti-CD8 (Bioxccl, 5 mg / mL, diluée dans 100  $\mu$ L de NaCl) ou de l'isotype contrôle IgG2a (5 mg / mL dans 100  $\mu$ L de NaCl) a commencé la veille de la première injection de la doxorubicine et a été renouvelée une fois par semaine. Le traitement par un antioxydant, la N-acétyl-L-cystéine (NAC, Sigma Aldrich, 3,5 mg / mL), diluée dans l'eau de boisson, a débuté le lendemain de l'injection des cellules tumorales et a été renouvelé 3 fois par semaine. Un suivi de croissance tumorale a été réalisé par mesure de la taille des tumeurs à l'aide d'un pied à coulisse tous les 2-3 jours. Les animaux ont été sacrifiés lorsque le volume tumoral a atteint 2000  $\text{mm}^3$ .

### 2. Lignées cellulaires

Cellules tumorales : les cellules cancéreuses murines 4T1 (cancer du sein triple négatif) et EMT6 (cancer du sein), ont été obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) et ont été testées régulièrement pour la contamination mycoplasique en utilisant le kit de détection universel Mycoplasma (ATCC). Ces cellules ont été maintenues en culture dans du milieu DMEM (Dominique Dutscher) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Dominique Dutscher), à 37 ° C en atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>.

Cellules myéloïdes MSC2 : il s'agit d'une lignée cellulaire de MDSCs immortalisées, obtenue à partir de splénocytes Gr1+ de Balb / C, qui provient du laboratoire de V. Bronte (Istituto Oncologico, Padova, Italie). Elle a été cultivée dans du RPMI (Dominique Dutscher) supplémenté avec 10% de SVF (Dominique Dutscher) et 1% de mélange antibiotique pénicilline, streptomycine et amphotéricine B (PSA, PAN Biotech) à 37 ° C sous 5% de CO<sub>2</sub>.

Les cellules ont été comptées manuellement à l'hémocytomètre de Malassez en présence de bleu de trypan, pour évaluer le pourcentage des cellules mortes, puisensemencées dans des plaques de culture à 6 puits, à la concentration cellulaire de 5 x 10<sup>5</sup> ou 3,5 x 10<sup>5</sup> cellules / puits pendant 24h ou 48h respectivement. Pour l'expérience de biotin switch assay, les cellules MSC2 ont étéensemencées en duplicat dans des flasques de culture cellulaire T175 à 11 x 10<sup>6</sup> ou 8 x 10<sup>6</sup> pour les cinétiques 6 et 24h, respectivement.

### 3. Isolement des cellules immunitaires primaires à partir de souris

Les G-MDSCs : des souris Balb / C ont été injectées avec des cellules tumorales mammaires 4T1 et traitées avec NaCl (Ctrl) +/- doxorubicine +/- GTN. Vingt-trois jours post-injection des cellules cancéreuses, les tumeurs ont été récupérées et les G-MDSC ont été isolées après dissociation des tumeurs (solution de dissociation : RPMI, 2% SVF (Dominique Dutscher), 40 M HEPES (Gibco), 1 mg / mL collagénase (Sigma) et 0,1 mg / mL DNase (Sigma)) et élimination des globules rouges (solution hémolytique : 0,83% NH<sub>4</sub>Cl, 0,1% KHCO<sub>3</sub> et 0,1 mM EDTA). Une fois purifiées, en utilisant le kit Anti-Ly6G Microbeads UltraPure (Miltenyi, pureté à 80-90%), les G-MDSC ont été cultivées seules dans des plaques de culture à 12 puits (5 à 10 x 10<sup>5</sup> cellules) afin d'évaluer l'expression de FATP2 par cytométrie en flux. Pour évaluer l'effet des traitements sur l'activité immunosuppressive des G-MDSCs, ces dernières ont été co-cultivées, pendant 5 jours, avec des lymphocytes T (isolées à partir de rates de souris naïves en utilisant le kit Pan T cells, Miltenyi) activés avec des Dynabeads CD3 / CD28 (Gibco) et marqués au cell trace<sup>TM</sup> violet (Invitrogen), dans des plaques de culture à 96 puits (1 x 10<sup>5</sup> cellules T + 0,2 ou 0.5 ou 1 x 10<sup>5</sup> G-MDSCs). Du milieu RPMI + 10% de SVF décomplémenté (incubation 30 minutes à 56 ° C) + 1% de PSA a été utilisé pour la culture.



Les lymphocytes T : Les cellules T ont été isolées à partir de la rate et des ganglions lymphatiques de souris Balb / C naïves à l'aide du Pan T Cell Isolation Kit II, souris (Miltenyi) selon les instructions du fabricant, et cultivées dans des plaques de culture à 96 puits (2 x 10<sup>5</sup> cellules) après activation avec des Dynabeads CD3 / CD28 (Gibco), dans RPMI + 10% SVF + 1% PSA.

#### 4. Différenciation *In vitro* des LT CD4+

Des cellules T CD4+ naïves (CD4+ / CD62L+) ont été isolées à partir de rates et de ganglions lymphatiques de souris Balb / C (naïves), après élimination des globules rouges (solution hémolytique : 0,83% NH<sub>4</sub>Cl, 0,1% KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM EDTA), en utilisant le kit de purification en deux étapes CD4+ CD62L+ MACS (Miltenyi). Cinq cent mille cellules ont ensuite été incubées dans une plaque 96 puits en présence d'anticorps CD3 (2 µg / ml, Biolegend) et CD28 (2 µg / ml, Biolegend), dans un milieu spécial (RPMI, 10% SVF, 1% PSA, 50 M Hepes (Gibco), des acides aminés non essentiels (1X, Gibco) et 100 mM de sodium pyruvate (Gibco)), en présence ou non d'anticorps bloquants (BioXcell) et de cocktails de cytokines (R&D Systems) spécifiques de la différenciation en sous populations T d'intérêt (Tableau ci-dessous). Après 72h de traitement avec doxo (500 nM) +/- GTN (10 µM), les cellules ont été récupérées et les ARN totaux ont été extraits avec du trizol (Invitrogen) afin de quantifier, par RT-qPCR, l'expression des gènes spécifiques de chaque sous-population lymphocytaire. La formule  $2^{-\Delta\Delta CT}$  a été appliquée, après soustraction de l'actine ( $\Delta CT$ ) et normalisation par rapport aux cellules Th0 (pour Th1 et Th2) ou aux cellules Tnaif (pour Tfh et Treg) ( $\Delta\Delta CT$ ).

	Antibodies (µg/mL)				Cytokines (ng/mL)				
	Anti-IL-4	Anti-IL-6	Anti- FN-γ	Anti-TGFβ	IL-6	IL-12	TGFβ	IL-4	IL-21
Th0	10	20	10	20					
Th1	10					10			
Th2			10					10	
Treg	10		10				4		
Tfh	10		10	20	30				50

## 5. Traitements cellulaires

Pour les expériences *in-vitro* ou *ex-vivo*, les cellules ont été traitées ou non (Ctrl) pendant 24 ou 48h avec 100, 250 ou 500 nM de doxorubicine +/- 10 ou 100 µM de GTN (Merck, Lyon, France) +/- 10 mM de NAC. Les cellules MSC-2 ont également été traitées avec 1 mM de Cys-NO (contrôle positif de S-nitrosylation) pendant 15 min.

## 6. RT-qPCR

L'ARN total a été extrait à partir de cellules ou de tumeurs avec du Trizol® (Ambion by life technologies) et quantifié en mesurant la densité optique (DO) à 260 nm à l'aide du NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Cent à cinq cents nanogrammes d'ARN ont été transcrits en ADN complémentaire (ADNc) en utilisant la transcriptase inverse Moloney murine leukemia virus (M-MLV), des random primers (0,5 µg/µg d'ARN, Promega) et de recombinant RNasin® Plus RNase Inhibitor (Promega). La qPCR a ensuite été réalisée dans des plaques à 96 puits pour quantifier les ADNc à l'aide d'un Master mix PowerUp™ SYBR™ Green (Applied biosystems). L'expression des ARNm a été déterminée en utilisant la méthode  $2^{-\Delta Ct}$  après soustraction de l'actine ou de PPIA ( $\Delta Ct$ ). Les amorces sens et anti-sens utilisées (Eurogentec) sont répertoriées dans le tableau suivant.

<b>Primers (mouse)</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<i>CXCR2</i>	CAGTTCAACCAGCCCTGACA	ATCTTTGAGGTAAACTTAATCCTGC
<i>FATP2</i>	AAAGTAGACGGAGTGTCCGGC	TTGGAAGACCTGTGGTTCCC
<i>iNOS</i>	GACCCTAAGAGTCACCAAAATGG	ATGCAGCTTGCCAGGGATT
<i>PPiA</i>	TCCTGGCATCTTGTCCAT	TGCTGGTCTTGCCATTCT
<i>Actine</i>	GGCACCACACCTTCTACAATGAGC	CGACCAGAGGCATACAGGGACAG
<i>T-bet</i>	GCCAGGGAACCGCTTATATG	GACGATCATCTGGGTCACATTGT
<i>GATA3</i>	TCGGCCATTTCGTACATGGAA	GTCGGAGGATACCTCTGCA
<i>Foxp3</i>	CCTATGGCTCCTTCCTTGGC	ATGAAGTGTGGTCTGTCCTGG
<i>Bcl6</i>	AAAGGCCGGACACCAGTTTT	TCACGGGGAGGTTTAAGTGC

## 7. Cytométrie en flux

Analyse du paysage immunitaire tumoral *in vivo* : seize ou vingt-trois jours après l'injection des cellules tumorales, les tumeurs ont été récupérées dans du milieu RPMI (Dominique Dutscher) et découpées en petits morceaux dans la solution de dissociation (RPMI, 2% SVF (Dominique Dutscher), 40 M HEPES (Gibco), 1 mg / mL collagénase (Sigma) et 0,1 mg / mL DNase (Sigma)). Après incubation à 37°C sous agitation pendant 1 h, les cellules ont été récupérées après filtration sur un filtre 70 µm (Dutscher) et centrifugées 7 min à 450 g. Les culots ont ensuite été repris dans 2 mL de solution hémolytique (0,83% NH<sub>4</sub>Cl, 0,1% KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM EDTA) avant de procéder au marquage avec les anticorps listés dans le tableau suivant et analyse par cytométrie en flux. Les différentes stratégies de gating sont présentées en annexe.

MDSCs / CD8+ Staining		
Antibodies	References	Dilution
CD45-APC/Cy7	Biolegend	1:200
CD11b-APC	Biolegend	1:70
PD-L1-PE/ IgG2b-PE	Biolegend	1:70
Gr1-PE/Cy7	Biolegend	1:70
CD8- PerCP/Cy5.5	Biolegend	1:70
PD-1-APC/ IgG2b-APC	eBiosciences	1:70
Viability-FVS700	BD Pharmingen™	1:1000
CD4+ subtypes Staining		
CD45-VioGreen	Miltenyi	1:100
CD4-FITC	BD Pharmingen™	1:100
CXCR5-BV421	Biolegend	1:100
CD25-BV605	Biolegend	1:100
ST2 (IL-33R)-PE	Mdbioproducts	1:100
CD127-PerCP/Cy5.5	Biolegend	1:100
CCR6-PE-Vio770	Miltenyi	1:10
CXCR3-APC	Miltenyi	1:100
PD-1-APC/Cy7	Biolegend	1:10000
Viability-FVS700	BD Pharmingen™	1:1000

Analyses *In-vitro* et *ex-vivo* : vingt-quatre ou quarante-huit heures après traitement *in vitro*, les cellules ont été récupérées et centrifugées, puis les culots ont été repris dans 1 ml de PBS 1X (Phosphate Buffered Saline, Dominique Dutcher) pour les analyses suivantes :

- Marquage Annexin V - 7AAD : afin d'étudier la mort cellulaire en réponse aux traitements, les culots ont été repris dans 200 µL de mélange d'anticorps Annexin V FITC - 7AAD (BD Biosciences) dilué au 1/50 dans du tampon de liaison (TBB 1X, BD Biosciences), et incubés pendant 15 min à température ambiante avant analyse par cytométrie en flux.
- Marquage membranaire de FATP2 : les culots ont été repris dans 50 µL de flow cytometry staining buffer (FCSB, eBioscience) pendant 10 min. Un mix d'anticorps contenant un marqueur de viabilité, le Fixable Viability Stain 700 (FVS700, BD Bioscience, 1:10 000), et l'anticorps primaire FATP2 (Abcam, 1/50) a été rajouté et les cellules incubées à 4 ° C à l'obscurité pendant 30 min. Après lavage avec du PBS 1X, les culots ont été repris dans 0,25% de PFA (paraformaldehyde, Electron Microscopy Science) pendant 5 min, et marqués avec l'anticorps secondaire Donkey anti-lapin IgG H&L (Alexa Fluor 488, Abcam, 1/500) pendant 30 min à 4 ° C à l'obscurité. Les cellules ont ensuite été lavées, centrifugées et les culots repris dans 200 µL de PBS 1X avant analyse par cytométrie en flux.
- Marquage PD-1 et PD-L1 : les culots ont été repris dans 50 µL de FCSB pendant 10 minutes. Le marquage avec FVS700 et PD-L1 / IgG2b -PE (Biolegend) ou PD-1 / IgG2b -APC (eBioscience) a été réalisé pendant 30 min à 4 ° C à l'obscurité. Les cellules ont ensuite été lavées, centrifugées et les culots repris dans 200 µL de PBS 1X.

Toutes les acquisitions ont été effectuées avec le cytomètre BD Canto équipé du logiciel BD FACSDiva (BD biosciences), et les données analysées avec le logiciel FlowJo.

## 8. Immunohistofluorescence

Les tumeurs prélevées à partir des souris Balb / C porteuses de tumeurs 4T1 et traitées ou non avec doxorubicine +/- GTN, à J16 et J23, ont été découpées en tranches de 4 µm d'épaisseur après fixation au formol et enrobage en paraffine. Le démasquage antigénique a été réalisée en chauffant les lames pendant 50 minutes à 95 ° C dans une solution à base de citrate (pH 6, Agilent), suivi de 20 minutes de refroidissement des lames à température ambiante et 5 minutes de réhydratation avec du PBS 1X 1% d'albumine sérique bovine (BSA). Après 30 min de saturation des sites non spécifiques (5% de sérum de chèvre), un marquage avec les anticorps

primaires, anti-CD4 (abcam, 1: 100) ou un anti-CD8 (abcam, 1: 100) de lapin, a été réalisé pendant 1 h à température ambiante. Une incubation de 30 min à température ambiante avec l'anticorps secondaire chèvre anti-lapin Alexa Fluor 647 (Invitrogen) a été effectuée après lavage des lames avec du PBS 1X. Trois lavages avec du PBS 0,04% de tween ont ensuite été effectués. Enfin, les noyaux ont été colorés avec une solution de DAPI (Spectral DAPI, PerkinElmer) et les lames montées avec du Prolong Diamond Antifade (Thermo Fisher) avant d'effectuer l'imagerie et l'analyse. Pour chaque coupe, cinq à dix zones représentatives ont été imagées à l'aide d'un poste de travail de pathologie quantitative Mantra (PerkinElmer, CGFL (Centre Georges François Leclerc) - Dijon). Le phénotypage des cellules CD8+ ou CD4+ a été réalisé en utilisant le logiciel d'analyse cellulaire inForm (PerkinElmer). Une moyenne de ces zones imagées par lame a été calculée, et une image représentative a été choisie pour chaque groupe de tumeurs.

#### 9. Séquençage de l'ARN

Les ARNs extraits à partir de tumeurs 4T1 de souris Balb / C traités ou non avec doxorubicine +/- GTN, ont été envoyés à une plateforme de génomique au Qatar (Weill Cornell Medicine-Doha), pour être séquencés en utilisant la machine HiSeq400 d'Illumina. Les résultats extraits des données RNAseq ont été analysés par la plateforme de transfert en biologie cancérologique (PTBC) au Centre Georges François Leclerc (CGFL-Dijon).

#### 10. Biotin switch assay

Les cellules récupérées à partir des flasques de culture T175, ont d'abord été lysées dans 1 ml de solution de lyse (50 mM Tris HCL pH 7,4, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1 mM néocuproïne, 1% triton, inhibiteurs de protéase (1X)) pendant 30 minutes à 4°C, puis centrifugées pendant 15 min à 10 000 g et à 4°C. Cinq mg de protéines / 10 ml de tampon de lyse ont été dilués dans 40 ml de tampon de blocage (9 volumes de HEN (250 mM HEPES PH 7,7, 1 mM EDTA, 0,1 mM néocuproïne), 1 volume de SDS, 1/100 DMF dilué MMTS). Les échantillons ont été incubés à 50 °C à l'obscurité pendant 20 minutes. Deux volumes d'acétone froide ont été ajoutés à chaque échantillon, les protéines ont été donc précipitées pendant 15 min à -20 °C et collectées après centrifugation à 2 000 g pendant 5 min. Les culots de protéines ont ensuite été lavés à l'acétone, et remis en suspension dans du tampon HENS (HEN + 1% SDS) supplémenté de 1 mM de EZ link HPDP-biotine (Thermo fischer) et 10 mM d'acide ascorbique. Après 1 h d'incubation sur la roue

à température ambiante, les protéines ont été précipitées avec 2 volumes d'acétone froid à -20 °C pendant 15 min, et collectés après centrifugation de 5 min à 2 000 g. Un lavage avec de l'acétone a été réalisé avant de reprendre les culots dans 1 ml de HENS et 2 ml de tampon de neutralisation (20 mM HEPES pH 7,7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Triton). Après une centrifugation de 1 min à 15 000 g, les surnageants ont été récupérés et les billes NeutrAvidin™ Plus UltraLink™ Resin (ThermoFischer) préalablement lavées et reprises dans du tampon de neutralisation ont été ajoutées. Une incubation d'1h à température ambiante sur la roue a été donc effectuée avant de récupérer les billes après centrifugation de 600 g – 2 min suivie de 4 lavages avec un tampon de lavage (20 mM HEPES pH 7,7, 600 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Triton), et 1 lavage avec un tampon d'équilibration (20 mM HEPES pH 7,7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA). Les billes ont été reprises et mélangées dans un tampon de charge Laemmli 2X et incubées 10 min à 95°C. Les surnageants ont été collectés pour être analysés pour la S-nitrosylation de STAT5 par SDS-PAGE à 10% et Western blot.

#### 11. Western blot

L'extraction des protéines a été réalisée avec du tampon RIPA (15 mM NaCl, 50 mM Tris HCL PH7.4, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1% Triton, 0,1% SDS, 0,1% de désoxycholate de sodium) supplémenté d'inhibiteurs de protéases (Roche) et de phosphatases (Sigma) pendant 30 min sur la glace. Une sonication 2 x 2s (amplitude 30%) a été effectuée avant de centrifuger les tubes à 16 000 g pendant 15 minutes à 4 °C. La concentration des protéines a été déterminée en utilisant le BioRad Dc protein assay comme recommandé par le fabricant (Bio-Rad). Un tampon de charge Laemmli 5X a ensuite été rajouté, et les échantillons incubés 10 minutes à 95 °C. Cinquante µg de protéines ont été déposés dans un gel d'acrylamide/bisacrylamide 10 % avant d'être transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été alors saturées 45 min à température ambiante par une solution de TBS 1X / 0,1% Tween / 5% lait ou BSA, puis incubées toute une nuit à 4°C sous agitation avec les anticorps primaires dilués au 1/1000<sup>ème</sup> dans du TBS 0,1% tween 5% lait ou BSA : anti-FATP2 ou PGE2 (Abcam), anti-STAT5 ou P-STAT5 (cell signaling) et anti-HSC70 (Santa Cruz). Les membranes ont été lavées avec du TBS 1X 0,1% tween, et incubées pendant 1 h à température ambiante avec les anticorps secondaires conjugués à de la peroxydase (Jackson Immunoresearch Laboratories), dilués au 1/5000 dans du TBS 0,1% tween. Les protéines ont été révélées en utilisant le kit Clarity Western ECL Substrate (BioRad), et en utilisant le système d'imagerie ChemiDoc (BioRad).

## 12. Analyses statistiques

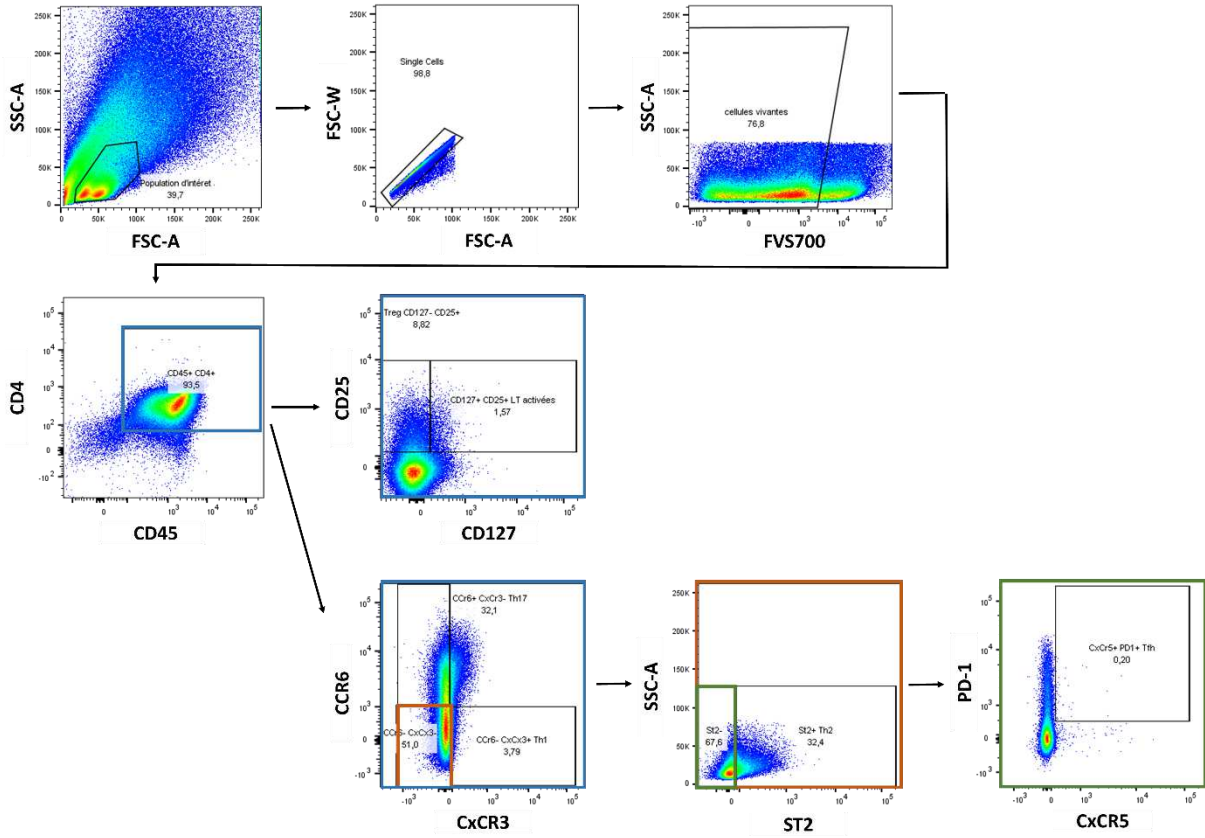
Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM, et l'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test t de Student apparié (*in-vitro* et *ex-vivo*) non apparié (*in-vivo*) avec une signification déterminée à  $p \leq 0,05$ . La croissance tumorale a été évaluée à l'aide du test two-way Anova avec correction de Bonferroni pour des comparaisons multiples. GraphPad Prism 7 a été utilisé pour effectuer tous les calculs statistiques. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives à \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$  et \*\*\*,  $p \leq 0,001$ .

# Annexes

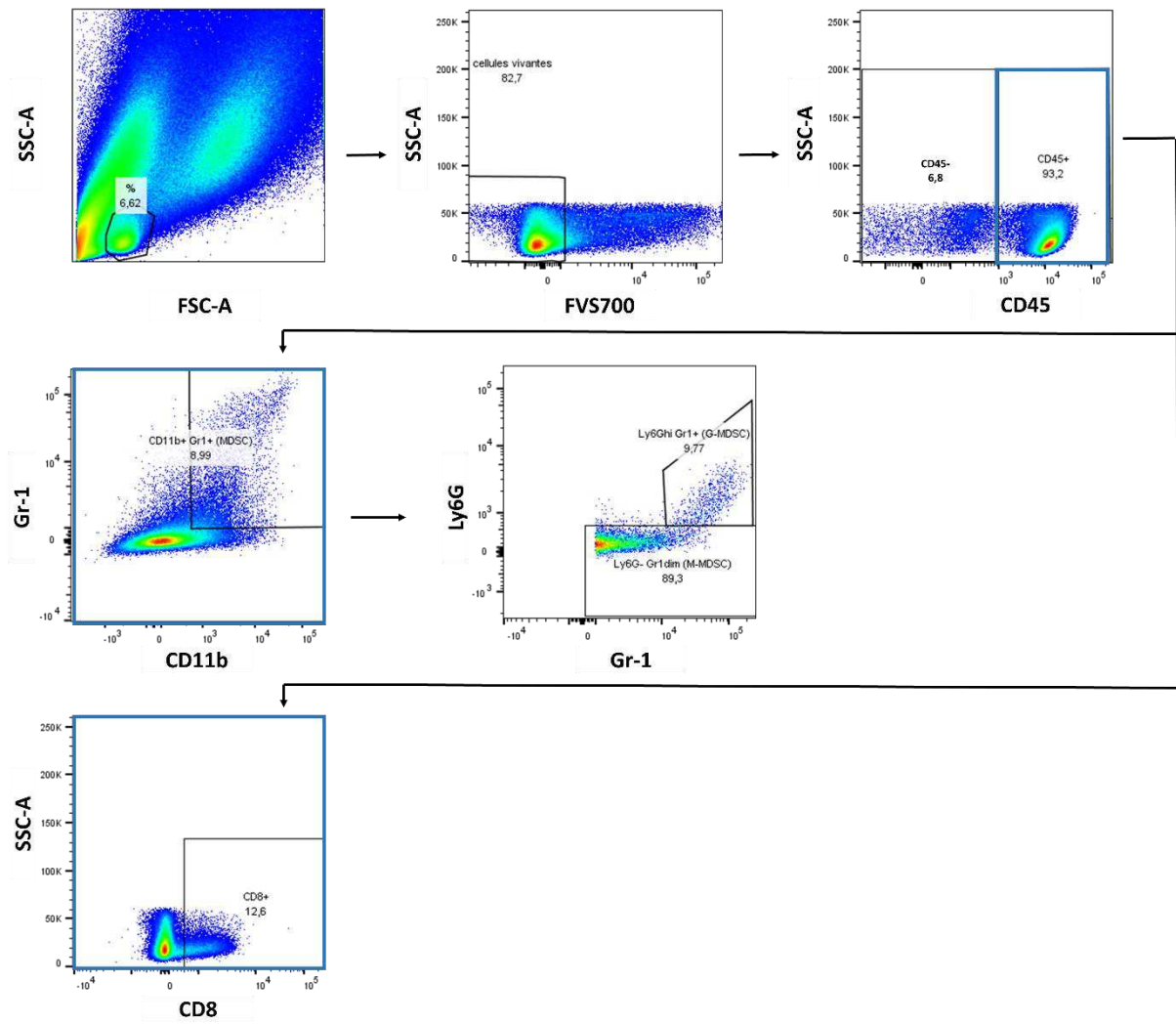


VI. Annexes

**Stratégie de gating des sous-population CD4+**



## Stratégie de gating des cellules TCD8+ et des sous-population de MDSCs



# Références bibliographiques

## VII. Références bibliographiques

- Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324-1337. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210220>
- Adams, S., Diamond, J. R., Hamilton, E., Pohlmann, P. R., Tolaney, S. M., Chang, C. W., Zhang, W., Iizuka, K., Foster, P. G., Molinero, L., Funke, R., & Powderly, J. (2019). Atezolizumab Plus nab-Paclitaxel in the Treatment of Metastatic Triple-Negative Breast Cancer With 2-Year Survival Follow-up: A Phase 1b Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 5(3), 334-342. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.5152>
- Adams, S., Loi, S., Toppmeyer, D., Cescon, D. W., De Laurentiis, M., Nanda, R., Winer, E. P., Mukai, H., Tamura, K., Armstrong, A., Liu, M. C., Iwata, H., Ryvo, L., Wimberger, P., Rugo, H. S., Tan, A. R., Jia, L., Ding, Y., Karantza, V., & Schmid, P. (2019). Pembrolizumab monotherapy for previously untreated, PD-L1-positive, metastatic triple-negative breast cancer: cohort B of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol*, 30(3), 405-411. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy518>
- Adams, S., Schmid, P., Rugo, H. S., Winer, E. P., Loirat, D., Awada, A., Cescon, D. W., Iwata, H., Campone, M., Nanda, R., Hui, R., Curigliano, G., Toppmeyer, D., O'Shaughnessy, J., Loi, S., Paluch-Shimon, S., Tan, A. R., Card, D., Zhao, J., Karantza, V., & Cortés, J. (2019). Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol*, 30(3), 397-404. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy517>
- Adélaïde, J., Finetti, P., Bekhouche, I., Repellini, L., Geneix, J., Sircoulomb, F., Charafe-Jauffret, E., Cervera, N., Desplans, J., Parzy, D., Schoenmakers, E., Viens, P., Jacquemier, J., Birnbaum, D., Bertucci, F., & Chaffanet, M. (2007). Integrated profiling of basal and luminal breast cancers. *Cancer Res*, 67(24), 11565-11575. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2536>
- Al-Khami, A. A., Zheng, L., Del Valle, L., Hossain, F., Wyczechowska, D., Zabaleta, J., Sanchez, M. D., Dean, M. J., Rodriguez, P. C., & Ochoa, A. C. (2017). Exogenous lipid uptake induces metabolic and functional reprogramming of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology*, 6(10), e1344804. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1344804>
- Albeituni, S. H., Ding, C., & Yan, J. (2013). Hampering immune suppressors: therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer J*, 19(6), 490-501. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000006>
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357(Pt 3), 593-615. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570593>
- Ali, H. R., Provenzano, E., Dawson, S. J., Blows, F. M., Liu, B., Shah, M., Earl, H. M., Poole, C. J., Hiller, L., Dunn, J. A., Bowden, S. J., Twelves, C., Bartlett, J. M., Mahmoud, S. M., Rakha, E., Ellis, I. O., Liu, S., Gao, D., Nielsen, T. O., Pharoah, P. D., & Caldas, C. (2014). Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol*, 25(8), 1536-1543. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu191>
- Alimoradi, H., Greish, K., Barzegar-Fallah, A., Alshaibani, L., & Pittalà, V. (2018). Nitric oxide-releasing nanoparticles improve doxorubicin anticancer activity. *Int J Nanomedicine*, 13, 7771-7787. <https://doi.org/10.2147/IJN.S187089>
- Alizadeh, D., Trad, M., Hanke, N. T., Larmonier, C. B., Janikashvili, N., Bonnotte, B., Katsanis, E., & Larmonier, N. (2014). Doxorubicin eliminates myeloid-derived suppressor cells and enhances the efficacy of adoptive T-cell transfer in breast cancer. *Cancer Res*, 74(1), 104-118. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1545>
- Allard, B., Beavis, P. A., Darcy, P. K., & Stagg, J. (2016). Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. *Curr Opin Pharmacol*, 29, 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.04.001>
- Allard, D., Turcotte, M., & Stagg, J. (2017). Targeting A2 adenosine receptors in cancer. *Immunol Cell Biol*, 95(4), 333-339. <https://doi.org/10.1038/icb.2017.8>
- Alvaro, T., Lejeune, M., Salvadó, M. T., Bosch, R., García, J. F., Jaén, J., Banham, A. H., Roncador, G., Montalbán, C., & Piris, M. A. (2005). Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from

- the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res*, 11(4), 1467-1473. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1869>
- Ambbs, S., Merriam, W. G., Bennett, W. P., Felley-Bosco, E., Ogunfusika, M. O., Oser, S. M., Klein, S., Shields, P. G., Billiar, T. R., & Harris, C. C. (1998). Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res*, 58(2), 334-341.
- Anani, W., & Shurin, M. R. (2017). Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer. *Adv Exp Med Biol*, 1036, 105-128. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-67577-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-67577-0_8)
- Andrews, L. P., Marciscano, A. E., Drake, C. G., & Vignali, D. A. (2017). LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev*, 276(1), 80-96. <https://doi.org/10.1111/imr.12519>
- Anestakis, D., Petanidis, S., Kalyvas, S., Nday, C. M., Tsave, O., Kioseoglou, E., & Salifoglou, A. (2015). Mechanisms and applications of interleukins in cancer immunotherapy. *Int J Mol Sci*, 16(1), 1691-1710. <https://doi.org/10.3390/ijms16011691>
- Antonioni, L., Blandizzi, C., Pacher, P., & Haskó, G. (2013). Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer*, 13(12), 842-857. <https://doi.org/10.1038/nrc3613>
- Ariel, A., Yavin, E. J., Hershkoviz, R., Avron, A., Franitza, S., Hardan, I., Cahalon, L., Fridkin, M., & Lider, O. (1998). IL-2 induces T cell adherence to extracellular matrix: inhibition of adherence and migration by IL-2 peptides generated by leukocyte elastase. *J Immunol*, 161(5), 2465-2472.
- Arrieta, O., Blake, M., de la Mata-Moya, M. D., Corona, F., Turcott, J., Orta, D., Alexander-Alatorre, J., & Gallardo-Rincón, D. (2014). Phase II study. Concurrent chemotherapy and radiotherapy with nitroglycerin in locally advanced non-small cell lung cancer. *Radiother Oncol*, 111(2), 311-315. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.01.021>
- Asano, Y., Kashiwagi, S., Goto, W., Kurata, K., Noda, S., Takashima, T., Onoda, N., Tanaka, S., Ohsawa, M., & Hirakawa, K. (2016). Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer. *Br J Surg*, 103(7), 845-854. <https://doi.org/10.1002/bjs.10127>
- Asano, Y., Kashiwagi, S., Goto, W., Takada, K., Takahashi, K., Hatano, T., Noda, S., Takashima, T., Onoda, N., Tomita, S., Motomura, H., Ohsawa, M., Hirakawa, K., & Ohira, M. (2017). Prediction of survival after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer by evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes and residual cancer burden. *BMC Cancer*, 17(1), 888. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3927-8>
- Aupérin, A., Le Péchoux, C., Rolland, E., Curran, W. J., Furuse, K., Fournel, P., Belderbos, J., Clamon, G., Ulutin, H. C., Paulus, R., Yamanaka, T., Bozonnet, M. C., Uitterhoeve, A., Wang, X., Stewart, L., Arriagada, R., Burdett, S., & Pignon, J. P. (2010). Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 28(13), 2181-2190. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.2543>
- Avalle, L., Pensa, S., Regis, G., Novelli, F., & Poli, V. (2012). STAT1 and STAT3 in tumorigenesis: A matter of balance. *JAKSTAT*, 1(2), 65-72. <https://doi.org/10.4161/jkst.20045>
- Azad, N., Vallyathan, V., Wang, L., Tantishaiyakul, V., Stehlik, C., Leonard, S. S., & Rojanasakul, Y. (2006). S-nitrosylation of Bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation. A novel antiapoptotic mechanism that suppresses apoptosis. *J Biol Chem*, 281(45), 34124-34134. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602551200>
- Baeriswyl, V., & Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*, 19(5), 329-337. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.05.003>
- Ballas, Z. K. (2018). The 2018 Nobel Prize in Physiology or Medicine: An exemplar of bench to bedside in immunology. *J Allergy Clin Immunol*, 142(6), 1752-1753. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.10.021>
- Bank, U., & Ansorge, S. (2001). More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control. *J Leukoc Biol*, 69(2), 197-206.
- Bank, U., Küpper, B., Reinhold, D., Hoffmann, T., & Ansorge, S. (1999). Evidence for a crucial role of neutrophil-derived serine proteases in the inactivation of interleukin-6 at sites of inflammation. *FEBS Lett*, 461(3), 235-240. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01466-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01466-0)

- Bank, U., Reinhold, D., Schneemilch, C., Kunz, D., Synowitz, H. J., & Ansorge, S. (1999). Selective proteolytic cleavage of IL-2 receptor and IL-6 receptor ligand binding chains by neutrophil-derived serine proteases at foci of inflammation. *J Interferon Cytokine Res*, *19*(11), 1277-1287. <https://doi.org/10.1089/107999099312957>
- Barsheshet, Y., Wildbaum, G., Levy, E., Vitenshtein, A., Akinseye, C., Griggs, J., Lira, S. A., & Karin, N. (2017). CCR8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(23), 6086-6091. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621280114>
- Basudhar, D., Somasundaram, V., de Oliveira, G. A., Kesarwala, A., Heinecke, J. L., Cheng, R. Y., Glynn, S. A., Ambs, S., Wink, D. A., & Ridnour, L. A. (2017). Nitric Oxide Synthase-2-Derived Nitric Oxide Drives Multiple Pathways of Breast Cancer Progression. *Antioxid Redox Signal*, *26*(18), 1044-1058. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6813>
- Bates, G. J., Fox, S. B., Han, C., Leek, R. D., Garcia, J. F., Harris, A. L., & Banham, A. H. (2006). Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*, *24*(34), 5373-5380. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.05.9584>
- Bauer, R., Udonta, F., Wroblewski, M., Ben-Batalla, I., Santos, I. M., Taverna, F., Kuhlencord, M., Gensch, V., Päsler, S., Vinckier, S., Brandner, J. M., Pantel, K., Bokemeyer, C., Vogl, T., Roth, J., Carmeliet, P., & Loges, S. (2018). Blockade of Myeloid-Derived Suppressor Cell Expansion with All-. *Cancer Res*, *78*(12), 3220-3232. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3415>
- Bedognetti, D., Maccalli, C., Bader, S. B., Marincola, F. M., & Seliger, B. (2016). Checkpoint Inhibitors and Their Application in Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*, *11*(2), 108-115. <https://doi.org/10.1159/000445335>
- Bellmunt, J., de Wit, R., Vaughn, D. J., Fradet, Y., Lee, J. L., Fong, L., Vogelzang, N. J., Climent, M. A., Petrylak, D. P., Choueiri, T. K., Necchi, A., Gerritsen, W., Gurney, H., Quinn, D. I., Culine, S., Sternberg, C. N., Mai, Y., Poehlein, C. H., Perini, R. F., Bajorin, D. F., & Investigators, K.-. (2017). Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*, *376*(11), 1015-1026. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1613683>
- Benhar, M., & Stamler, J. S. (2005). A central role for S-nitrosylation in apoptosis. *Nat Cell Biol*, *7*(7), 645-646. <https://doi.org/10.1038/ncb0705-645>
- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F., & Heath, W. R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*, *393*(6684), 478-480. <https://doi.org/10.1038/30996>
- Bergenfelz, C., Gaber, A., Allaoui, R., Mehmeti, M., Jirström, K., Leanderson, T., & Leandersson, K. (2015). S100A9 expressed in ER(-)PgR(-) breast cancers induces inflammatory cytokines and is associated with an impaired overall survival. *Br J Cancer*, *113*(8), 1234-1243. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.346>
- Bergenfelz, C., Larsson, A. M., von Stedingk, K., Gruvberger-Saal, S., Aaltonen, K., Jansson, S., Jernström, H., Janols, H., Wullt, M., Bredberg, A., Rydén, L., & Leandersson, K. (2015). Systemic Monocytic-MDSCs Are Generated from Monocytes and Correlate with Disease Progression in Breast Cancer Patients. *PLoS One*, *10*(5), e0127028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127028>
- Bergin, A. R. T., & Loi, S. (2019). Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. *F1000Res*, *8*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18888.1>
- Berx, G., & van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *1*(6), a003129. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003129>
- Bettaieb, A, S, P., C, P., V, L., S, R., & JF, J. (2015). S-nitrosylation of cancer cells. In Nitric Oxide and Cancer. (pp. 97-109): Pathogenesis and Therapy.
- Blaise, G. A., Gauvin, D., Gangal, M., & Authier, S. (2005). Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology*, *208*(2), 177-192. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.11.032>

- Blattner, C., Fleming, V., Weber, R., Himmelhan, B., Altevogt, P., Gebhardt, C., Schulze, T. J., Razon, H., Hawila, E., Wildbaum, G., Utikal, J., Karin, N., & Umansky, V. (2018). CCR5. *Cancer Res*, *78*(1), 157-167. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0348>
- Borst, J., Ahrends, T., Bąbała, N., Melief, C. J. M., & Kastenmüller, W. (2018). CD4. *Nat Rev Immunol*, *18*(10), 635-647. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0044-0>
- Bos, R., & Sherman, L. A. (2010). CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res*, *70*(21), 8368-8377. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1322>
- Bourgeois, C., Rocha, B., & Tanchot, C. (2002). A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science*, *297*(5589), 2060-2063. <https://doi.org/10.1126/science.1072615>
- Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q., Hwu, W. J., Topalian, S. L., Hwu, P., Drake, C. G., Camacho, L. H., Kauh, J., Odunsi, K., Pitot, H. C., Hamid, O., Bhatia, S., Martins, R., Eaton, K., Chen, S., Salay, T. M., Alaparthi, S., Grosso, J. F., Korman, A. J., Parker, S. M., Agrawal, S., Goldberg, S. M., Pardoll, D. M., Gupta, A., & Wigginton, J. M. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*, *366*(26), 2455-2465. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200694>
- Bratasz, A., Selvendiran, K., Wasowicz, T., Bobko, A., Khramtsov, V. V., Ignarro, L. J., & Kuppusamy, P. (2008). NCX-4040, a nitric oxide-releasing aspirin, sensitizes drug-resistant human ovarian xenograft tumors to cisplatin by depletion of cellular thiols. *J Transl Med*, *6*, 9. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-6-9>
- Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., Ranta, F., Ullrich, S., Mocikat, R., Braungart, K., Mehra, T., Fehrenbacher, B., Berdel, J., Niessner, H., Meier, F., van den Broek, M., Häring, H. U., Handgretinger, R., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F., Pesic, M., Bauer, J., Zender, L., Schaller, M., Schulze-Osthoff, K., & Röcken, M. (2013). T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*, *494*(7437), 361-365. <https://doi.org/10.1038/nature11824>
- Bredt, D. S. (1999). Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res*, *31*(6), 577-596. <https://doi.org/10.1080/10715769900301161>
- Brimnes, M. K., Vangsted, A. J., Knudsen, L. M., Gimsing, P., Gang, A. O., Johnsen, H. E., & Svane, I. M. (2010). Increased level of both CD4+FOXP3+ regulatory T cells and CD14+HLA-DR<sup>-</sup>/low myeloid-derived suppressor cells and decreased level of dendritic cells in patients with multiple myeloma. *Scand J Immunol*, *72*(6), 540-547. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02463.x>
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S. H., Colombo, M. P., Frey, A. B., Greten, T. F., Mandruzzato, S., Murray, P. J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., Rodriguez, P. C., Sica, A., Umansky, V., Vonderheide, R. H., & Gabilovich, D. I. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun*, *7*, 12150. <https://doi.org/10.1038/ncomms12150>
- Brunet, J. F., Denizot, F., Luciani, M. F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M. G., & Golstein, P. (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature*, *328*(6127), 267-270. <https://doi.org/10.1038/328267a0>
- Bryan, T. M., & Cech, T. R. (1999). Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol*, *11*(3), 318-324. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)80043-X](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80043-X)
- Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., & Reddel, R. R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J*, *14*(17), 4240-4248.
- Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N. J., & Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, *434*(7035), 913-917. <https://doi.org/10.1038/nature03443>
- Bunt, S. K., Mohr, A. M., Bailey, J. M., Grandgenett, P. M., & Hollingsworth, M. A. (2013). Rosiglitazone and Gemcitabine in combination reduces immune suppression and modulates T cell

- populations in pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 62(2), 225-236. <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1324-3>
- Bunt, S. K., Sinha, P., Clements, V. K., Leips, J., & Ostrand-Rosenberg, S. (2006). Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J Immunol*, 176(1), 284-290. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.1.284>
- Burchill, M. A., Goetz, C. A., Prlc, M., O'Neil, J. J., Harmon, I. R., Bensinger, S. J., Turka, L. A., Brennan, P., Jameson, S. C., & Farrar, M. A. (2003). Distinct effects of STAT5 activation on CD4+ and CD8+ T cell homeostasis: development of CD4+CD25+ regulatory T cells versus CD8+ memory T cells. *J Immunol*, 171(11), 5853-5864. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.5853>
- Burkhardt, D. L., & Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*, 8(9), 671-682. <https://doi.org/10.1038/nrc2399>
- Burstein, H. J., Elias, A. D., Rugo, H. S., Cobleigh, M. A., Wolff, A. C., Eisenberg, P. D., Lehman, M., Adams, B. J., Bello, C. L., DePrimo, S. E., Baum, C. M., & Miller, K. D. (2008). Phase II study of sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane. *J Clin Oncol*, 26(11), 1810-1816. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.5375>
- Böhm, F., Edge, R., McGarvey, D. J., & Truscott, T. G. (1998). Beta-carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against NOx. *FEBS Lett*, 436(3), 387-389. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01173-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01173-9)
- Camisaschi, C., Casati, C., Rini, F., Perego, M., De Filippo, A., Triebel, F., Parmiani, G., Belli, F., Rivoltini, L., & Castelli, C. (2010). LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. *J Immunol*, 184(11), 6545-6551. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903879>
- Cao, X., Cai, S. F., Fehniger, T. A., Song, J., Collins, L. I., Piwnica-Worms, D. R., & Ley, T. J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*, 27(4), 635-646. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.014>
- Cao, Y., Slaney, C. Y., Bidwell, B. N., Parker, B. S., Johnstone, C. N., Rautela, J., Eckhardt, B. L., & Anderson, R. L. (2014). BMP4 inhibits breast cancer metastasis by blocking myeloid-derived suppressor cell activity. *Cancer Res*, 74(18), 5091-5102. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3171>
- Carbone, D. P., Reck, M., Paz-Ares, L., Creelan, B., Horn, L., Steins, M., Felip, E., van den Heuvel, M. M., Ciuleanu, T. E., Badin, F., Ready, N., Hiltermann, T. J. N., Nair, S., Juergens, R., Peters, S., Minenza, E., Wrangle, J. M., Rodriguez-Abreu, D., Borghaei, H., Blumenschein, G. R., Villaruz, L. C., Havel, L., Krejci, J., Corral Jaime, J., Chang, H., Geese, W. J., Bhagavatheeswaran, P., Chen, A. C., Socinski, M. A., & Investigators, C. (2017). First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 376(25), 2415-2426. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1613493>
- Carey, L. A., Rugo, H. S., Marcom, P. K., Mayer, E. L., Esteva, F. J., Ma, C. X., Liu, M. C., Storniolo, A. M., Rimawi, M. F., Forero-Torres, A., Wolff, A. C., Hobday, T. J., Ivanova, A., Chiu, W. K., Ferraro, M., Burrows, E., Bernard, P. S., Hoadley, K. A., Perou, C. M., & Winer, E. P. (2012). TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 30(21), 2615-2623. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.5579>
- Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4(2), 118-132. <https://doi.org/10.1038/nrc1276>
- Chalmin, F., Bruchard, M., Vegran, F., & Ghiringhelli, F. (2018). Regulation of T cell antitumor immune response by tumor induced metabolic stress. *Cell Stress*, 3(1), 9-18. <https://doi.org/10.15698/cst2019.01.171>
- Chang, A. L., Miska, J., Wainwright, D. A., Dey, M., Rivetta, C. V., Yu, D., Kanojia, D., Pituch, K. C., Qiao, J., Pytel, P., Han, Y., Wu, M., Zhang, L., Horbinski, C. M., Ahmed, A. U., & Lesniak, M. S. (2016). CCL2 Produced by the Glioma Microenvironment Is Essential for the Recruitment of Regulatory



- T Cells and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res*, 76(19), 5671-5682. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0144>
- Chatterjee, S., Chatterjee, A., Jana, S., Dey, S., Roy, H., Das, M. K., Alam, J., Adhikary, A., Chowdhury, A., Biswas, A., Manna, D., & Bhattacharyya, A. (2020). Transforming growth factor beta orchestrates PD-L1 enrichment in tumor derived exosomes and mediates CD8 T cell dysfunction regulating early phosphorylation of TCR signalome in breast cancer. *Carcinogenesis*. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa092>
- Chen, I. X., Chauhan, V. P., Posada, J., Ng, M. R., Wu, M. W., Adstamongkonkul, P., Huang, P., Lindeman, N., Langer, R., & Jain, R. K. (2019). Blocking CXCR4 alleviates desmoplasia, increases T-lymphocyte infiltration, and improves immunotherapy in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(10), 4558-4566. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815515116>
- Cheng, H., Wang, L., Mollica, M., Re, A. T., Wu, S., & Zuo, L. (2014). Nitric oxide in cancer metastasis. *Cancer Lett*, 353(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.07.014>
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., & Moses, H. L. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res*, 6(10), 1521-1533. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2203>
- Cheng, P., Corzo, C. A., Luetkeke, N., Yu, B., Nagaraj, S., Bui, M. M., Ortiz, M., Nacken, W., Sorg, C., Vogl, T., Roth, J., & Gabrilovich, D. I. (2008). Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med*, 205(10), 2235-2249. <https://doi.org/10.1084/jem.20080132>
- Chun, E., Lavoie, S., Michaud, M., Gallini, C. A., Kim, J., Soucy, G., Odze, R., Glickman, J. N., & Garrett, W. S. (2015). CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population and Function. *Cell Rep*, 12(2), 244-257. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.024>
- Clements, V. K., Long, T., Long, R., Figley, C., Smith, D. M. C., & Ostrand-Rosenberg, S. (2018). Frontline Science: High fat diet and leptin promote tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol*, 103(3), 395-407. <https://doi.org/10.1002/JLB.4HI0517-210R>
- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S., & Vignali, D. A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450(7169), 566-569. <https://doi.org/10.1038/nature06306>
- Condamine, T., Dominguez, G. A., Youn, J. I., Kossenkov, A. V., Mony, S., Alicea-Torres, K., Tcyganov, E., Hashimoto, A., Nefedova, Y., Lin, C., Partlova, S., Garfall, A., Vogl, D. T., Xu, X., Knight, S. C., Malietzis, G., Lee, G. H., Eruslanov, E., Albelda, S. M., Wang, X., Mehta, J. L., Bewtra, M., Rustgi, A., Hockstein, N., Witt, R., Masters, G., Nam, B., Smirnov, D., Sepulveda, M. A., & Gabrilovich, D. I. (2016). Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol*, 1(2). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaf8943>
- Correa, C., McGale, P., Taylor, C., Wang, Y., Clarke, M., Davies, C., Peto, R., Bijker, N., Solin, L., Darby, S., & (EBCTCG), E. B. C. T. C. G. (2010). Overview of the randomized trials of radiotherapy in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2010(41), 162-177. <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgq039>
- Cortier, M., Boina-Ali, R., Racœur, C., Paul, C., Solary, E., Jeannin, J. F., & Bettaieb, A. (2015). H89 enhances the sensitivity of cancer cells to glyceryl trinitrate through a purinergic receptor-dependent pathway. *Oncotarget*, 6(9), 6877-6886. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3124>
- Cortés, J., Holgado, E., & Perez-Garcia, J. (2018). CXCR4 antagonists for treatment of breast cancer. *Oncotarget*, 9(71), 33442-33443. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26090>
- Corzo, C. A., Cotter, M. J., Cheng, P., Cheng, F., Kusmartsev, S., Sotomayor, E., Padhya, T., McCaffrey, T. V., McCaffrey, J. C., & Gabrilovich, D. I. (2009). Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*, 182(9), 5693-5701. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900092>

- Cosmi, L., Maggi, L., Santarlasci, V., Liotta, F., & Annunziato, F. (2014). T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A*, 85(1), 36-42. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22348>
- Crabtree, T. D., Denlinger, C. E., Meyers, B. F., El Naqa, I., Zoole, J., Krupnick, A. S., Kreisel, D., Patterson, G. A., & Bradley, J. D. (2010). Stereotactic body radiation therapy versus surgical resection for stage I non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 140(2), 377-386. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2009.12.054>
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*, 29, 621-663. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101400>
- Cutuli, B., Bernier, J., & Poortmans, P. (2014). Radiotherapy in DCIS, an underestimated benefit? *Radiother Oncol*, 112(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.06.011>
- Danilin, S., Merkel, A. R., Johnson, J. R., Johnson, R. W., Edwards, J. R., & Sterling, J. A. (2012). Myeloid-derived suppressor cells expand during breast cancer progression and promote tumor-induced bone destruction. *Oncoimmunology*, 1(9), 1484-1494. <https://doi.org/10.4161/onci.21990>
- David, J. M., Dominguez, C., McCampbell, K. K., Gulley, J. L., Schlom, J., & Palena, C. (2017). A novel bifunctional anti-PD-L1/TGF- $\beta$  Trap fusion protein (M7824) efficiently reverts mesenchymalization of human lung cancer cells. *Oncoimmunology*, 6(10), e1349589. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1349589>
- Davies, M. A., & Samuels, Y. (2010). Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*, 29(41), 5545-5555. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.323>
- De Santo, C., Serafini, P., Marigo, I., Dolcetti, L., Bolla, M., Del Soldato, P., Melani, C., Guiducci, C., Colombo, M. P., Iezzi, M., Musiani, P., Zanovello, P., & Bronte, V. (2005). Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(11), 4185-4190. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409783102>
- Demaria, S., Kawashima, N., Yang, A. M., Devitt, M. L., Babb, J. S., Allison, J. P., & Formenti, S. C. (2005). Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer. *Clin Cancer Res*, 11(2 Pt 1), 728-734.
- den Brok, M. H., Raaijmakers, T. K., Collado-Camps, E., & Adema, G. J. (2018). Lipid Droplets as Immune Modulators in Myeloid Cells. *Trends Immunol*, 39(5), 380-392. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.01.012>
- DeNardo, D. G., Barreto, J. B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N., & Coussens, L. M. (2009). CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*, 16(2), 91-102. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.018>
- Deshpande, A., Sicinski, P., & Hinds, P. W. (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene*, 24(17), 2909-2915. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208618>
- Diaz-Montero, C. M., Salem, M. L., Nishimura, M. I., Garrett-Mayer, E., Cole, D. J., & Montero, A. J. (2009). Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 58(1), 49-59. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0523-4>
- Dilek, N., Vuillefroy de Sillery, R., Blanco, G., & Vanhove, B. (2012). Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. *Front Immunol*, 3, 208. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00208>
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M., & Zeiher, A. M. (1997). Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med*, 185(4), 601-607. <https://doi.org/10.1084/jem.185.4.601>
- Doane, A. S., Danso, M., Lal, P., Donaton, M., Zhang, L., Hudis, C., & Gerald, W. L. (2006). An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene*, 25(28), 3994-4008. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209415>
- Dolcetti, L., Peranzoni, E., Ugel, S., Marigo, I., Fernandez Gomez, A., Mesa, C., Geilich, M., Winkels, G., Traggiati, E., Casati, A., Grassi, F., & Bronte, V. (2010). Hierarchy of immunosuppressive strength

- among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur J Immunol*, 40(1), 22-35. <https://doi.org/10.1002/eji.200939903>
- Donkor, M. K., Lahue, E., Hoke, T. A., Shafer, L. R., Coskun, U., Solheim, J. C., Gulen, D., Bishay, J., & Talmadge, J. E. (2009). Mammary tumor heterogeneity in the expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Int Immunopharmacol*, 9(7-8), 937-948. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2009.03.021>
- Duechler, M., Peczek, L., Zuk, K., Zalesna, I., Jeziorski, A., & Czyz, M. (2014). The heterogeneous immune microenvironment in breast cancer is affected by hypoxia-related genes. *Immunobiology*, 219(2), 158-165. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.09.003>
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3(11), 991-998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137-148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>
- Dushyanthen, S., Beavis, P. A., Savas, P., Teo, Z. L., Zhou, C., Mansour, M., Darcy, P. K., & Loi, S. (2015). Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *BMC Med*, 13, 202. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0431-3>
- Egelston, C. A., Avalos, C., Tu, T. Y., Simons, D. L., Jimenez, G., Jung, J. Y., Melstrom, L., Margolin, K., Yim, J. H., Kruper, L., Mortimer, J., & Lee, P. P. (2018). Human breast tumor-infiltrating CD8. *Nat Commun*, 9(1), 4297. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06653-9>
- Ekmekcioglu, S., Ellerhorst, J., Smid, C. M., Prieto, V. G., Munsell, M., Buzaid, A. C., & Grimm, E. A. (2000). Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival. *Clin Cancer Res*, 6(12), 4768-4775.
- Eksteen, B., Miles, A., Curbishley, S. M., Tselepis, C., Grant, A. J., Walker, L. S., & Adams, D. H. (2006). Epithelial inflammation is associated with CCL28 production and the recruitment of regulatory T cells expressing CCR10. *J Immunol*, 177(1), 593-603. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.593>
- Ellis, H., & Ma, C. X. (2019). PI3K Inhibitors in Breast Cancer Therapy. *Curr Oncol Rep*, 21(12), 110. <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0846-7>
- Engblom, C., Pflirschke, C., Zilionis, R., Da Silva Martins, J., Bos, S. A., Courties, G., Rickelt, S., Severe, N., Baryawno, N., Faget, J., Savova, V., Zemmour, D., Kline, J., Siwicki, M., Garris, C., Pucci, F., Liao, H. W., Lin, Y. J., Newton, A., Yaghi, O. K., Iwamoto, Y., Tricot, B., Wojtkiewicz, G. R., Nahrendorf, M., Cortez-Retamozo, V., Meylan, E., Hynes, R. O., Demay, M., Klein, A., Bredella, M. A., Scadden, D. T., Weissleder, R., & Pittet, M. J. (2017). Osteoblasts remotely supply lung tumors with cancer-promoting SiglecF. *Science*, 358(6367). <https://doi.org/10.1126/science.aal5081>
- Eriksson, E., Wenthe, J., Irenaeus, S., Loskog, A., & Ullenhag, G. (2016). Gemcitabine reduces MDSCs, tregs and TGFβ-1 while restoring the teff/treg ratio in patients with pancreatic cancer. *J Transl Med*, 14(1), 282. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1037-z>
- Evers, B., Drost, R., Schut, E., de Bruin, M., van der Burg, E., Derksen, P. W., Holstege, H., Liu, X., van Drunen, E., Beverloo, H. B., Smith, G. C., Martin, N. M., Lau, A., O'Connor, M. J., & Jonkers, J. (2008). Selective inhibition of BRCA2-deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and cisplatin. *Clin Cancer Res*, 14(12), 3916-3925. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4953>
- Eyler, C. E., Wu, Q., Yan, K., MacSwords, J. M., Chandler-Militello, D., Misuraca, K. L., Lathia, J. D., Forrester, M. T., Lee, J., Stamler, J. S., Goldman, S. A., Bredel, M., McLendon, R. E., Sloan, A. E., Hjelmeland, A. B., & Rich, J. N. (2011). Glioma stem cell proliferation and tumor growth are promoted by nitric oxide synthase-2. *Cell*, 146(1), 53-66. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.006>
- Faget, J., Bendriss-Vermare, N., Gobert, M., Durand, I., Olive, D., Biota, C., Bachelot, T., Treilleux, I., Goddard-Leon, S., Lavergne, E., Chabaud, S., Blay, J. Y., Caux, C., & Ménétrier-Caux, C. (2012). ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by

- promoting the accumulation of immunosuppressive CD4+ T cells. *Cancer Res*, 72(23), 6130-6141. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2409>
- Farhood, B., Najafi, M., & Mortezaee, K. (2019). CD8. *J Cell Physiol*, 234(6), 8509-8521. <https://doi.org/10.1002/jcp.27782>
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N., Johnson, D. A., Richardson, T. B., Santarosa, M., Dillon, K. J., Hickson, I., Knights, C., Martin, N. M., Jackson, S. P., Smith, G. C., & Ashworth, A. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434(7035), 917-921. <https://doi.org/10.1038/nature03445>
- Farmer, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Larsimont, D., Macgrogan, G., Bergh, J., Cameron, D., Goldstein, D., Duss, S., Nicoulaz, A. L., Brisken, C., Fiche, M., Delorenzi, M., & Iggo, R. (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*, 24(29), 4660-4671. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208561>
- Fernando, V., Zheng, X., Walia, Y., Sharma, V., Letson, J., & Furuta, S. (2019). S-Nitrosylation: An Emerging Paradigm of Redox Signaling. *Antioxidants (Basel)*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/antiox8090404>
- Ferrara, N. (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29(6), 789-791. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179663>
- Fiorentino, F. P., Marchesi, I., & Giordano, A. (2013). On the role of retinoblastoma family proteins in the establishment and maintenance of the epigenetic landscape. *J Cell Physiol*, 228(2), 276-284. <https://doi.org/10.1002/jcp.24141>
- Fischer, A., Folkerts, G., Geppetti, P., & Groneberg, D. A. (2002). Mediators of asthma: nitric oxide. *Pulm Pharmacol Ther*, 15(2), 73-81. <https://doi.org/10.1006/pupt.2001.0332>
- Fleming, V., Hu, X., Weber, R., Nagibin, V., Groth, C., Altevogt, P., Utikal, J., & Umansky, V. (2018). Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Bypass Tumor-Induced Immunosuppression. *Front Immunol*, 9, 398. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00398>
- Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T., & Roth, J. (2007). S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol*, 81(1), 28-37. <https://doi.org/10.1189/jlb.0306170>
- Forghani, P., Khorramizadeh, M. R., & Waller, E. K. (2014). Silibinin inhibits accumulation of myeloid-derived suppressor cells and tumor growth of murine breast cancer. *Cancer Med*, 3(2), 215-224. <https://doi.org/10.1002/cam4.186>
- Frederiksen, L. J., Sullivan, R., Maxwell, L. R., Macdonald-Goodfellow, S. K., Adams, M. A., Bennett, B. M., Siemens, D. R., & Graham, C. H. (2007). Chemosensitization of cancer in vitro and in vivo by nitric oxide signaling. *Clin Cancer Res*, 13(7), 2199-2206. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1807>
- Frenel, J. S., Le Tourneau, C., O'Neil, B., Ott, P. A., Piha-Paul, S. A., Gomez-Roca, C., van Brummelen, E. M. J., Rugo, H. S., Thomas, S., Saraf, S., Rangwala, R., & Varga, A. (2017). Safety and Efficacy of Pembrolizumab in Advanced, Programmed Death Ligand 1-Positive Cervical Cancer: Results From the Phase Ib KEYNOTE-028 Trial. *J Clin Oncol*, 35(36), 4035-4041. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.5471>
- Friedman, E. J. (2002). Immune modulation by ionizing radiation and its implications for cancer immunotherapy. *Curr Pharm Des*, 8(19), 1765-1780. <https://doi.org/10.2174/1381612023394089>
- Fujita, M., Kohanbash, G., Fellows-Mayle, W., Hamilton, R. L., Komohara, Y., Decker, S. A., Ohlfest, J. R., & Okada, H. (2011). COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*, 71(7), 2664-2674. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3055>
- Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C. O., Buerk, D. G., Huang, P. L., & Jain, R. K. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(5), 2604-2609. <https://doi.org/10.1073/pnas.041359198>

- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373-376. <https://doi.org/10.1038/288373a0>
- Gabrilovich, D. I. (2017). Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res*, 5(1), 3-8. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0297>
- Gabrilovich, D. I., Bronte, V., Chen, S. H., Colombo, M. P., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., & Schreiber, H. (2007). The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*, 67(1), 425; author reply 426. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3037>
- Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 9(3), 162-174. <https://doi.org/10.1038/nri2506>
- Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., & Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*, 12(4), 253-268. <https://doi.org/10.1038/nri3175>
- Gao, W., Zhang, X., Yang, W., Dou, D., Zhang, H., Tang, Y., Zhong, W., Meng, J., Bai, Y., Liu, Y., Yang, L., Chen, S., Liu, H., Yang, C., & Sun, T. (2019). Prim-O-glucosylcimifugin enhances the antitumour effect of PD-1 inhibition by targeting myeloid-derived suppressor cells. *J Immunother Cancer*, 7(1), 231. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0676-z>
- Gao, X., Saha, D., Kapur, P., Anthony, T., Livingston, E. H., & Huerta, S. (2009). Radiosensitization of HT-29 cells and xenografts by the nitric oxide donor DETANONOate. *J Surg Oncol*, 100(2), 149-158. <https://doi.org/10.1002/jso.21318>
- Garaud, S., Buisseret, L., Solinas, C., Gu-Trantien, C., de Wind, A., Van den Eynden, G., Naveaux, C., Lodewyckx, J. N., Boisson, A., Duvillier, H., Craciun, L., Ameye, L., Veys, I., Paesmans, M., Larsimont, D., Piccart-Gebhart, M., & Willard-Gallo, K. (2019). Tumor infiltrating B-cells signal functional humoral immune responses in breast cancer. *JCI Insight*, 5. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.129641>
- Garon, E. B., Rizvi, N. A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A. S., Eder, J. P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., Carcereny, E., Ahn, M. J., Felip, E., Lee, J. S., Hellmann, M. D., Hamid, O., Goldman, J. W., Soria, J. C., Dolled-Filhart, M., Rutledge, R. Z., Zhang, J., Luceford, J. K., Rangwala, R., Lubiniecki, G. M., Roach, C., Emancipator, K., Gandhi, L., & Investigators, K.-. (2015). Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 372(21), 2018-2028. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1501824>
- Garrido, P., Shalaby, A., Walsh, E. M., Keane, N., Webber, M., Keane, M. M., Sullivan, F. J., Kerin, M. J., Callagy, G., Ryan, A. E., & Glynn, S. A. (2017). Impact of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression on triple negative breast cancer outcome and activation of EGFR and ERK signaling pathways. *Oncotarget*, 8(46), 80568-80588. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19631>
- Gebhardt, C., Németh, J., Angel, P., & Hess, J. (2006). S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol*, 72(11), 1622-1631. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.05.017>
- Geginat, J., Paroni, M., Maglie, S., Alfen, J. S., Kastirr, I., Gruarin, P., De Simone, M., Pagani, M., & Abrignani, S. (2014). Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front Immunol*, 5, 630. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00630>
- Gehad, A. E., Lichtman, M. K., Schmults, C. D., Teague, J. E., Calarese, A. W., Jiang, Y., Watanabe, R., & Clark, R. A. (2012). Nitric oxide-producing myeloid-derived suppressor cells inhibit vascular E-selectin expression in human squamous cell carcinomas. *J Invest Dermatol*, 132(11), 2642-2651. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.190>
- Gewirtz, D. A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*, 57(7), 727-741. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00307-4](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00307-4)
- Ghafourifar, P., & Cadenas, E. (2005). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci*, 26(4), 190-195. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.02.005>
- Ghebranious, N., & Donehower, L. A. (1998). Mouse models in tumor suppression. *Oncogene*, 17(25), 3385-3400. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202573>

- Ghione, S., Mabrouk, N., Paul, C., Bettaieb, A., & Plenchette, S. (2020). Protein kinase inhibitor-based cancer therapies: Considering the potential of nitric oxide (NO) to improve cancer treatment. *Biochem Pharmacol*, 113855. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113855>
- Glodde, N., Bald, T., van den Boorn-Konijnenberg, D., Nakamura, K., O'Donnell, J. S., Szczepanski, S., Brandes, M., Eickhoff, S., Das, I., Shridhar, N., Hinze, D., Rogava, M., van der Sluis, T. C., Ruotsalainen, J. J., Gaffal, E., Landsberg, J., Ludwig, K. U., Wilhelm, C., Riek-Burchardt, M., Müller, A. J., Gebhardt, C., Scolyer, R. A., Long, G. V., Janzen, V., Teng, M. W. L., Kastenmüller, W., Mazzone, M., Smyth, M. J., Tüting, T., & Hölzel, M. (2017). Reactive Neutrophil Responses Dependent on the Receptor Tyrosine Kinase c-MET Limit Cancer Immunotherapy. *Immunity*, 47(4), 789-802.e789. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.09.012>
- Glynn, S. A., Boersma, B. J., Dorsey, T. H., Yi, M., Yfantis, H. G., Ridnour, L. A., Martin, D. N., Switzer, C. H., Hudson, R. S., Wink, D. A., Lee, D. H., Stephens, R. M., & Ambs, S. (2010). Increased NOS2 predicts poor survival in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *J Clin Invest*, 120(11), 3843-3854. <https://doi.org/10.1172/JCI42059>
- Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A. C., Durand, I., Olive, D., Perez, S., Pasqual, N., Faure, C., Ray-Coquard, I., Puisieux, A., Caux, C., Blay, J. Y., & Ménétrier-Caux, C. (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res*, 69(5), 2000-2009. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2360>
- Golden, E. B., Pellicciotta, I., Demaria, S., Barcellos-Hoff, M. H., & Formenti, S. C. (2012). The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways. *Front Oncol*, 2, 88. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00088>
- Gonçalves, A., Sabatier, R., Charafe-Jauffret, E., Gilibert, M., Provansal, M., Tarpin, C., Extra, J. M., Viens, P., & Bertucci, F. (2013). [Triple-negative breast cancer: histoclinical and molecular features, therapeutic management and perspectives]. *Bull Cancer*, 100(5), 453-464. <https://doi.org/10.1684/bdc.2013.1740>
- Gow, A. J., Farkouh, C. R., Munson, D. A., Posencheg, M. A., & Ischiropoulos, H. (2004). Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287(2), L262-268. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00295.2003>
- Greenwald, R. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2005). The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 23, 515-548. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611>
- Grills, I. S., Mangona, V. S., Welsh, R., Chmielewski, G., McInerney, E., Martin, S., Wloch, J., Ye, H., & Kestin, L. L. (2010). Outcomes after stereotactic lung radiotherapy or wedge resection for stage I non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 28(6), 928-935. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.0928>
- Groth, C., Hu, X., Weber, R., Fleming, V., Altevogt, P., Utikal, J., & Umansky, V. (2019). Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. *Br J Cancer*, 120(1), 16-25. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0333-1>
- Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., Veys, I., Haibe-Kains, B., Singhal, S. K., Michiels, S., Rothé, F., Salgado, R., Duvillier, H., Ignatiadis, M., Desmedt, C., Bron, D., Larsimont, D., Piccart, M., Sotiriou, C., & Willard-Gallo, K. (2013). CD4<sup>+</sup> follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest*, 123(7), 2873-2892. <https://doi.org/10.1172/JCI67428>
- Guan, H., Lan, Y., Wan, Y., Wang, Q., Wang, C., Xu, L., Chen, Y., Liu, W., Zhang, X., Li, Y., Gu, Y., Wang, Z., & Xie, F. (2016). PD-L1 mediated the differentiation of tumor-infiltrating CD19. *Oncoimmunology*, 5(2), e1075112. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1075112>
- Guan, W., Sha, J., Chen, X., Xing, Y., Yan, J., & Wang, Z. (2012). S-Nitrosylation of mitogen activated protein kinase phosphatase-1 suppresses radiation-induced apoptosis. *Cancer Lett*, 314(2), 137-146. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.09.022>
- Gucalp, A., Tolaney, S., Isakoff, S. J., Ingle, J. N., Liu, M. C., Carey, L. A., Blackwell, K., Rugo, H., Nabell, L., Forero, A., Stearns, V., Doane, A. S., Danso, M., Moynahan, M. E., Momen, L. F., Gonzalez,

- J. M., Akhtar, A., Giri, D. D., Patil, S., Feigin, K. N., Hudis, C. A., Traina, T. A., & O11), T. B. C. R. C. T. (2013). Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, *19*(19), 5505-5512. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3327>
- Gunaldi, M., Okuturlar, Y., Gedikbasi, A., Akarsu, C., Karabulut, M., & Kural, A. (2015). Diagnostic importance of S100A9 and S100A12 in breast cancer. *Biomed Pharmacother*, *76*, 52-56. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.10.029>
- Haanen, J. B., & Robert, C. (2015). Immune Checkpoint Inhibitors. *Prog Tumor Res*, *42*, 55-66. <https://doi.org/10.1159/000437178>
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, *86*(3), 353-364. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80108-7)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanoteau, A., Newton, J. M., Krupar, R., Huang, C., Liu, H. C., Gaspero, A., Gartrell, R. D., Saenger, Y. M., Hart, T. D., Santegoets, S. J., Laoui, D., Spanos, C., Parikh, F., Jayaraman, P., Zhang, B., Van der Burg, S. H., Van Ginderachter, J. A., Melief, C. J. M., & Sikora, A. G. (2019). Tumor microenvironment modulation enhances immunologic benefit of chemoradiotherapy. *J Immunother Cancer*, *7*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0485-9>
- Hara, M. R., Agrawal, N., Kim, S. F., Cascio, M. B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J. H., Tankou, S. K., Hester, L. D., Ferris, C. D., Hayward, S. D., Snyder, S. H., & Sawa, A. (2005). S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol*, *7*(7), 665-674. <https://doi.org/10.1038/ncb1268>
- Harbeck, N., & Gnant, M. (2017). Breast cancer. *Lancet*, *389*(10074), 1134-1150. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8)
- Hashemi, V., Maleki, L. A., Esmaily, M., Masjedi, A., Ghalamfarsa, G., Namdar, A., Yousefi, M., Yousefi, B., & Jadidi-Niaragh, F. (2020). Regulatory T cells in breast cancer as a potent anti-cancer therapeutic target. *Int Immunopharmacol*, *78*, 106087. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106087>
- Hatem, R., El Botty, R., Chateau-Joubert, S., Servely, J. L., Labiod, D., de Plater, L., Assayag, F., Coussy, F., Callens, C., Vacher, S., Rey, F., Cosulich, S., Diéras, V., Bièche, I., & Marangoni, E. (2016). Targeting mTOR pathway inhibits tumor growth in different molecular subtypes of triple-negative breast cancers. *Oncotarget*, *7*(30), 48206-48219. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10195>
- Hawila, E., Razon, H., Wildbaum, G., Blattner, C., Sapir, Y., Shaked, Y., Umansky, V., & Karin, N. (2017). CCR5 Directs the Mobilization of CD11b. *Cell Rep*, *21*(8), 2212-2222. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.104>
- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)*, *62*(11), 1180-1190.
- Haynes, V., Elfering, S., Traaseth, N., & Giulivi, C. (2004). Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *J Bioenerg Biomembr*, *36*(4), 341-346. <https://doi.org/10.1023/B:JOB.0000041765.27145.08>
- Hermani, A., De Servi, B., Medunjanin, S., Tessier, P. A., & Mayer, D. (2006). S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells. *Exp Cell Res*, *312*(2), 184-197. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.10.013>
- Hernandez, C., Huebener, P., & Schwabe, R. F. (2016). Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene*, *35*(46), 5931-5941. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.104>

- Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H., & Maru, Y. (2006). Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol*, 8(12), 1369-1375. <https://doi.org/10.1038/ncb1507>
- Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., Muhammad Tunio, G., Matsuzawa, Y., Kanakura, Y., Shinomura, Y., & Kitamura, Y. (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*, 279(5350), 577-580. <https://doi.org/10.1126/science.279.5350.577>
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J. I., Wolchok, J. D., Weber, J. S., Tian, J., Yellin, M. J., Nichol, G. M., Hoos, A., & Urba, W. J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363(8), 711-723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>
- Hoechst, B., Ormandy, L. A., Ballmaier, M., Lehner, F., Krüger, C., Manns, M. P., Greten, T. F., & Korangy, F. (2008). A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology*, 135(1), 234-243. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.020>
- Holotiuk, V. V., Kryzhanivska, A. Y., Churpiy, I. K., Tataryn, B. B., & Ivasiutyn, D. Y. (2019). Role of nitric oxide in pathogenesis of tumor growth and its possible application in cancer treatment. *Exp Oncol*, 41(3), 210-215. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-41-no-3.13515>
- Hossain, F., Al-Khami, A. A., Wyczechowska, D., Hernandez, C., Zheng, L., Reiss, K., Valle, L. D., Trillo-Tinoco, J., Maj, T., Zou, W., Rodriguez, P. C., & Ochoa, A. C. (2015). Inhibition of Fatty Acid Oxidation Modulates Immunosuppressive Functions of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances Cancer Therapies. *Cancer Immunol Res*, 3(11), 1236-1247. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0036>
- Huang, B., Pan, P. Y., Li, Q., Sato, A. I., Levy, D. E., Bromberg, J., Divino, C. M., & Chen, S. H. (2006). Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res*, 66(2), 1123-1131. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1299>
- Huang, C. T., Workman, C. J., Flies, D., Pan, X., Marson, A. L., Zhou, G., Hipkiss, E. L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H. I., Powell, J. D., Pardoll, D. M., Drake, C. G., & Vignali, D. A. (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*, 21(4), 503-513. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.08.010>
- Huerta, S., Baay-Guzman, G., Gonzalez-Bonilla, C. R., Livingston, E. H., Huerta-Yepez, S., & Bonavida, B. (2009). In vitro and in vivo sensitization of SW620 metastatic colon cancer cells to CDDP-induced apoptosis by the nitric oxide donor DETANONOate: Involvement of AIF. *Nitric Oxide*, 20(3), 182-194. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2008.11.006>
- Huerta, S., Chilka, S., & Bonavida, B. (2008). Nitric oxide donors: novel cancer therapeutics (review). *Int J Oncol*, 33(5), 909-927.
- Huerta-Yepez, S., Baritaki, S., Baay-Guzman, G., Hernandez-Luna, M. A., Hernandez-Cueto, A., Vega, M. I., & Bonavida, B. (2013). Contribution of either YY1 or BclXL-induced inhibition by the NO-donor DETANONOate in the reversal of drug resistance, both in vitro and in vivo. YY1 and BclXL are overexpressed in prostate cancer. *Nitric Oxide*, 29, 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.12.001>
- Huerta-Yepez, S., Vega, M., Escoto-Chavez, S. E., Murdock, B., Sakai, T., Baritaki, S., & Bonavida, B. (2009). Nitric oxide sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of the DR5 transcription repressor Yin Yang 1. *Nitric Oxide*, 20(1), 39-52. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2008.08.001>
- Hynes, N. E., & MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 21(2), 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.12.010>



- Ichikawa, M., Williams, R., Wang, L., Vogl, T., & Srikrishna, G. (2011). S100A8/A9 activate key genes and pathways in colon tumor progression. *Mol Cancer Res*, *9*(2), 133-148. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0394>
- Ichikawa, Y., Ghanefar, M., Bayeva, M., Wu, R., Khechaduri, A., Naga Prasad, S. V., Mutharasan, R. K., Naik, T. J., & Ardehali, H. (2014). Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J Clin Invest*, *124*(2), 617-630. <https://doi.org/10.1172/JCI72931>
- Iclozan, C., Antonia, S., Chiappori, A., Chen, D. T., & Gabilovich, D. (2013). Therapeutic regulation of myeloid-derived suppressor cells and immune response to cancer vaccine in patients with extensive stage small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*, *62*(5), 909-918. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1396-8>
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*(24), 9265-9269. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265>
- Illum, H., Wang, D. H., Dowell, J. E., Hittson, W. J., Torrissi, J. R., Meyer, J., & Huerta, S. (2015). Phase I dose escalation trial of nitroglycerin in addition to 5-fluorouracil and radiation therapy for neoadjuvant treatment of operable rectal cancer. *Surgery*, *158*(2), 460-465. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2015.04.007>
- Ischiropoulos, H. (2003). Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun*, *305*(3), 776-783. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00814-3](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00814-3)
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., & Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*, *11*(11), 3887-3895.
- Iyer, A. K., Azad, N., Wang, L., & Rojanasakul, Y. (2008). Role of S-nitrosylation in apoptosis resistance and carcinogenesis. *Nitric Oxide*, *19*(2), 146-151. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2008.04.019>
- Jeannin, J. F., Leon, L., Cortier, M., Sassi, N., Paul, C., & Bettaieb, A. (2008). Nitric oxide-induced resistance or sensitization to death in tumor cells. *Nitric Oxide*, *19*(2), 158-163. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2008.04.024>
- Jiang, H., Gebhardt, C., Umansky, L., Beckhove, P., Schulze, T. J., Utikal, J., & Umansky, V. (2015). Elevated chronic inflammatory factors and myeloid-derived suppressor cells indicate poor prognosis in advanced melanoma patients. *Int J Cancer*, *136*(10), 2352-2360. <https://doi.org/10.1002/ijc.29297>
- Jiang, X., Wang, J., Deng, X., Xiong, F., Zhang, S., Gong, Z., Li, X., Cao, K., Deng, H., He, Y., Liao, Q., Xiang, B., Zhou, M., Guo, C., Zeng, Z., Li, G., & Xiong, W. (2020). The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *J Exp Clin Cancer Res*, *39*(1), 204. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01709-5>
- Johnston, C. J., Smyth, D. J., Dresser, D. W., & Maizels, R. M. (2016). TGF- $\beta$  in tolerance, development and regulation of immunity. *Cell Immunol*, *299*, 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.10.006>
- Jordan, K. R., Amaria, R. N., Ramirez, O., Callihan, E. B., Gao, D., Borakove, M., Manthey, E., Borges, V. F., & McCarter, M. D. (2013). Myeloid-derived suppressor cells are associated with disease progression and decreased overall survival in advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother*, *62*(11), 1711-1722. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1475-x>
- Kaliyaperumal, K., Sharma, A. K., McDonald, D. G., Dhindsa, J. S., Yount, C., Singh, A. K., Won, J. S., & Singh, I. (2015). S-Nitrosoglutathione-mediated STAT3 regulation in efficacy of radiotherapy and cisplatin therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Redox Biol*, *6*, 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.001>
- Kamada, T., Togashi, Y., Tay, C., Ha, D., Sasaki, A., Nakamura, Y., Sato, E., Fukuoka, S., Tada, Y., Tanaka, A., Morikawa, H., Kawazoe, A., Kinoshita, T., Shitara, K., Sakaguchi, S., & Nishikawa, H. (2019). PD-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(20), 9999-10008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1822001116>

- Kamm, A., Przychodzen, P., Kuban-Jankowska, A., Jacewicz, D., Dabrowska, A. M., Nussberger, S., Wozniak, M., & Gorska-Ponikowska, M. (2019). Nitric oxide and its derivatives in the cancer battlefield. *Nitric Oxide*, *93*, 102-114. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.09.005>
- Kang-Decker, N., Cao, S., Chatterjee, S., Yao, J., Egan, L. J., Semela, D., Mukhopadhyay, D., & Shah, V. (2007). Nitric oxide promotes endothelial cell survival signaling through S-nitrosylation and activation of dynamin-2. *J Cell Sci*, *120*(Pt 3), 492-501. <https://doi.org/10.1242/jcs.03361>
- Kanterman, J., Sade-Feldman, M., Biton, M., Ish-Shalom, E., Lasry, A., Goldshtein, A., Hubert, A., & Baniyash, M. (2014). Adverse immunoregulatory effects of 5FU and CPT11 chemotherapy on myeloid-derived suppressor cells and colorectal cancer outcomes. *Cancer Res*, *74*(21), 6022-6035. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0657>
- Karin, N., & Razon, H. (2018). The role of CCR5 in directing the mobilization and biological function of CD11b. *Cancer Immunol Immunother*, *67*(12), 1949-1953. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2245-6>
- Kashiwagi, S., Asano, Y., Goto, W., Takada, K., Takahashi, K., Noda, S., Takashima, T., Onoda, N., Tomita, S., Ohsawa, M., Hirakawa, K., & Ohira, M. (2017). Use of Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) to predict the treatment response to eribulin chemotherapy in breast cancer. *PLoS One*, *12*(2), e0170634. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170634>
- Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C., & Murad, F. (1977). Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res*, *3*(1), 23-35.
- Kazerounian, S., Yee, K. O., & Lawler, J. (2008). Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci*, *65*(5), 700-712. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7486-z>
- Kelly, J., Spolski, R., Imada, K., Bollenbacher, J., Lee, S., & Leonard, W. J. (2003). A role for Stat5 in CD8+ T cell homeostasis. *J Immunol*, *170*(1), 210-217. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.1.210>
- Keshet, R., & Erez, A. (2018). Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. *Dis Model Mech*, *11*(8). <https://doi.org/10.1242/dmm.033332>
- Klemke, M., Wabnitz, G. H., Funke, F., Funk, B., Kirchgessner, H., & Samstag, Y. (2008). Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions. *Immunity*, *29*(3), 404-413. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.06.016>
- Ko, J. S., Rayman, P., Ireland, J., Swaidani, S., Li, G., Bunting, K. D., Rini, B., Finke, J. H., & Cohen, P. A. (2010). Direct and differential suppression of myeloid-derived suppressor cell subsets by sunitinib is compartmentally constrained. *Cancer Res*, *70*(9), 3526-3536. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3278>
- Kochi, M., Iwamoto, T., Niikura, N., Bianchini, G., Masuda, S., Mizoo, T., Nogami, T., Shien, T., Motoki, T., Taira, N., Tokuda, Y., Doihara, H., Matsuoka, J., & Fujiwara, T. (2018). Tumour-infiltrating lymphocytes (TILs)-related genomic signature predicts chemotherapy response in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, *167*(1), 39-47. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4502-3>
- Kotsakis, A., Koinis, F., Katsarou, A., Gioulbasani, M., Aggouraki, D., Kentepozidis, N., Georgoulas, V., & Vetsika, E. K. (2016). Prognostic value of circulating regulatory T cell subsets in untreated non-small cell lung cancer patients. *Sci Rep*, *6*, 39247. <https://doi.org/10.1038/srep39247>
- Kramer, P. A., Prichard, L., Chacko, B., Ravi, S., Overton, E. T., Heath, S. L., & Darley-Usmar, V. (2015). Inhibition of the lymphocyte metabolic switch by the oxidative burst of human neutrophils. *Clin Sci (Lond)*, *129*(6), 489-504. <https://doi.org/10.1042/CS20140852>
- Ku, A. W., Muhitch, J. B., Powers, C. A., Diehl, M., Kim, M., Fisher, D. T., Sharda, A. P., Clements, V. K., O'Loughlin, K., Minderman, H., Messmer, M. N., Ma, J., Skitzki, J. J., Steeber, D. A., Walcheck, B., Ostrand-Rosenberg, S., Abrams, S. I., & Evans, S. S. (2016). Tumor-induced MDSC act via remote control to inhibit L-selectin-dependent adaptive immunity in lymph nodes. *Elife*, *5*. <https://doi.org/10.7554/eLife.17375>
- Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., & Gabrilovich, D. I. (2016). The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol*, *37*(3), 208-220. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004>

- Kurose, K., Ohue, Y., Sato, E., Yamauchi, A., Eikawa, S., Isobe, M., Nishio, Y., Uenaka, A., Oka, M., & Nakayama, E. (2015). Increase in activated Treg in TIL in lung cancer and in vitro depletion of Treg by ADCC using an antihuman CCR4 mAb (KM2760). *J Thorac Oncol*, *10*(1), 74-83. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000364>
- Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D., & Gabrilovich, D. I. (2004). Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol*, *172*(2), 989-999. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.989>
- Lamrani, M., Sassi, N., Paul, C., Yousfi, N., Boucher, J. L., Gauthier, N., Labbé, J., Seignez, C., Racœur, C., Athias, A., Guerreiro, R., Vergely, C., Rochette, L., Bettaieb, A., & Jeannin, J. F. (2016). TLR4/IFN $\gamma$  pathways induce tumor regression via NOS II-dependent NO and ROS production in murine breast cancer models. *Oncoimmunology*, *5*(5), e1123369. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1123369>
- Laouedj, M., Tardif, M. R., Gil, L., Raquil, M. A., Lachhab, A., Pelletier, M., Tessier, P. A., & Barabé, F. (2017). S100A9 induces differentiation of acute myeloid leukemia cells through TLR4. *Blood*, *129*(14), 1980-1990. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-738005>
- Law, A. M., Lim, E., Ormandy, C. J., & Gallego-Ortega, D. (2017). The innate and adaptive infiltrating immune systems as targets for breast cancer immunotherapy. *Endocr Relat Cancer*, *24*(4), R123-R144. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0404>
- Law, A. M. K., Valdes-Mora, F., & Gallego-Ortega, D. (2020). Myeloid-Derived Suppressor Cells as a Therapeutic Target for Cancer. *Cells*, *9*(3). <https://doi.org/10.3390/cells9030561>
- Le, H. K., Graham, L., Cha, E., Morales, J. K., Manjili, M. H., & Bear, H. D. (2009). Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. *Int Immunopharmacol*, *9*(7-8), 900-909. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2009.03.015>
- Leach, D. R., Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, *271*(5256), 1734-1736. <https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1734>
- Leahy, K. M., Ornberg, R. L., Wang, Y., Zweifel, B. S., Koki, A. T., & Masferrer, J. L. (2002). Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res*, *62*(3), 625-631.
- Lee, J., Kefford, R., & Carlino, M. (2016). PD-1 and PD-L1 inhibitors in melanoma treatment: past success, present application and future challenges. *Immunotherapy*, *8*(6), 733-746. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0022>
- Lee, W., & Lee, G. R. (2018). Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. *Exp Mol Med*, *50*(3), e456. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.313>
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*, *121*(7), 2750-2767. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, *141*(7), 1117-1134. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>
- Leon-Bollotte, L., Subramaniam, S., Cauvard, O., Plenchette-Colas, S., Paul, C., Godard, C., Martinez-Ruiz, A., Legembre, P., Jeannin, J. F., & Bettaieb, A. (2011). S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells. *Gastroenterology*, *140*(7), 2009-2018. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.053>
- Lesokhin, A. M., Hohl, T. M., Kitano, S., Cortez, C., Hirschhorn-Cymerman, D., Avogadri, F., Rizzuto, G. A., Lazarus, J. J., Pamer, E. G., Houghton, A. N., Merghoub, T., & Wolchok, J. D. (2012). Monocytic CCR2(+) myeloid-derived suppressor cells promote immune escape by limiting activated CD8 T-cell infiltration into the tumor microenvironment. *Cancer Res*, *72*(4), 876-886. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1792>
- Levin, G., Kariv, N., Khomiak, E., & Raz, A. (2000). Indomethacin inhibits the accumulation of tumor cells in mouse lungs and subsequent growth of lung metastases. *Chemotherapy*, *46*(6), 429-437. <https://doi.org/10.1159/00007323>

- Li, F., Sonveaux, P., Rabbani, Z. N., Liu, S., Yan, B., Huang, Q., Vujaskovic, Z., Dewhirst, M. W., & Li, C. Y. (2007). Regulation of HIF-1 $\alpha$  stability through S-nitrosylation. *Mol Cell*, 26(1), 63-74. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.024>
- Li, F., Zhao, Y., Wei, L., Li, S., & Liu, J. (2018). Tumor-infiltrating Treg, MDSC, and IDO expression associated with outcomes of neoadjuvant chemotherapy of breast cancer. *Cancer Biol Ther*, 19(8), 695-705. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1450116>
- Li, S., Xu, H. X., Wu, C. T., Wang, W. Q., Jin, W., Gao, H. L., Li, H., Zhang, S. R., Xu, J. Z., Qi, Z. H., Ni, Q. X., Yu, X. J., & Liu, L. (2019). Angiogenesis in pancreatic cancer: current research status and clinical implications. *Angiogenesis*, 22(1), 15-36. <https://doi.org/10.1007/s10456-018-9645-2>
- Li, X., Peng, J., Pang, Y., Yu, S., Yu, X., Chen, P., Wang, W., Han, W., Zhang, J., Yin, Y., & Zhang, Y. (2015). Identification of a FOXP3(+)CD3(+)CD56(+) population with immunosuppressive function in cancer tissues of human hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*, 5, 14757. <https://doi.org/10.1038/srep14757>
- Li, Y. L., Zhao, H., & Ren, X. B. (2016). Relationship of VEGF/VEGFR with immune and cancer cells: staggering or forward? *Cancer Biol Med*, 13(2), 206-214. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2015.0070>
- Liang, H., Li, H., Xie, Z., Jin, T., Chen, Y., Lv, Z., Tan, X., Li, J., Han, G., He, W., Qiu, N., Jiang, M., Zhou, J., Xia, H., Zhan, Y., Cui, L., Guo, W., Huang, J., Zhang, X., & Wu, Y. L. (2020). Quantitative multiplex immunofluorescence analysis identifies infiltrating PD1. *Thorac Cancer*, 11(10), 2941-2954. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13639>
- Limagne, E., Euvrard, R., Thibaudin, M., Rébé, C., Derangère, V., Chevriaux, A., Boidot, R., Végran, F., Bonnefoy, N., Vincent, J., Bengrine-Lefevre, L., Ladoire, S., Delmas, D., Apetoh, L., & Ghiringhelli, F. (2016). Accumulation of MDSC and Th17 Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Predicts the Efficacy of a FOLFOX-Bevacizumab Drug Treatment Regimen. *Cancer Res*, 76(18), 5241-5252. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3164>
- Litton, J. K., Rugo, H. S., Ettl, J., Hurvitz, S. A., Gonçalves, A., Lee, K. H., Fehrenbacher, L., Yerushalmi, R., Mina, L. A., Martin, M., Roché, H., Im, Y. H., Quek, R. G. W., Markova, D., Tudor, I. C., Hannah, A. L., Eiermann, W., & Blum, J. L. (2018). Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med*, 379(8), 753-763. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1802905>
- Litvinova, L., Atochin, D. N., Fattakhov, N., Vasilenko, M., Zatolokin, P., & Kirienkova, E. (2015). Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome. *Front Physiol*, 6, 20. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00020>
- Liu, C. Y., Wang, Y. M., Wang, C. L., Feng, P. H., Ko, H. W., Liu, Y. H., Wu, Y. C., Chu, Y., Chung, F. T., Kuo, C. H., Lee, K. Y., Lin, S. M., Lin, H. C., Wang, C. H., Yu, C. T., & Kuo, H. P. (2010). Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup>/CD15<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> myeloid-derived suppressor cells and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 136(1), 35-45. <https://doi.org/10.1007/s00432-009-0634-0>
- Liu, F., Lang, R., Zhao, J., Zhang, X., Pringle, G. A., Fan, Y., Yin, D., Gu, F., Yao, Z., & Fu, L. (2011). CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell and FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat*, 130(2), 645-655. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1647-3>
- Liu, S., Lachapelle, J., Leung, S., Gao, D., Foulkes, W. D., & Nielsen, T. O. (2012). CD8<sup>+</sup> lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res*, 14(2), R48. <https://doi.org/10.1186/bcr3148>
- Liu, Y. S., Chuang, M. T., Tsai, Y. S., Tsai, H. M., & Lin, X. Z. (2012). Nitroglycerine use in transcatheter arterial (chemo)embolization in patients with hepatocellular carcinoma and dual-energy CT assessment of Lipiodol retention. *Eur Radiol*, 22(10), 2193-2200. <https://doi.org/10.1007/s00330-012-2484-4>
- Loi, S., Giobbie-Hurder, A., Gombos, A., Bachelot, T., Hui, R., Curigliano, G., Campone, M., Biganzoli, L., Bonnefoi, H., Jerusalem, G., Bartsch, R., Rabaglio-Poretti, M., Kammler, R., Maibach, R., Smyth,

- M. J., Di Leo, A., Colleoni, M., Viale, G., Regan, M. M., André, F., & Group, I. B. C. S. G. a. t. B. I. (2019). Pembrolizumab plus trastuzumab in trastuzumab-resistant, advanced, HER2-positive breast cancer (PANACEA): a single-arm, multicentre, phase 1b-2 trial. *Lancet Oncol*, *20*(3), 371-382. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30812-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30812-X)
- Long, B. H., & Fairchild, C. R. (1994). Paclitaxel inhibits progression of mitotic cells to G1 phase by interference with spindle formation without affecting other microtubule functions during anaphase and telephase. *Cancer Res*, *54*(16), 4355-4361.
- Lowenfeld, L., Xu, S., & Czerniecki, B. J. (2019). CD4. *Oncoimmunology*, *8*(10), e1078062. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1078062>
- Lu, C., Redd, P. S., Lee, J. R., Savage, N., & Liu, K. (2016). The expression profiles and regulation of PD-L1 in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology*, *5*(12), e1247135. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1247135>
- Lu, W., Yu, W., He, J., Liu, W., Yang, J., Lin, X., Zhang, Y., Wang, X., Jiang, W., Luo, J., Zhang, Q., Yang, H., Peng, S., Yi, Z., Ren, S., Chen, J., Siwko, S., Nussinov, R., Cheng, F., Zhang, H., & Liu, M. (2020). Reprogramming immunosuppressive myeloid cells facilitates immunotherapy for colorectal cancer. *EMBO Mol Med*, e12798. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012798>
- Lu, X. (2017). Impact of IL-12 in Cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, *17*(8), 682-697. <https://doi.org/10.2174/1568009617666170427102729>
- Lyons, T. G. (2019). Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol*, *20*(11), 82. <https://doi.org/10.1007/s11864-019-0682-x>
- Lyons, T. G., & Traina, T. A. (2019). Emerging Novel Therapeutics in Triple-Negative Breast Cancer. *Adv Exp Med Biol*, *1152*, 377-399. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_20)
- López-Sánchez, L. M., Aranda, E., & Rodríguez-Ariza, A. (2020). Nitric oxide and tumor metabolic reprogramming. *Biochem Pharmacol*, *176*, 113769. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113769>
- Ma, K., Yang, L., Shen, R., Kong, B., Chen, W., Liang, J., Tang, G., & Zhang, B. (2018). Th17 cells regulate the production of CXCL1 in breast cancer. *Int Immunopharmacol*, *56*, 320-329. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.01.026>
- Ma, Y., Conforti, R., Aymeric, L., Locher, C., Kepp, O., Kroemer, G., & Zitvogel, L. (2011). How to improve the immunogenicity of chemotherapy and radiotherapy. *Cancer Metastasis Rev*, *30*(1), 71-82. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9283-2>
- Mabrouk, N., Ghione, S., Laurens, V., Plenchette, S., Bettaieb, A., & Paul, C. (2020). Senescence and Cancer: Role of Nitric Oxide (NO) in SASP. *Cancers (Basel)*, *12*(5). <https://doi.org/10.3390/cancers12051145>
- Maher, A., Abdel Rahman, M. F., & Gad, M. Z. (2017). The Role of Nitric Oxide from Neurological Disease to Cancer. *Adv Exp Med Biol*, *1007*, 71-88. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-60733-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-60733-7_5)
- Mahmoud, S. M., Paish, E. C., Powe, D. G., Macmillan, R. D., Grainge, M. J., Lee, A. H., Ellis, I. O., & Green, A. R. (2011). Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*, *29*(15), 1949-1955. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.5037>
- Maj, T., Wang, W., Crespo, J., Zhang, H., Wei, S., Zhao, L., Vatan, L., Shao, I., Szeliga, W., Lyssiotis, C., Liu, J. R., Kryczek, I., & Zou, W. (2017). Oxidative stress controls regulatory T cell apoptosis and suppressor activity and PD-L1-blockade resistance in tumor. *Nat Immunol*, *18*(12), 1332-1341. <https://doi.org/10.1038/ni.3868>
- Malmberg, K. J., Arulampalam, V., Ichihara, F., Petersson, M., Seki, K., Andersson, T., Lenkei, R., Masucci, G., Pettersson, S., & Kiessling, R. (2001). Inhibition of activated/memory (CD45RO(+)) T cells by oxidative stress associated with block of NF-kappaB activation. *J Immunol*, *167*(5), 2595-2601. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.5.2595>
- Mandal, P. K., Biswas, S., Mandal, G., Purohit, S., Gupta, A., Majumdar Giri, A., Roy Chowdhury, S., & Bhattacharyya, A. (2018). CCL2 conditionally determines CCL22-dependent Th2-accumulation during TGF- $\beta$ -induced breast cancer progression. *Immunobiology*, *223*(2), 151-161. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.031>

- Mantovani, G., Macciò, A., Madeddu, C., Mura, L., Gramignano, G., Lusso, M. R., Massa, E., Mocci, M., & Serpe, R. (2003). Antioxidant agents are effective in inducing lymphocyte progression through cell cycle in advanced cancer patients: assessment of the most important laboratory indexes of cachexia and oxidative stress. *J Mol Med (Berl)*, *81*(10), 664-673. <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0476-1>
- Mao, Y., Qu, Q., Chen, X., Huang, O., Wu, J., & Shen, K. (2016). The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, *11*(4), e0152500. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152500>
- Mao, Y., Qu, Q., Zhang, Y., Liu, J., Chen, X., & Shen, K. (2014). The value of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, *9*(12), e115103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115103>
- Markiewski, M. M., DeAngelis, R. A., Benencia, F., Ricklin-Lichtsteiner, S. K., Koutoulaki, A., Gerard, C., Coukos, G., & Lambris, J. D. (2008). Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol*, *9*(11), 1225-1235. <https://doi.org/10.1038/ni.1655>
- Markowitz, J., Wang, J., Vangundy, Z., You, J., Yildiz, V., Yu, L., Foote, I. P., Branson, O. E., Stiff, A. R., Brooks, T. R., Biesiadecki, B., Olencki, T., Tridandapani, S., Freitas, M. A., Papenfuss, T., Phelps, M. A., & Carson, W. E. (2017). Nitric oxide mediated inhibition of antigen presentation from DCs to CD4. *Sci Rep*, *7*(1), 15424. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14970-0>
- Markowitz, J., Wesolowski, R., Papenfuss, T., Brooks, T. R., & Carson, W. E. (2013). Myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, *140*(1), 13-21. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2618-7>
- Martin, A., Seignez, C., Racoeur, C., Isambert, N., Mabrouk, N., Scagliarini, A., Reveneau, S., Arnould, L., Bettaieb, A., Jeannin, J. F., & Paul, C. (2018). Tumor-derived granzyme B-expressing neutrophils acquire antitumor potential after lipid A treatment. *Oncotarget*, *9*(47), 28364-28378. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25342>
- Martin, A. M., Nirschl, T. R., Nirschl, C. J., Francica, B. J., Kochel, C. M., van Bokhoven, A., Meeker, A. K., Lucia, M. S., Anders, R. A., DeMarzo, A. M., & Drake, C. G. (2015). Paucity of PD-L1 expression in prostate cancer: innate and adaptive immune resistance. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, *18*(4), 325-332. <https://doi.org/10.1038/pcan.2015.39>
- Martin, F., Apetoh, L., & Ghiringhelli, F. (2012). Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF- $\beta$ -dependent immunosuppressive activity? *Trends Mol Med*, *18*(12), 742-749. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.09.007>
- Mastelic-Gavillet, B., Navarro Rodrigo, B., Décombaz, L., Wang, H., Ercolano, G., Ahmed, R., Lozano, L. E., Ianaro, A., Derré, L., Valerio, M., Tawadros, T., Jichlinski, P., Nguyen-Ngoc, T., Speiser, D. E., Verdeil, G., Gestermann, N., Dormond, O., Kandalaf, L., Coukos, G., Jandus, C., Ménétrier-Caux, C., Caux, C., Ho, P. C., Romero, P., Harari, A., & Vigano, S. (2019). Adenosine mediates functional and metabolic suppression of peripheral and tumor-infiltrating CD8. *J Immunother Cancer*, *7*(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0719-5>
- McCoy, M. J., Hemmings, C., Miller, T. J., Austin, S. J., Bulsara, M. K., Zeps, N., Nowak, A. K., Lake, R. A., & Platell, C. F. (2015). Low stromal Foxp3+ regulatory T-cell density is associated with complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer. *Br J Cancer*, *113*(12), 1677-1686. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.427>
- McLemore, L. E., Janakiram, M., Albanese, J., Shapiro, N., Lo, Y., Zang, X., & Fineberg, S. (2018). An Immunoscore Using PD-L1, CD68, and Tumor-infiltrating Lymphocytes (TILs) to Predict Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Invasive Breast Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, *26*(9), 611-619. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000485>
- Mehmeti-Ajradini, M., Bergenfelz, C., Larsson, A. M., Carlsson, R., Riesbeck, K., Ahl, J., Janols, H., Wullt, M., Bredberg, A., Källberg, E., Björk Gunnarsdottir, F., Rydberg Millrud, C., Rydén, L., Paul, G., Loman, N., Adolfsson, J., Carneiro, A., Jirström, K., Killander, F., Bexell, D., & Leandersson, K. (2020). Human G-MDSCs are neutrophils at distinct maturation stages promoting tumor growth in breast cancer. *Life Sci Alliance*, *3*(11). <https://doi.org/10.26508/lsa.202000893>

- Melani, C., Sangaletti, S., Barazzetta, F. M., Werb, Z., & Colombo, M. P. (2007). Amino-biphosphonate-mediated MMP-9 inhibition breaks the tumor-bone marrow axis responsible for myeloid-derived suppressor cell expansion and macrophage infiltration in tumor stroma. *Cancer Res*, 67(23), 11438-11446. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1882>
- Mellor, A. L., & Munn, D. H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*, 4(10), 762-774. <https://doi.org/10.1038/nri1457>
- Migali, C., Milano, M., Trapani, D., Criscitiello, C., Esposito, A., Locatelli, M., Minchella, I., & Curigliano, G. (2016). Strategies to modulate the immune system in breast cancer: checkpoint inhibitors and beyond. *Ther Adv Med Oncol*, 8(5), 360-374. <https://doi.org/10.1177/1758834016658423>
- Millet, A., Bettaieb, A., Renaud, F., Prevotat, L., Hammann, A., Solary, E., Mignotte, B., & Jeannin, J. F. (2002). Influence of the nitric oxide donor glyceryl trinitrate on apoptotic pathways in human colon cancer cells. *Gastroenterology*, 123(1), 235-246. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.34310>
- Millrud, C. R., Bergenfelz, C., & Leandersson, K. (2017). On the origin of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget*, 8(2), 3649-3665. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12278>
- Mirza, N., Fishman, M., Fricke, I., Dunn, M., Neuger, A. M., Frost, T. J., Lush, R. M., Antonia, S., & Gabilovich, D. I. (2006). All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res*, 66(18), 9299-9307. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1690>
- Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*, 27, 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>
- Molon, B., Ugel, S., Del Pozzo, F., Soldani, C., Zilio, S., Avella, D., De Palma, A., Mauri, P., Monegal, A., Rescigno, M., Savino, B., Colombo, P., Jonjic, N., Pecanic, S., Lazzarato, L., Fruttero, R., Gasco, A., Bronte, V., & Viola, A. (2011). Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J Exp Med*, 208(10), 1949-1962. <https://doi.org/10.1084/jem.20101956>
- Monney, L., Sabatos, C. A., Gaglia, J. L., Ryu, A., Waldner, H., Chernova, T., Manning, S., Greenfield, E. A., Coyle, A. J., Sobel, R. A., Freeman, G. J., & Kuchroo, V. K. (2002). Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*, 415(6871), 536-541. <https://doi.org/10.1038/415536a>
- Montero, A. J., Diaz-Montero, C. M., Deutsch, Y. E., Hurley, J., Koniaris, L. G., Rumboldt, T., Yasir, S., Jorda, M., Garret-Mayer, E., Avisar, E., Slingerland, J., Silva, O., Welsh, C., Schuhwerk, K., Seo, P., Pegram, M. D., & Glück, S. (2012). Phase 2 study of neoadjuvant treatment with NOV-002 in combination with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel in patients with HER-2 negative clinical stage II-IIIc breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 132(1), 215-223. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1889-0>
- Moon, Y. W., Hajjar, J., Hwu, P., & Naing, A. (2015). Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J Immunother Cancer*, 3, 51. <https://doi.org/10.1186/s40425-015-0094-9>
- Moris, D., Spartalis, E., Angelou, A., Margonis, G. A., Papalambros, A., Petrou, A., Athanasiou, A., Schizas, D., Dimitroulis, D., & Felekouras, E. (2016). The value of calprotectin S100A8/A9 complex as a biomarker in colorectal cancer: A systematic review. *J BUON*, 21(4), 859-866.
- Moskovitz, J., Moy, J., & Ferris, R. L. (2018). Immunotherapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Curr Oncol Rep*, 20(2), 22. <https://doi.org/10.1007/s11912-018-0654-5>
- Mostafa, A. A., Meyers, D. E., Thirukkumaran, C. M., Liu, P. J., Gratton, K., Spurrell, J., Shi, Q., Thakur, S., & Morris, D. G. (2018). Oncolytic Reovirus and Immune Checkpoint Inhibition as a Novel Immunotherapeutic Strategy for Breast Cancer. *Cancers (Basel)*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/cancers10060205>
- Mougiakakos, D., Johansson, C. C., Jitschin, R., Böttcher, M., & Kiessling, R. (2011). Increased thioredoxin-1 production in human naturally occurring regulatory T cells confers enhanced tolerance to oxidative stress. *Blood*, 117(3), 857-861. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-307041>

- Mougiakakos, D., Johansson, C. C., & Kiessling, R. (2009). Naturally occurring regulatory T cells show reduced sensitivity toward oxidative stress-induced cell death. *Blood*, *113*(15), 3542-3545. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-181040>
- Movahedi, K., Guilliams, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A., De Baetselier, P., & Van Ginderachter, J. A. (2008). Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*, *111*(8), 4233-4244. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-099226>
- Murad, F. (2006). Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med*, *355*(19), 2003-2011. <https://doi.org/10.1056/NEJMsa063904>
- Müller, M., Carter, S. L., Hofer, M. J., Manders, P., Getts, D. R., Getts, M. T., Dreykluft, A., Lu, B., Gerard, C., King, N. J., & Campbell, I. L. (2007). CXCR3 signaling reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the parenchymal distribution of effector and regulatory T cells in the central nervous system. *J Immunol*, *179*(5), 2774-2786. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.2774>
- Müller, P., Kreuzaler, M., Khan, T., Thommen, D. S., Martin, K., Glatz, K., Savic, S., Harbeck, N., Nitz, U., Gluz, O., von Bergwelt-Baildon, M., Kreipe, H., Reddy, S., Christgen, M., & Zippelius, A. (2015). Trastuzumab emtansine (T-DM1) renders HER2+ breast cancer highly susceptible to CTLA-4/PD-1 blockade. *Sci Transl Med*, *7*(315), 315ra188. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac4925>
- Nagaraj, S., & Gabrilovich, D. I. (2010). Myeloid-derived suppressor cells in human cancer. *Cancer J*, *16*(4), 348-353. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e3181eb3358>
- Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V., Kinarsky, L., Sherman, S., Kang, L., Herber, D. L., Schneck, J., & Gabrilovich, D. I. (2007). Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med*, *13*(7), 828-835. <https://doi.org/10.1038/nm1609>
- Nagini, S. (2017). Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. *Anticancer Agents Med Chem*, *17*(2), 152-163. <https://doi.org/10.2174/1871520616666160502122724>
- Nanda, R., Chow, L. Q., Dees, E. C., Berger, R., Gupta, S., Geva, R., Puztai, L., Pathiraja, K., Aktan, G., Cheng, J. D., Karantza, V., & Buisseret, L. (2016). Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol*, *34*(21), 2460-2467. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.64.8931>
- Nanda, R., Liu, M. C., Yau, C., Shatsky, R., Puztai, L., Wallace, A., Chien, A. J., Forero-Torres, A., Ellis, E., Han, H., Clark, A., Albain, K., Boughey, J. C., Jaskowiak, N. T., Elias, A., Isaacs, C., Kemmer, K., Helsten, T., Majure, M., Stringer-Reasor, E., Parker, C., Lee, M. C., Haddad, T., Cohen, R. N., Asare, S., Wilson, A., Hirst, G. L., Singhrao, R., Steeg, K., Asare, A., Matthews, J. B., Berry, S., Sanil, A., Schwab, R., Symmans, W. F., van 't Veer, L., Yee, D., DeMichele, A., Hylton, N. M., Melisko, M., Perlmutter, J., Rugo, H. S., Berry, D. A., & Esserman, L. J. (2020). Effect of Pembrolizumab Plus Neoadjuvant Chemotherapy on Pathologic Complete Response in Women With Early-Stage Breast Cancer: An Analysis of the Ongoing Phase 2 Adaptively Randomized I-SPY2 Trial. *JAMA Oncol*, *6*(5), 676-684. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.6650>
- Napoli, C., Paolisso, G., Casamassimi, A., Al-Omran, M., Barbieri, M., Sommese, L., Infante, T., & Ignarro, L. J. (2013). Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights. *J Am Coll Cardiol*, *62*(2), 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.03.070>
- Nefedova, Y., Fishman, M., Sherman, S., Wang, X., Beg, A. A., & Gabrilovich, D. I. (2007). Mechanism of all-trans retinoic acid effect on tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*, *67*(22), 11021-11028. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2593>
- Nortier, J., Vandenabeele, P., Noël, E., Bosseloir, Y., Goldman, M., & Deschodt-Lanckman, M. (1991). Enzymatic degradation of tumor necrosis factor by activated human neutrophils: role of elastase. *Life Sci*, *49*(25), 1879-1886. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(91\)90288-m](https://doi.org/10.1016/0024-3205(91)90288-m)
- Nuñez, S., Saez, J. J., Fernandez, D., Flores-Santibañez, F., Alvarez, K., Tejon, G., Ruiz, P., Maldonado, P., Hidalgo, Y., Manriquez, V., Bono, M. R., Roseblatt, M., & Sauma, D. (2013). T helper type



- 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. *Immunology*, 139(1), 61-71. <https://doi.org/10.1111/imm.12055>
- O'Donnell, J. S., Teng, M. W. L., & Smyth, M. J. (2019). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 16(3), 151-167. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0142-8>
- Obermajer, N., Wong, J. L., Edwards, R. P., Odunsi, K., Moysich, K., & Kalinski, P. (2012). PGE(2)-driven induction and maintenance of cancer-associated myeloid-derived suppressor cells. *Immunol Invest*, 41(6-7), 635-657. <https://doi.org/10.3109/08820139.2012.695417>
- Ochoa, A. C., Zea, A. H., Hernandez, C., & Rodriguez, P. C. (2007). Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 13(2 Pt 2), 721s-726s. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2197>
- Ohue, Y., & Nishikawa, H. (2019). Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci*, 110(7), 2080-2089. <https://doi.org/10.1111/cas.14069>
- Onier, N., Hilpert, S., Arnould, L., Saint-Giorgio, V., Davies, J. G., & Jeannin, J. F. (1999). Cure of colon cancer metastasis in rats with the new lipid A OM 174. Apoptosis of tumor cells and immunization of rats. *Clin Exp Metastasis*, 17(4), 299-306. <https://doi.org/10.1023/a:1006663017149>
- Onishi, H., Shirato, H., Nagata, Y., Hiraoka, M., Fujino, M., Gomi, K., Karasawa, K., Hayakawa, K., Niibe, Y., Takai, Y., Kimura, T., Takeda, A., Ouchi, A., Hareyama, M., Kokubo, M., Kozuka, T., Arimoto, T., Hara, R., Itami, J., & Araki, T. (2011). Stereotactic body radiotherapy (SBRT) for operable stage I non-small-cell lung cancer: can SBRT be comparable to surgery? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 81(5), 1352-1358. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.07.1751>
- Ostrand-Rosenberg, S. (2005). CD4+ T lymphocytes: a critical component of antitumor immunity. *Cancer Invest*, 23(5), 413-419.
- Ottonello, S., Genova, C., Cossu, I., Fontana, V., Rijavec, E., Rossi, G., Biello, F., Dal Bello, M. G., Tagliamento, M., Alama, A., Coco, S., Boccardo, S., Vanni, I., Ferlazzo, G., Moretta, L., Grossi, F., Mingari, M. C., Carrega, P., & Pietra, G. (2020). Association Between Response to Nivolumab Treatment and Peripheral Blood Lymphocyte Subsets in Patients With Non-small Cell Lung Cancer. *Front Immunol*, 11, 125. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00125>
- Ozao-Choy, J., Ma, G., Kao, J., Wang, G. X., Meseck, M., Sung, M., Schwartz, M., Divino, C. M., Pan, P. Y., & Chen, S. H. (2009). The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res*, 69(6), 2514-2522. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4709>
- Pagès, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molitor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., Meatchi, T., Bruneval, P., Cugnenc, P. H., Trajanoski, Z., Fridman, W. H., & Galon, J. (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*, 353(25), 2654-2666. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051424>
- Pan, P. Y., Ma, G., Weber, K. J., Ozao-Choy, J., Wang, G., Yin, B., Divino, C. M., & Chen, S. H. (2010). Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res*, 70(1), 99-108. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1882>
- Pan, P. Y., Wang, G. X., Yin, B., Ozao, J., Ku, T., Divino, C. M., & Chen, S. H. (2008). Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood*, 111(1), 219-228. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-04-086835>
- Pardoll, D. (2009). Metastasis-promoting immunity: when T cells turn to the dark side. *Cancer Cell*, 16(2), 81-82. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.07.007>
- Park, M. J., Lee, S. H., Kim, E. K., Lee, E. J., Baek, J. A., Park, S. H., Kwok, S. K., & Cho, M. L. (2018). Interleukin-10 produced by myeloid-derived suppressor cells is critical for the induction of Tregs and attenuation of rheumatoid inflammation in mice. *Sci Rep*, 8(1), 3753. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21856-2>

- Pascual, J., & Turner, N. C. (2019). Targeting the PI3-kinase pathway in triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*, 30(7), 1051-1060. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz133>
- Patruno, A., Pesce, M., Marrone, A., Speranza, L., Grilli, A., De Lutiis, M. A., Felaco, M., & Reale, M. (2012). Activity of matrix metallo proteinases (MMPs) and the tissue inhibitor of MMP (TIMP)-1 in electromagnetic field-exposed THP-1 cells. *J Cell Physiol*, 227(6), 2767-2774. <https://doi.org/10.1002/jcp.23024>
- Perona, R. (2006). Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin Transl Oncol*, 8(2), 77-82. <https://doi.org/10.1007/s12094-006-0162-1>
- Perou, C. M., Sørli, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Pi, X., Wu, Y., Ferguson, J. E., Portbury, A. L., & Patterson, C. (2009). SDF-1alpha stimulates JNK3 activity via eNOS-dependent nitrosylation of MKP7 to enhance endothelial migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(14), 5675-5680. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809568106>
- Piantadosi, C. A. (2012). Regulation of mitochondrial processes by protein S-nitrosylation. *Biochim Biophys Acta*, 1820(6), 712-721. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.03.008>
- Pillay, J., Kamp, V. M., van Hoffen, E., Visser, T., Tak, T., Lammers, J. W., Ulfman, L. H., Leenen, L. P., Pickkers, P., & Koenderman, L. (2012). A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest*, 122(1), 327-336. <https://doi.org/10.1172/JCI57990>
- Pillay, J., Tak, T., Kamp, V. M., & Koenderman, L. (2013). Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell Mol Life Sci*, 70(20), 3813-3827. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1286-4>
- Pistoia, V., Morandi, F., Bianchi, G., Pezzolo, A., Prigione, I., & Raffaghello, L. (2013). Immunosuppressive microenvironment in neuroblastoma. *Front Oncol*, 3, 167. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00167>
- Pitt, J. M., Vétizou, M., Daillère, R., Roberti, M. P., Yamazaki, T., Routy, B., Lepage, P., Boneca, I. G., Chamaillard, M., Kroemer, G., & Zitvogel, L. (2016). Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity*, 44(6), 1255-1269. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.06.001>
- Porta, C., Consonni, F. M., Morlacchi, S., Sangaletti, S., Bleve, A., Totaro, M. G., Larghi, P., Rimoldi, M., Tripodo, C., Strauss, L., Banfi, S., Storto, M., Pressiani, T., Rimassa, L., Tartari, S., Ippolito, A., Doni, A., Soldà, G., Duga, S., Piccolo, V., Ostuni, R., Natoli, G., Bronte, V., Balzac, F., Turco, E., Hirsch, E., Colombo, M. P., & Sica, A. (2020). Tumor-Derived Prostaglandin E2 Promotes p50 NF-κB-Dependent Differentiation of Monocytic MDSCs. *Cancer Res*, 80(13), 2874-2888. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2843>
- Priceman, S. J., Sung, J. L., Shaposhnik, Z., Burton, J. B., Torres-Collado, A. X., Moughon, D. L., Johnson, M., Lusic, A. J., Cohen, D. A., Iruela-Arispe, M. L., & Wu, L. (2010). Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy. *Blood*, 115(7), 1461-1471. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-237412>
- Prima, V., Kaliberova, L. N., Kaliberov, S., Curiel, D. T., & Kusmartsev, S. (2017). COX2/mPGES1/PGE2 pathway regulates PD-L1 expression in tumor-associated macrophages and myeloid-derived suppressor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(5), 1117-1122. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612920114>
- Prévotat, L., Filomenko, R., Solary, E., Jeannin, J. F., & Bettaieb, A. (2006). Nitric oxide-induced down-regulation of beta-catenin in colon cancer cells by a proteasome-independent specific pathway. *Gastroenterology*, 131(4), 1142-1152. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.07.017>
- Qu, X., Tang, Y., & Hua, S. (2018). Immunological Approaches Towards Cancer and Inflammation: A Cross Talk. *Front Immunol*, 9, 563. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00563>

- Raber, P. L., Thevenot, P., Sierra, R., Wyczechowska, D., Halle, D., Ramirez, M. E., Ochoa, A. C., Fletcher, M., Velasco, C., Wilk, A., Reiss, K., & Rodriguez, P. C. (2014). Subpopulations of myeloid-derived suppressor cells impair T cell responses through independent nitric oxide-related pathways. *Int J Cancer*, *134*(12), 2853-2864. <https://doi.org/10.1002/ijc.28622>
- Rahman, M. A., Senga, T., Ito, S., Hyodo, T., Hasegawa, H., & Hamaguchi, M. (2010). S-nitrosylation at cysteine 498 of c-Src tyrosine kinase regulates nitric oxide-mediated cell invasion. *J Biol Chem*, *285*(6), 3806-3814. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.059782>
- Raines, K. W., Bonini, M. G., & Campbell, S. L. (2007). Nitric oxide cell signaling: S-nitrosation of Ras superfamily GTPases. *Cardiovasc Res*, *75*(2), 229-239. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.04.013>
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N., & Forsthuber, T. G. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, *74*(1), 5-17. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>
- Rapoport, B. L., Steel, H. C., Theron, A. J., Smit, T., & Anderson, R. (2020). Role of the Neutrophil in the Pathogenesis of Advanced Cancer and Impaired Responsiveness to Therapy. *Molecules*, *25*(7). <https://doi.org/10.3390/molecules25071618>
- Reichel, C. A., Puhr-Westerheide, D., Zuchtriegel, G., Uhl, B., Berberich, N., Zahler, S., Wymann, M. P., Luckow, B., & Krombach, F. (2012). C-C motif chemokine CCL3 and canonical neutrophil attractants promote neutrophil extravasation through common and distinct mechanisms. *Blood*, *120*(4), 880-890. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-402164>
- Reinmuth, N., Meyer, A., Hartwigsen, D., Schaeper, C., Huebner, G., Skock-Lober, R., Bier, A., Gerecke, U., Held, C. P., & Reck, M. (2014). Randomized, double-blind phase II study to compare nitroglycerin plus oral vinorelbine plus cisplatin with oral vinorelbine plus cisplatin alone in patients with stage IIIB/IV non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*, *83*(3), 363-368. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.01.001>
- Reuben, J. M., Lee, B. N., Li, C., Gomez-Navarro, J., Bozon, V. A., Parker, C. A., Hernandez, I. M., Gutierrez, C., Lopez-Berestein, G., & Camacho, L. H. (2006). Biologic and immunomodulatory events after CTLA-4 blockade with ticilimumab in patients with advanced malignant melanoma. *Cancer*, *106*(11), 2437-2444. <https://doi.org/10.1002/cncr.21854>
- Ribas, A., & Wolchok, J. D. (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, *359*(6382), 1350-1355. <https://doi.org/10.1126/science.aar4060>
- Ridge, J. P., Di Rosa, F., & Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature*, *393*(6684), 474-478. <https://doi.org/10.1038/30989>
- Ridnour, L. A., Barasch, K. M., Windhausen, A. N., Dorsey, T. H., Lizardo, M. M., Yfantis, H. G., Lee, D. H., Switzer, C. H., Cheng, R. Y., Heinecke, J. L., Brueggemann, E., Hines, H. B., Khanna, C., Glynn, S. A., Ambs, S., & Wink, D. A. (2012). Nitric oxide synthase and breast cancer: role of TIMP-1 in NO-mediated Akt activation. *PLoS One*, *7*(9), e44081. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044081>
- Rizza, S., & Filomeni, G. (2018). Role, Targets and Regulation of (de)nitrosylation in Malignancy. *Front Oncol*, *8*, 334. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00334>
- Rizza, S., & Filomeni, G. (2020). Exploiting S-nitrosylation for cancer therapy: facts and perspectives. *Biochem J*, *477*(19), 3649-3672. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200064>
- Robson, M., Im, S. A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S. M., Masuda, N., Delaloge, S., Li, W., Tung, N., Armstrong, A., Wu, W., Goessl, C., Runswick, S., & Conte, P. (2017). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med*, *377*(6), 523-533. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706450>
- Rodriguez, P. C., Ernstoff, M. S., Hernandez, C., Atkins, M., Zabaleta, J., Sierra, R., & Ochoa, A. C. (2009). Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res*, *69*(4), 1553-1560. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1921>

- Roudnicky, F., Yoon, S. Y., Poghosyan, S., Schwager, S., Poyet, C., Vella, G., Bachmann, S. B., Karaman, S., Shin, J. W., Otto, V. I., & Detmar, M. (2018). Alternative transcription of a shorter, non-anti-angiogenic thrombospondin-2 variant in cancer-associated blood vessels. *Oncogene*, *37*(19), 2573-2585. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0129-z>
- Roulot, A., Héquet, D., Guinebretière, J. M., Vincent-Salomon, A., Lerebours, F., Dubot, C., & Rouzier, R. (2016). Tumoral heterogeneity of breast cancer. *Ann Biol Clin (Paris)*, *74*(6), 653-660. <https://doi.org/10.1684/abc.2016.1192>
- Sagiv, J. Y., Michaeli, J., Assi, S., Mishalian, I., Kisos, H., Levy, L., Damti, P., Lumbroso, D., Polyansky, L., Sionov, R. V., Ariel, A., Hovav, A. H., Henke, E., Fridlender, Z. G., & Granot, Z. (2015). Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep*, *10*(4), 562-573. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.039>
- Saito, T., Nishikawa, H., Wada, H., Nagano, Y., Sugiyama, D., Atarashi, K., Maeda, Y., Hamaguchi, M., Ohkura, N., Sato, E., Nagase, H., Nishimura, J., Yamamoto, H., Takiguchi, S., Tanoue, T., Suda, W., Morita, H., Hattori, M., Honda, K., Mori, M., Doki, Y., & Sakaguchi, S. (2016). Two FOXP3(+)/CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat Med*, *22*(6), 679-684. <https://doi.org/10.1038/nm.4086>
- Saura, C., Roda, D., Roselló, S., Oliveira, M., Macarulla, T., Pérez-Fidalgo, J. A., Morales-Barrera, R., Sanchis-García, J. M., Musib, L., Budha, N., Zhu, J., Nannini, M., Chan, W. Y., Sanabria Bohórquez, S. M., Meng, R. D., Lin, K., Yan, Y., Patel, P., Baselga, J., Taberner, J., & Cervantes, A. (2017). A First-in-Human Phase I Study of the ATP-Competitive AKT Inhibitor Ipatasertib Demonstrates Robust and Safe Targeting of AKT in Patients with Solid Tumors. *Cancer Discov*, *7*(1), 102-113. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0512>
- Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*, *30*(11), 1191-1212. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00480-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00480-4)
- Schiff, P. B., Fant, J., & Horwitz, S. B. (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, *277*(5698), 665-667. <https://doi.org/10.1038/277665a0>
- Schiff, P. B., & Horwitz, S. B. (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *77*(3), 1561-1565. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.3.1561>
- Schlecker, E., Stojanovic, A., Eisen, C., Quack, C., Falk, C. S., Umansky, V., & Cerwenka, A. (2012). Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. *J Immunol*, *189*(12), 5602-5611. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201018>
- Schmid, P., Abraham, J., Chan, S., Wheatley, D., Brunt, A. M., Nemsadze, G., Baird, R. D., Park, Y. H., Hall, P. S., Perren, T., Stein, R. C., Mangel, L., Ferrero, J. M., Phillips, M., Conibear, J., Cortes, J., Foxley, A., de Bruin, E. C., McEwen, R., Stetson, D., Dougherty, B., Sarker, S. J., Prendergast, A., McLaughlin-Callan, M., Burgess, M., Lawrence, C., Cartwright, H., Mousa, K., & Turner, N. C. (2020). Capivasertib Plus Paclitaxel Versus Placebo Plus Paclitaxel As First-Line Therapy for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: The PAKT Trial. *J Clin Oncol*, *38*(5), 423-433. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00368>
- Schmid, P., Cortes, J., Pusztai, L., McArthur, H., Kümmel, S., Bergh, J., Denkert, C., Park, Y. H., Hui, R., Harbeck, N., Takahashi, M., Foukakis, T., Fasching, P. A., Cardoso, F., Untch, M., Jia, L., Karantza, V., Zhao, J., Aktan, G., Dent, R., O'Shaughnessy, J., & Investigators, K.-. (2020). Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*, *382*(9), 810-821. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910549>
- Schmid, P., Rugo, H. S., Adams, S., Schneeweiss, A., Barrios, C. H., Iwata, H., Diéras, V., Henschel, V., Molinero, L., Chui, S. Y., Maiya, V., Husain, A., Winer, E. P., Loi, S., Emens, L. A., & Investigators, I. (2020). Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, *21*(1), 44-59. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30689-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30689-8)

- Schmielau, J., & Finn, O. J. (2001). Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res*, *61*(12), 4756-4760.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., & Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*, *393*(6684), 480-483. <https://doi.org/10.1038/31002>
- Scuderi, P., Nez, P. A., Duerr, M. L., Wong, B. J., & Valdez, C. M. (1991). Cathepsin-G and leukocyte elastase inactivate human tumor necrosis factor and lymphotoxin. *Cell Immunol*, *135*(2), 299-313. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(91\)90275-g](https://doi.org/10.1016/0008-8749(91)90275-g)
- Seignez, C., Martin, A., Rollet, C. E., Racœur, C., Scagliarini, A., Jeannin, J. F., Bettaieb, A., & Paul, C. (2014). Senescence of tumor cells induced by oxaliplatin increases the efficiency of a lipid A immunotherapy via the recruitment of neutrophils. *Oncotarget*, *5*(22), 11442-11451. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2556>
- Selvendiran, K., Bratasz, A., Tong, L., Ignarro, L. J., & Kuppusamy, P. (2008). NCX-4016, a nitro-derivative of aspirin, inhibits EGFR and STAT3 signaling and modulates Bcl-2 proteins in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells and xenografts. *Cell Cycle*, *7*(1), 81-88. <https://doi.org/10.4161/cc.7.1.5103>
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., & Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med*, *201*(5), 723-735. <https://doi.org/10.1084/jem.20041982>
- Sevko, A., Michels, T., Vrohings, M., Umansky, L., Beckhove, P., Kato, M., Shurin, G. V., Shurin, M. R., & Umansky, V. (2013). Antitumor effect of paclitaxel is mediated by inhibition of myeloid-derived suppressor cells and chronic inflammation in the spontaneous melanoma model. *J Immunol*, *190*(5), 2464-2471. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202781>
- Sha, Y., & Marshall, H. E. (2012). S-nitrosylation in the regulation of gene transcription. *Biochim Biophys Acta*, *1820*(6), 701-711. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.05.008>
- Shabani, F., Farasat, A., Mahdavi, M., & Gheibi, N. (2018). Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and cancer. *Inflamm Res*, *67*(10), 801-812. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1173-4>
- Shou, D., Wen, L., Song, Z., Yin, J., Sun, Q., & Gong, W. (2016). Suppressive role of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in the microenvironment of breast cancer and targeted immunotherapies. *Oncotarget*, *7*(39), 64505-64511. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11352>
- Sica, A., Guarneri, V., & Gennari, A. (2019). Myelopoiesis, metabolism and therapy: a crucial crossroads in cancer progression. *Cell Stress*, *3*(9), 284-294. <https://doi.org/10.15698/cst2019.09.197>
- Sica, A., Saccani, A., Bottazzi, B., Bernasconi, S., Allavena, P., Gaetano, B., Fei, F., LaRosa, G., Scotton, C., Balkwill, F., & Mantovani, A. (2000). Defective expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor CCR2 in macrophages associated with human ovarian carcinoma. *J Immunol*, *164*(2), 733-738. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.2.733>
- Siemens, D. R., Heaton, J. P., Adams, M. A., Kawakami, J., & Graham, C. H. (2009). Phase II study of nitric oxide donor for men with increasing prostate-specific antigen level after surgery or radiotherapy for prostate cancer. *Urology*, *74*(4), 878-883. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2009.03.004>
- Singal, P. K., & Iliskovic, N. (1998). Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med*, *339*(13), 900-905. <https://doi.org/10.1056/NEJM199809243391307>
- Singh, M., Ramos, I., Asafu-Adjei, D., Quispe-Tintaya, W., Chandra, D., Jahangir, A., Zang, X., Aggarwal, B. B., & Gravekamp, C. (2013). Curcumin improves the therapeutic efficacy of Listeria(at)-Mage-b vaccine in correlation with improved T-cell responses in blood of a triple-negative breast cancer model 4T1. *Cancer Med*, *2*(4), 571-582. <https://doi.org/10.1002/cam4.94>

- Sinha, P., Clements, V. K., Bunt, S. K., Albelda, S. M., & Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol*, *179*(2), 977-983. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.977>
- Solito, S., Falisi, E., Diaz-Montero, C. M., Doni, A., Pinton, L., Rosato, A., Francescato, S., Basso, G., Zanovello, P., Onicescu, G., Garrett-Mayer, E., Montero, A. J., Bronte, V., & Mandruzzato, S. (2011). A human promyelocytic-like population is responsible for the immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *Blood*, *118*(8), 2254-2265. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-325753>
- Songbo, M., Lang, H., Xinyong, C., Bin, X., Ping, Z., & Liang, S. (2019). Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Lett*, *307*, 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.02.013>
- Spigel, D. R., Chaft, J. E., Gettinger, S., Chao, B. H., Dirix, L., Schmid, P., Chow, L. Q. M., Hicks, R. J., Leon, L., Fredrickson, J., Kowanetz, M., Sandler, A., Funke, R., & Rizvi, N. A. (2018). FIR: Efficacy, Safety, and Biomarker Analysis of a Phase II Open-Label Study of Atezolizumab in PD-L1-Selected Patients With NSCLC. *J Thorac Oncol*, *13*(11), 1733-1742. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.05.004>
- Srikrishna, G. (2012). S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. *J Innate Immun*, *4*(1), 31-40. <https://doi.org/10.1159/000330095>
- Srivastava, M. K., Sinha, P., Clements, V. K., Rodriguez, P., & Ostrand-Rosenberg, S. (2010). Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res*, *70*(1), 68-77. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2587>
- Stamler, J. S. (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, *78*(6), 931-936. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90269-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90269-0)
- Stamler, J. S., Lamas, S., & Fang, F. C. (2001). Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*, *106*(6), 675-683. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00495-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00495-0)
- Steding, C. E., Wu, S. T., Zhang, Y., Jeng, M. H., Elzey, B. D., & Kao, C. (2011). The role of interleukin-12 on modulating myeloid-derived suppressor cells, increasing overall survival and reducing metastasis. *Immunology*, *133*(2), 221-238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03429.x>
- Su, M., Huang, C. X., & Dai, A. P. (2016). Immune Checkpoint Inhibitors: Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, *17*(3), 905-910. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.3.905>
- Suhail, Y., Cain, M. P., Vanaja, K., Kurywach, P. A., Levchenko, A., Kalluri, R., & Kshitiz. (2019). Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst*, *9*(2), 109-127. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.07.003>
- Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A. S., Kaiser, L. R., & Albelda, S. M. (2005). Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res*, *11*(18), 6713-6721. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0883>
- Switzer, C. H., Glynn, S. A., Cheng, R. Y., Ridnour, L. A., Green, J. E., Ambs, S., & Wink, D. A. (2012). S-nitrosylation of EGFR and Src activates an oncogenic signaling network in human basal-like breast cancer. *Mol Cancer Res*, *10*(9), 1203-1215. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0124>
- Switzer, C. H., Ridnour, L. A., Cheng, R., Heinecke, J., Burke, A., Glynn, S., Ambs, S., & Wink, D. A. (2012). S-Nitrosation Mediates Multiple Pathways That Lead to Tumor Progression in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer. *For Immunopathol Dis Therap*, *3*(2), 117-124. <https://doi.org/10.1615/ForumImmunDisTher.2012006108>
- Szuster-Ciesielska, A., Hryciuk-Umer, E., Stepulak, A., Kupisz, K., & Kandefers-Szerszeń, M. (2004). Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood. *Acta Oncol*, *43*(3), 252-258. <https://doi.org/10.1080/02841860410029708>
- Sørli, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish

- tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19), 10869-10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>
- Tadmor, T., Zhang, Y., Cho, H. M., Podack, E. R., & Rosenblatt, J. D. (2011). The absence of B lymphocytes reduces the number and function of T-regulatory cells and enhances the anti-tumor response in a murine tumor model. *Cancer Immunol Immunother*, 60(5), 609-619. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-0972-z>
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., & Sakaguchi, S. (1998). 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(12), 1969-1980. <https://doi.org/10.1093/intimm/10.12.1969>
- Takeshima, T., Chamoto, K., Wakita, D., Ohkuri, T., Togashi, Y., Shirato, H., Kitamura, H., & Nishimura, T. (2010). Local radiation therapy inhibits tumor growth through the generation of tumor-specific CTL: its potentiation by combination with Th1 cell therapy. *Cancer Res*, 70(7), 2697-2706. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2982>
- Talmadge, J. E., & Fidler, I. J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*, 70(14), 5649-5669. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040>
- Tang, C. H., Wei, W., & Liu, L. (2012). Regulation of DNA repair by S-nitrosylation. *Biochim Biophys Acta*, 1820(6), 730-735. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.04.014>
- Tang, H., Liang, Y., Anders, R. A., Taube, J. M., Qiu, X., Mulgaonkar, A., Liu, X., Harrington, S. M., Guo, J., Xin, Y., Xiong, Y., Nham, K., Silvers, W., Hao, G., Sun, X., Chen, M., Hannan, R., Qiao, J., Dong, H., Peng, H., & Fu, Y. X. (2018). PD-L1 on host cells is essential for PD-L1 blockade-mediated tumor regression. *J Clin Invest*, 128(2), 580-588. <https://doi.org/10.1172/JCI96061>
- Tang, Q., Xiong, W., Ke, X., Zhang, J., Xia, Y., & Liu, D. (2020). Mitochondria-associated protein LRPPRC exerts cardioprotective effects against doxorubicin-induced toxicity, potentially via inhibition of ROS accumulation. *Exp Ther Med*, 20(4), 3837-3845. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9111>
- Tang, Z., Bauer, J. A., Morrison, B., & Lindner, D. J. (2006). Nitrosylcobalamin promotes cell death via S nitrosylation of Apo2L/TRAIL receptor DR4. *Mol Cell Biol*, 26(15), 5588-5594. <https://doi.org/10.1128/MCB.00199-06>
- Tesei, A., Zoli, W., Fabbri, F., Leonetti, C., Rosetti, M., Bolla, M., Amadori, D., & Silvestrini, R. (2008). NCX 4040, an NO-donating acetylsalicylic acid derivative: efficacy and mechanisms of action in cancer cells. *Nitric Oxide*, 19(2), 225-236. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2008.04.007>
- Thomas, D. A., & Massagué, J. (2005). TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, 8(5), 369-380. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.10.012>
- Thomas, D. D., & Wink, D. A. (2017). NOS2 as an Emergent Player in Progression of Cancer. *Antioxid Redox Signal*, 26(17), 963-965. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6835>
- Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, J. A., & Sharpe, A. H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*, 3(5), 541-547. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90125-6](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90125-6)
- Tobin, R. P., Jordan, K. R., Robinson, W. A., Davis, D., Borges, V. F., Gonzalez, R., Lewis, K. D., & McCarter, M. D. (2018). Targeting myeloid-derived suppressor cells using all-trans retinoic acid in melanoma patients treated with Ipilimumab. *Int Immunopharmacol*, 63, 282-291. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.08.007>
- Tomić, S., Joksimović, B., Bekić, M., Vasiljević, M., Milanović, M., Čolić, M., & Vučević, D. (2019). Prostaglandin-E2 Potentiates the Suppressive Functions of Human Mononuclear Myeloid-Derived Suppressor Cells and Increases Their Capacity to Expand IL-10-Producing Regulatory T Cell Subsets. *Front Immunol*, 10, 475. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00475>
- Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Carvajal, R. D., Sosman, J. A., Atkins, M. B., Leming, P. D., Spigel, D. R., Antonia, S. J., Horn, L., Drake, C. G., Pardoll, D. M., Chen, L., Sharfman, W. H., Anders, R. A., Taube, J. M., McMiller,

- T. L., Xu, H., Korman, A. J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G. D., Gupta, A., Wigginton, J. M., & Sznol, M. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, 366(26), 2443-2454. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>
- Torre, D., Pugliese, A., & Speranza, F. (2002). Role of nitric oxide in HIV-1 infection: friend or foe? *Lancet Infect Dis*, 2(5), 273-280. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(02\)00262-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00262-1)
- Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W. H., Pagès, F., & Galon, J. (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res*, 71(4), 1263-1271. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2907>
- Treffers, L. W., Hiemstra, I. H., Kuijpers, T. W., van den Berg, T. K., & Matlung, H. L. (2016). Neutrophils in cancer. *Immunol Rev*, 273(1), 312-328. <https://doi.org/10.1111/imr.12444>
- Tsubouchi, Y., Mukai, S., Kawahito, Y., Yamada, R., Kohno, M., Inoue, K., & Sano, H. (2000). Meloxicam inhibits the growth of non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*, 20(5A), 2867-2872.
- Tu, S. P., Jin, H., Shi, J. D., Zhu, L. M., Suo, Y., Lu, G., Liu, A., Wang, T. C., & Yang, C. S. (2012). Curcumin induces the differentiation of myeloid-derived suppressor cells and inhibits their interaction with cancer cells and related tumor growth. *Cancer Prev Res (Phila)*, 5(2), 205-215. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0247>
- Turko, I. V., & Murad, F. (2002). Protein nitration in cardiovascular diseases. *Pharmacol Rev*, 54(4), 619-634. <https://doi.org/10.1124/pr.54.4.619>
- Tutt, A., Robson, M., Garber, J. E., Domchek, S. M., Audeh, M. W., Weitzel, J. N., Friedlander, M., Arun, B., Loman, N., Schmutzler, R. K., Wardley, A., Mitchell, G., Earl, H., Wickens, M., & Carmichael, J. (2010). Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*, 376(9737), 235-244. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60892-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60892-6)
- Veglia, F., Tyurin, V. A., Blasi, M., De Leo, A., Kossenkova, A. V., Donthireddy, L., To, T. K. J., Schug, Z., Basu, S., Wang, F., Ricciotti, E., DiRusso, C., Murphy, M. E., Vonderheide, R. H., Lieberman, P. M., Mulligan, C., Nam, B., Hockstein, N., Masters, G., Guarino, M., Lin, C., Nefedova, Y., Black, P., Kagan, V. E., & Gabrilovich, D. I. (2019). Fatty acid transport protein 2 reprograms neutrophils in cancer. *Nature*, 569(7754), 73-78. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1118-2>
- Veltman, J. D., Lambers, M. E., van Nimwegen, M., Hendriks, R. W., Hoogsteden, H. C., Aerts, J. G., & Hegmans, J. P. (2010). COX-2 inhibition improves immunotherapy and is associated with decreased numbers of myeloid-derived suppressor cells in mesothelioma. Celecoxib influences MDSC function. *BMC Cancer*, 10, 464. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-464>
- Verdeil, G., Lawrence, T., Schmitt-Verhulst, A. M., & Auphan-Anezin, N. (2019). Targeting STAT3 and STAT5 in Tumor-Associated Immune Cells to Improve Immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/cancers11121832>
- Verret, B., Cortes, J., Bachelot, T., Andre, F., & Arnedos, M. (2019). Efficacy of PI3K inhibitors in advanced breast cancer. *Ann Oncol*, 30 Suppl 10, x12-x20. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz381>
- Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*, 29, 235-271. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>
- Vickers, S. M., MacMillan-Crow, L. A., Green, M., Ellis, C., & Thompson, J. A. (1999). Association of increased immunostaining for inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine with fibroblast growth factor transformation in pancreatic cancer. *Arch Surg*, 134(3), 245-251. <https://doi.org/10.1001/archsurg.134.3.245>
- Vijayan, D., Young, A., Teng, M. W. L., & Smyth, M. J. (2017). Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nat Rev Cancer*, 17(12), 709-724. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.86>
- Vincent, J., Mignot, G., Chalmin, F., Ladoire, S., Bruchard, M., Chevriaux, A., Martin, F., Apetoh, L., Rébé, C., & Ghiringhelli, F. (2010). 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived



- suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res*, 70(8), 3052-3061. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3690>
- Vonderheide, R. H., LoRusso, P. M., Khalil, M., Gartner, E. M., Khaira, D., Soulieres, D., Dorazio, P., Trosko, J. A., Rüter, J., Mariani, G. L., Usari, T., & Domchek, S. M. (2010). Tremelimumab in combination with exemestane in patients with advanced breast cancer and treatment-associated modulation of inducible costimulator expression on patient T cells. *Clin Cancer Res*, 16(13), 3485-3494. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0505>
- Voorwerk, L., Slagter, M., Horlings, H. M., Sikorska, K., van de Vijver, K. K., de Maaker, M., Nederlof, I., Kluin, R. J. C., Warren, S., Ong, S., Wiersma, T. G., Russell, N. S., Lalezari, F., Schouten, P. C., Bakker, N. A. M., Ketelaars, S. L. C., Peters, D., Lange, C. A. H., van Werkhoven, E., van Tinteren, H., Mandjes, I. A. M., Kemper, I., Onderwater, S., Chalabi, M., Wilgenhof, S., Haanen, J. B. A. G., Salgado, R., de Visser, K. E., Sonke, G. S., Wessels, L. F. A., Linn, S. C., Schumacher, T. N., Blank, C. U., & Kok, M. (2019). Immune induction strategies in metastatic triple-negative breast cancer to enhance the sensitivity to PD-1 blockade: the TONIC trial. *Nat Med*, 25(6), 920-928. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0432-4>
- Voron, T., Colussi, O., Marcheteau, E., Pernot, S., Nizard, M., Pointet, A. L., Latreche, S., Bergaya, S., Benhamouda, N., Tanchot, C., Stockmann, C., Combe, P., Berger, A., Zinzindohoue, F., Yagita, H., Tartour, E., Taieb, J., & Terme, M. (2015). VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J Exp Med*, 212(2), 139-148. <https://doi.org/10.1084/jem.20140559>
- Vuk-Pavlović, S., Bulur, P. A., Lin, Y., Qin, R., Szumlanski, C. L., Zhao, X., & Dietz, A. B. (2010). Immunosuppressive CD14+HLA-DRIlow/- monocytes in prostate cancer. *Prostate*, 70(4), 443-455. <https://doi.org/10.1002/pros.21078>
- Waight, J. D., Netherby, C., Hensen, M. L., Miller, A., Hu, Q., Liu, S., Bogner, P. N., Farren, M. R., Lee, K. P., Liu, K., & Abrams, S. I. (2013). Myeloid-derived suppressor cell development is regulated by a STAT/IRF-8 axis. *J Clin Invest*, 123(10), 4464-4478. <https://doi.org/10.1172/JCI68189>
- Wang, D., Hu, X., Liu, C., Jia, Y., Bai, Y., Cai, C., Wang, J., Bai, L., Yang, R., Lin, C., Liu, Y. R., Li, S., Qiao, F., Yao, L., Chen, L., Ge, G., Jiang, H., Li, D., Li, L., Chen, J., Shao, Z. M., & Zeng, Y. A. (2019). Protein C receptor is a therapeutic stem cell target in a distinct group of breast cancers. *Cell Res*, 29(10), 832-845. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0225-9>
- Wang, K., Xu, J., Zhang, T., & Xue, D. (2016). Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer predict the response to chemotherapy and survival outcome: A meta-analysis. *Oncotarget*, 7(28), 44288-44298. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9988>
- Wang, L., Rubinstein, R., Lines, J. L., Wasiuk, A., Ahonen, C., Guo, Y., Lu, L. F., Gondek, D., Wang, Y., Fava, R. A., Fiser, A., Almo, S., & Noelle, R. J. (2011). VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. *J Exp Med*, 208(3), 577-592. <https://doi.org/10.1084/jem.20100619>
- Wang, Y., Yin, K., Tian, J., Xia, X., Ma, J., Tang, X., Xu, H., & Wang, S. (2019). Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote the Stemness of Colorectal Cancer Cells through Exosomal S100A9. *Adv Sci (Weinh)*, 6(18), 1901278. <https://doi.org/10.1002/adv.201901278>
- Wang, Y., Zhang, H., & He, Y. W. (2019). The Complement Receptors C3aR and C5aR Are a New Class of Immune Checkpoint Receptor in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, 10, 1574. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01574>
- Wang, Z. (2012). Protein S-nitrosylation and cancer. *Cancer Lett*, 320(2), 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.03.009>
- Wang, Z. (2017). ErbB Receptors and Cancer. *Methods Mol Biol*, 1652, 3-35. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7219-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7219-7_1)
- Wang, Z., Liu, Y., Zhang, Y., Shang, Y., & Gao, Q. (2016). MDSC-decreasing chemotherapy increases the efficacy of cytokine-induced killer cell immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma and pancreatic cancer. *Oncotarget*, 7(4), 4760-4769. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6734>
- Waterhouse, P., Penninger, J. M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K. P., Thompson, C. B., Griesser, H., & Mak, T. W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice

- deficient in Ctlα-4. *Science*, 270(5238), 985-988. <https://doi.org/10.1126/science.270.5238.985>
- Weber, R., Fleming, V., Hu, X., Nagibin, V., Groth, C., Altevogt, P., Utikal, J., & Umansky, V. (2018). Myeloid-Derived Suppressor Cells Hinder the Anti-Cancer Activity of Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol*, 9, 1310. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01310>
- Weide, B., Martens, A., Zelba, H., Stutz, C., Derhovanessian, E., Di Giacomo, A. M., Maio, M., Sucker, A., Schilling, B., Schadendorf, D., Büttner, P., Garbe, C., & Pawelec, G. (2014). Myeloid-derived suppressor cells predict survival of patients with advanced melanoma: comparison with regulatory T cells and NY-ESO-1- or melan-A-specific T cells. *Clin Cancer Res*, 20(6), 1601-1609. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2508>
- Weiss, J., Glode, A., Messersmith, W. A., & Diamond, J. (2019). Sacituzumab govitecan: breakthrough targeted therapy for triple-negative breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 19(8), 673-679. <https://doi.org/10.1080/14737140.2019.1654378>
- Wesolowski, R., Duggan, M. C., Stiff, A., Markowitz, J., Trikha, P., Levine, K. M., Schoenfeld, L., Abdel-Rasoul, M., Layman, R., Ramaswamy, B., Macrae, E. R., Lustberg, M. B., Reinbolt, R. E., Mrozek, E., Byrd, J. C., Caligiuri, M. A., Mace, T. A., & Carson, W. E. (2017). Circulating myeloid-derived suppressor cells increase in patients undergoing neo-adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 66(11), 1437-1447. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2038-3>
- Wink, D. A., Kasprzak, K. S., Maragos, C. M., Elespuru, R. K., Misra, M., Dunams, T. M., Cebula, T. A., Koch, W. H., Andrews, A. W., & Allen, J. S. (1991). DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science*, 254(5034), 1001-1003. <https://doi.org/10.1126/science.1948068>
- Wirsdörfer, F., de Leve, S., & Jendrossek, V. (2018). Combining Radiotherapy and Immunotherapy in Lung Cancer: Can We Expect Limitations Due to Altered Normal Tissue Toxicity? *Int J Mol Sci*, 20(1). <https://doi.org/10.3390/ijms20010024>
- Witsch, E., Sela, M., & Yarden, Y. (2010). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*, 25(2), 85-101. <https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2009>
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, 30, 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>
- Woo, E. Y., Chu, C. S., Goletz, T. J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S. C., Kaiser, L. R., & June, C. H. (2001). Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res*, 61(12), 4766-4772.
- Wright, W. E., Pereira-Smith, O. M., & Shay, J. W. (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 9(7), 3088-3092. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.7.3088>
- Wu, T., & Dai, Y. (2017). Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Lett*, 387, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.043>
- Xia, B., & Herbst, R. S. (2016). Immune checkpoint therapy for non-small-cell lung cancer: an update. *Immunotherapy*, 8(3), 279-298. <https://doi.org/10.2217/imt.15.123>
- Xiang, J., Hurchla, M. A., Fontana, F., Su, X., Amend, S. R., Esser, A. K., Douglas, G. J., Mudalagiriappa, C., Luker, K. E., Pluard, T., Ademuyiwa, F. O., Romagnoli, B., Tuffin, G., Chevalier, E., Luker, G. D., Bauer, M., Zimmermann, J., Aft, R. L., Dembowski, K., & Weilbaecher, K. N. (2015). CXCR4 Protein Epitope Mimetic Antagonist POL5551 Disrupts Metastasis and Enhances Chemotherapy Effect in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Cancer Ther*, 14(11), 2473-2485. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0252>
- Xin, H., Zhang, C., Herrmann, A., Du, Y., Figlin, R., & Yu, H. (2009). Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res*, 69(6), 2506-2513. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4323>
- Xu, C., Zhao, H., Chen, H., & Yao, Q. (2015). CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. *Drug Des Devel Ther*, 9, 4953-4964. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S84932>

- Xu, J., Escamilla, J., Mok, S., David, J., Priceman, S., West, B., Bollag, G., McBride, W., & Wu, L. (2013). CSF1R signaling blockade stanches tumor-infiltrating myeloid cells and improves the efficacy of radiotherapy in prostate cancer. *Cancer Res*, 73(9), 2782-2794. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3981>
- Yamane, H., & Paul, W. E. (2012). Memory CD4+ T cells: fate determination, positive feedback and plasticity. *Cell Mol Life Sci*, 69(10), 1577-1583. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0966-9>
- Yamane, H., & Paul, W. E. (2013). Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunol Rev*, 252(1), 12-23. <https://doi.org/10.1111/imr.12032>
- Yan, D., Adeshakin, A. O., Xu, M., Afolabi, L. O., Zhang, G., Chen, Y. H., & Wan, X. (2019). Lipid Metabolic Pathways Confer the Immunosuppressive Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor. *Front Immunol*, 10, 1399. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01399>
- Yang, G. Y., Taboada, S., & Liao, J. (2009). Induced nitric oxide synthase as a major player in the oncogenic transformation of inflamed tissue. *Methods Mol Biol*, 512, 119-156. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-530-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-530-9_8)
- Yang, Y., Li, C., Liu, T., Dai, X., & Bazhin, A. V. (2020). Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumors: From Mechanisms to Antigen Specificity and Microenvironmental Regulation. *Front Immunol*, 11, 1371. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01371>
- Yasinska, I. M., Kozhukhar, A. V., & Sumbayev, V. V. (2004). S-nitrosation of thioredoxin in the nitrogen monoxide/superoxide system activates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Arch Biochem Biophys*, 428(2), 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.06.004>
- Yasuda, H., Yamaya, M., Nakayama, K., Sasaki, T., Ebihara, S., Kanda, A., Asada, M., Inoue, D., Suzuki, T., Okazaki, T., Takahashi, H., Yoshida, M., Kaneta, T., Ishizawa, K., Yamanda, S., Tomita, N., Yamasaki, M., Kikuchi, A., Kubo, H., & Sasaki, H. (2006). Randomized phase II trial comparing nitroglycerin plus vinorelbine and cisplatin with vinorelbine and cisplatin alone in previously untreated stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 24(4), 688-694. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.0436>
- Yoshida, N., Kinugasa, T., Miyoshi, H., Sato, K., Yuge, K., Ohchi, T., Fujino, S., Shiraiwa, S., Katagiri, M., Akagi, Y., & Ohshima, K. (2016). A High RORγT/CD3 Ratio is a Strong Prognostic Factor for Postoperative Survival in Advanced Colorectal Cancer: Analysis of Helper T Cell Lymphocytes (Th1, Th2, Th17 and Regulatory T Cells). *Ann Surg Oncol*, 23(3), 919-927. <https://doi.org/10.1245/s10434-015-4923-3>
- Youn, J. I., Kumar, V., Collazo, M., Nefedova, Y., Condamine, T., Cheng, P., Villagra, A., Antonia, S., McCaffrey, J. C., Fishman, M., Sarnaik, A., Horna, P., Sotomayor, E., & Gibrilovich, D. I. (2013). Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nat Immunol*, 14(3), 211-220. <https://doi.org/10.1038/ni.2526>
- Yu, C. X., Li, S., & Whorton, A. R. (2005). Redox regulation of PTEN by S-nitrosothiols. *Mol Pharmacol*, 68(3), 847-854. <https://doi.org/10.1124/mol.104.010504>
- Yu, F., Shi, Y., Wang, J., Li, J., Fan, D., & Ai, W. (2013). Deficiency of Kruppel-like factor KLF4 in mammary tumor cells inhibits tumor growth and pulmonary metastasis and is accompanied by compromised recruitment of myeloid-derived suppressor cells. *Int J Cancer*, 133(12), 2872-2883. <https://doi.org/10.1002/ijc.28302>
- Yu, H., Yang, J., Jiao, S., Li, Y., Zhang, W., & Wang, J. (2014). T-box transcription factor 21 expression in breast cancer and its relationship with prognosis. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(10), 6906-6913.
- Yu, J., Du, W., Yan, F., Wang, Y., Li, H., Cao, S., Yu, W., Shen, C., Liu, J., & Ren, X. (2013). Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol*, 190(7), 3783-3797. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201449>
- Yu, W. D., Sun, G., Li, J., Xu, J., & Wang, X. (2019). Mechanisms and therapeutic potentials of cancer immunotherapy in combination with radiotherapy and/or chemotherapy. *Cancer Lett*, 452, 66-70. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.02.048>

- Yu, X., Harden, K., Gonzalez, L. C., Francesco, M., Chiang, E., Irving, B., Tom, I., Ivelja, S., Refino, C. J., Clark, H., Eaton, D., & Grogan, J. L. (2009). The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol*, *10*(1), 48-57. <https://doi.org/10.1038/ni.1674>
- Yu, X., Zheng, Y., Mao, R., Su, Z., & Zhang, J. (2019). BTLA/HVEM Signaling: Milestones in Research and Role in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Front Immunol*, *10*, 617. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00617>
- Yuan, S. J., Xu, Y. H., Wang, C., An, H. C., Xu, H. Z., Li, K., Komatsu, N., Zhao, L., & Chen, X. (2019). Doxorubicin-polyglycerol-nanodiamond conjugate is a cytostatic agent that evades chemoresistance and reverses cancer-induced immunosuppression in triple-negative breast cancer. *J Nanobiotechnology*, *17*(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0541-8>
- Zea, A. H., Rodriguez, P. C., Culotta, K. S., Hernandez, C. P., DeSalvo, J., Ochoa, J. B., Park, H. J., Zabaleta, J., & Ochoa, A. C. (2004). L-Arginine modulates CD3zeta expression and T cell function in activated human T lymphocytes. *Cell Immunol*, *232*(1-2), 21-31. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.01.004>
- Zhan, X., Huang, Y., & Qian, S. (2018). Protein Tyrosine Nitration in Lung Cancer: Current Research Status and Future Perspectives. *Curr Med Chem*, *25*(29), 3435-3454. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180221140745>
- Zhang, H., Kong, H., Zeng, X., Guo, L., Sun, X., & He, S. (2014). Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. *J Transl Med*, *12*, 125. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-125>
- Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M. N., Rubin, S. C., & Coukos, G. (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*, *348*(3), 203-213. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020177>
- Zhang, Q., Qin, J., Zhong, L., Gong, L., Zhang, B., Zhang, Y., & Gao, W. Q. (2015). CCL5-Mediated Th2 Immune Polarization Promotes Metastasis in Luminal Breast Cancer. *Cancer Res*, *75*(20), 4312-4321. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3590>
- Zhang, S., Wang, Z., Liu, W., Lei, R., Shan, J., Li, L., & Wang, X. (2017). Distinct prognostic values of S100 mRNA expression in breast cancer. *Sci Rep*, *7*, 39786. <https://doi.org/10.1038/srep39786>
- Zhang, S., Zhang, H., & Zhao, J. (2009). The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. *Biochem Biophys Res Commun*, *384*(4), 405-408. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.04.134>
- Zhao, X., Liu, J., Ge, S., Chen, C., Li, S., Wu, X., Feng, X., Wang, Y., & Cai, D. (2019). Saikosaponin A Inhibits Breast Cancer by Regulating Th1/Th2 Balance. *Front Pharmacol*, *10*, 624. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00624>
- Zhu, J., Powis de Tenbossche, C. G., Cané, S., Colau, D., van Baren, N., Lurquin, C., Schmitt-Verhulst, A. M., Liljeström, P., Uyttenhove, C., & Van den Eynde, B. J. (2017). Resistance to cancer immunotherapy mediated by apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes. *Nat Commun*, *8*(1), 1404. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00784-1>
- Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol*, *28*, 445-489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>
- Zitvogel, L. (2014). *Immunothérapie des cancers au troisième millénaire*. EDP Sciences.
- Zou, W., Wolchok, J. D., & Chen, L. (2016). PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med*, *8*(328), 328rv324. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad7118>

# Publications scientifiques

## VIII. Publications scientifiques

### Publications scientifiques en co-première autrice

- **Mabrouk N\***, Ghione S\*, Laurens V, Plenchette S, Bettaieb A, Paul C. Senescence and Cancer: Role of Nitric Oxide (NO) in SASP. 2020 May 2;12(5):1145. doi: 10.3390/cancers12051145. **Cancers**.

- Ghione S\*, **Mabrouk N\***, Paul C, Bettaieb A, Plenchette S. Protein Kinase Inhibitor-Based Cancer Therapies: Considering the Potential of Nitric Oxide (NO) to Improve Cancer Treatment. 2020 Feb 113855. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113855. **Biochemical Pharmacology**.

### Présentations orales ou poster à des congrès

- **Mabrouk N**, Racœur C, Dondaine L, Shan J, Ghiringhelli F, Chouchane L, Bettaieb A, Paul C. Antitumor effect of GTN +/- doxorubicin in triple negative breast cancer: involvement of the immune system.

\*Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon-France / June 2019 (**Orale**).

\*6th ImmunoTherapy Of Cancer conference (ITOC6), Vienna-Austria / April 2019 (**Orale**).

\*20th Scientific Day of the Ligue contre le cancer, Strasbourg-France / November 2019 (**Poster**).

\*11th Eastern Cancéropôle Forum, Reims-France / November 2018 (**Orale**).

\*Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon-France / June 2018 (**Poster**).

\*18th Scientific Day of the Ligue contre le cancer, Strasbourg-France / November 2017 (**Poster**).

### Contribution à d'autres projets de thèse ayant fait l'objet de publications scientifiques

- Flores O, Velic D, **Mabrouk N**, ... Paul C, Goze C, Roussakis C, Bodio E. Rapid synthesis and anti-proliferative properties of polyazamacrocyclic-based bi- and tetragold(I) phosphine dithiocarbamate complexes. 2019 Sep 2;20(17):2255-2261. doi: 10.1002/cbic.201900227. **ChemBioChem**.

- Pliquett J, Dubois A, Racœur C, **Mabrouk N**, ... Paul C\*, Bodio E\*, Goze C\*. WAZABYs or Water-Soluble aza-BODIPY dyes: a promising family of optical imaging probes for in vivo molecular imaging. 2019 Sep 2;20(17):2255-2261. doi: 10.1002/cbic.201900227. **Bioconjugate chemistry**.

- Martin A, Seigneux C, Racœur C, Isambert N, **Mabrouk N**, ... Paul C. Tumor-derived granzyme B-expressing neutrophils acquire antitumor potential after lipid A treatment. 2018 Jun 19;9(47):28364-28378. doi: 10.18632. **Oncotarget**.

1. Revue 1 : Senescence and Cancer: Role of Nitric Oxide (NO) in SASP

Review

# Senescence and Cancer: Role of Nitric Oxide (NO) in SASP

Nesrine Mabrouk <sup>1,2,†</sup>, Silvia Ghione <sup>1,2,†</sup>, Véronique Laurens <sup>1,2</sup>, Stéphanie Plenchette <sup>1,2</sup>, Ali Bettaieb <sup>1,2</sup> and Catherine Paul <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Immunology and Immunotherapy of Cancers, EPHE, PSL Research University, 75000 Paris, France; nesrine\_mabrouk16@yahoo.fr (N.M.); silvi.ghio50@gmail.com (S.G.); veronique.laurens-calin01@u-bourgogne.fr (V.L.); Stéphanie.Plenchette-Colas@u-bourgogne.fr (S.P.); ali.bettaieb@u-bourgogne.fr (A.B.)

<sup>2</sup> Laboratory of Immunology and Immunotherapy of Cancers (LIIC), EA7269, University of Burgundy Franche-Comté, 21000 Dijon, France

\* Correspondence: catherine.paul@u-bourgogne.fr or catherine.paul@ephe.psl.eu; Tel.: +33-3-80-39-33-51

† These authors contributed equally to this work.

Received: 26 March 2020; Accepted: 30 April 2020; Published: 2 May 2020



**Abstract:** Cellular senescence is a cell state involved in both physiological and pathological processes such as age-related diseases and cancer. While the mechanism of senescence is now well known, its role in tumorigenesis still remains very controversial. The positive and negative effects of senescence on tumorigenesis depend largely on the diversity of the senescent phenotypes and, more precisely, on the senescence-associated secretory phenotype (SASP). In this review, we discuss the modulatory effect of nitric oxide (NO) in SASP and the possible benefits of the use of NO donors or iNOS inducers in combination with senotherapy in cancer treatment.

**Keywords:** SASP; nitric oxide; cancer treatments

## 1. Senescence and Cancer

Senescence is an important biological mechanism that plays a crucial role in many physiological processes, such as development and wound healing, and also in various age-related pathologies including cancer [1–3]. Indeed, there is a strong relationship between aging and cancer. In both cases, the mechanisms involve an accumulation of cellular damage over time. However, other processes seem to be in opposition, such as hyperproliferation and the increase in cell survival in cancer or the decreased function and fitness in aging [4]. However, many hallmarks of aging are found in cancer, and senescence is one of them [5]. Senescence was first described in 1961 by Hayflick and Moorhead after observing that human diploid cells have a replicative limit in culture [6]. This process, named replicative senescence, is the first form of senescence described and involves the shortening of telomeres [7]. The loss of telomeres is recognized as DNA damage and triggers a DNA-damage response (DDR), involving DNA damage kinases such as ataxia-telangiectasia-mutated protein (ATM), ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) and checkpoint kinases 1 and 2 (CHK1 and CHK2), which in turn activate cell cycle proteins such as p53 [8]. DDR is also induced by other external damaging factors such as ionizing radiation and chemotherapeutic drugs [9]. Other forms of non-telomeric senescence, called premature senescence, have been described such as stress-induced senescence, which involves reactive oxygen species (ROS), and oncogene-induced senescence (OIS). OIS was firstly described by Serrano et al. (1997) in a model of human fibroblasts expressing an oncogenic form of RAS<sup>G12V</sup> [10]. Since then, more than 50 oncogenes have been described to induce senescence once activated [11]. In most OIS cases, the senescent phenotype is invariably preceded by



hyperproliferation, aberrant replication and activation of the DDR [12,13]. PICS, PTEN-loss induced cellular senescence [14] is also a form of premature senescence, occurring independently of DDR or hyper-replication [15]. The loss of two other tumor suppressors, neurofibromin 1 (NF1) and the von Hippel-Lindau factor, has also been described to induce senescence in the same manner as for PICS [9].

The senescent phenotype is often characterized by the modulation of different signaling pathways and a series of cellular events such as the activation of the DDR; cell cycle arrest via the activation of the p53/p21<sup>CIP1</sup> and p16<sup>INK4A</sup>/Retinoblastoma (Rb) pathways; the induction of a senescence-associated secretory phenotype (SASP); resistance against apoptosis; the induction of endoplasmic reticulum stress; and the modulation of metabolism [16]. Since all these biological aspects are not specific to the senescence process, multiple markers should be considered to accurately define the senescent phenotype. The most commonly used assay is based on the histochemical detection of Senescence-Associated beta-galactosidase (SA-β-gal) [17]. Other canonical senescence markers include senescence inducers such as CDK inhibitors (p16, p21, p15 and p27) and the phosphorylated forms of p53 and Rb, which are proteins related to senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) and the expression of extracellular factors associated with SASP [9]. In vitro morphological changes are also a common feature of senescence. Indeed, senescent cells are often characterized by structural cell changes such as enlarged morphology, the modification of plasma membrane composition, the accumulation of lysosomes and mitochondria, and nuclear changes [16].

Cellular senescence was primarily described as a tumor suppressor mechanism [14,18–20]. Indeed, first of all, senescence can inhibit the growth of cancer cells and then induce SASP, which in turn induces the recruitment of immune cells. However, the aging of tumor microenvironment and genetic and epigenetic mutations induced by tumor progression cooperate to bypass senescence [4]. Moreover, the long-term implications of senescent cells—and more particularly, the paracrine effect of SASP—potentially favor tumor development [21–24]. Recently, in a very comprehensive review, Faget et al. (2019) highlighted the existence of different SASPs in immunosupportive or immunosuppressive scenarios [25]. To counteract the pro-tumorigenic effects of SASP, new therapies have also been developed to dampen SASP's proinflammatory effects (senomorphic) or to specifically clear senescent cells (senolytics) [26]. These senotherapies selectively kill senescent cells or stimulate their elimination by the immune system [27]. These approaches include chemical inhibitors of the nuclear factor-kappa B (NF-κB), Janus kinase (JAK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways and free radical scavengers [28–30].

Nitric oxide (NO) might be included in these therapies because a lot of pathways are regulated by post-translational modifications—such as cysteine S-nitrosylation (Cys-NO), tyrosine nitration (Tyr-NO) or even metal nitrosylation [31]—and because NO is also strongly implicated in immunomodulation [32]. Here, we describe the involvement of NO in senescence via (1) the modulation of SASP pathways, (2) the regulation of apoptosis via death receptor pathway modulation, (3) immunomodulation and (4) the modulation of the senolytic effects. Altogether, these data pave the way towards the development of new therapeutic strategies based on NO.

## 2. SASP in Cancer: A Double-Edged Sword

It is now well established that senescent cells are able to secrete a pool of molecules that define the SASP. This condition mediates the paracrine activity of senescent cells, which results in tissue microenvironment modulation [25]. Many SASP components are actually identified, such as growth factors, cytokines, chemokines, proteases and extracellular matrix (ECM) components [26,33]. SASP soluble factors include, among others, interleukin 6 (IL-6), IL1α, IL-10, IL-13, IL-15, chemokines such as CC motif ligand 2 (CCL2), CCL5, CCL8 and C-X-C motif 1 (CXCL1), CXCL2, CXCL5, CXCL12, granulocytes macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), macrophage colony stimulating factor 1 (CSF1), and cytokines such as interferon γ (IFNγ), tumor necrosis factor α (TNFα), insulin-like growth factors (IGFs) and transforming growth factor β (TGFβ) [33,34]. In addition to soluble factors, senescent cells can secrete proteases, such as matrix metalloproteinases (MMPs) and serine proteases,

and regulators of plasminogen activation pathways, which induce ECM modifications. In fact, it is well established that ECM changes (e.g., rigidity loss) increase the metastatic properties of cancer cells and provide optimal conditions for migration. These changes in the ECM are associated with poor prognosis in cancer patients [35]. For this reason, these molecules are involved in carcinogenesis and cell migration. MMP family members involved in SASP are stromelysin-1 and -2 (also known as MMP-3 and -10) and collagenase 1 (MMP-1), while plasminogen activators include urokinase (uPA), tissue-type plasminogen activators (tPA), uPA receptor (uPAR) and inhibitors of these serine proteases (PAI-1 and 2) [24,36]. The SASP factors are summarized in Table 1.

**Table 1.** The senescence-associated secretory phenotype (SASP) factors (based on [24,34]).

Interleukins and Other Inflammatory Molecules	IL-1; IL-1 $\beta$ ; IL-6; IL-7; IL-8; IL-13; IL-15; TGF $\beta$ ; GM-CSF; G-CSF; CSF-1; IFN- $\gamma$ ; BLC; MIF
Chemokines and Growth Factors/Regulators	CXCL1; CXCL2; CXCL5; CXCL12; CCL2; CCL5; CCL8; CCL13; MIP-1 $\alpha$ ; MIP-3 $\alpha$ ; HCC-4; eotaxin/eotaxin-3; TECK; ENA-78; Amphiregulin; epiregulin; heregulin; EGF; bFGF; HGF; KGF (FGF7); VEGF; angiogenin; SCF
Receptors and Ligands	ICAM-1/3; OPG; TNF $\alpha$ ; sTNFR1; sTNFR2; TRAIL-R3; Fas; uPAR; SGP130; EGF-R
Proteases and Extracellular Matrix Proteins	MMP-1/3/10/12/13/14; TIMP-1/2; PAI-1/2; tPA; uPA; cathepsin B
Non-Protein Molecules and Insoluble Factors	Nitric oxide; ROS; PGE2; fibronectin; collagens; laminin

The SASP molecules can modulate stromal and immune cells, with a different role in cancer development. In fact, SASP is considered as a double-edged sword because it can lead to either anti-tumorigenic or a pro-tumorigenic effects in a context-dependent manner. Indeed, several SASP factors induce the clearance of senescent pre-neoplastic cells, preserving tissue homeostasis. During the early stage of senescence transformation, these cells are recognized and eliminated by the immune system recruited by SASP, to prevent the malignant transformation [37]. For example, a high level of TGF $\beta$  secreted by macrophages in the tumor microenvironment maintains cellular senescence and decreases tumor growth in aggressive B cell lymphoma [38]. Alessio et al. (2019) recently showed that the induction of acute SASP (A-SASP) in mesenchymal stem cells (MSCs) decreases immortalized prostate cancer cell PNT2 proliferation in vitro [39].

Nevertheless, long-term exposure to SASP factors or the aging of the tumor microenvironment increases inflammation and tumor progression [4,25]. Therefore, senescent cells can also contribute to tumorigenesis via SASP [40]. The accumulation of cytoplasmic DNA in senescent cells is able to activate the GMP-AMP synthase (cGAS)-stimulator of interferon genes (STING) pathway, causing chronic inflammation. cGAS binds to dsDNA, and this condition causes conformational changes in its catalytic center, inducing the catalysis of cyclic GMP-AMP (cGAMP). This second messenger stimulates STING, an endoplasmic reticulum-located protein, which induces the activation and nuclear translocation of interferon-regulatory factor 3 (IRF3) and NF- $\kappa$ B. This causes the expression of, for example, type I IFN, a crucial player in inflammation [41]. STING activation is associated with inflammatory diseases, and the link between inflammation and cancer is well recognized [42]. For example, several studies reported the importance of the STING signaling pathway in 7,12dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene (DMBA)-induced carcinogenesis. This compound can drive the development of skin tumors by DNA damage, which induces STING-dependent pro-inflammatory cytokine production [43,44]. Furthermore, a recent study has shown that STING-deficient mice are resistant to DMBA-induced skin tumors [45]. Another study showed that STING activation induces obesity-associated hepatocellular carcinoma (HCC) in mice [46]. The over-activation of the cGAS-STING signaling pathway was also described in lung cancer [47].

Although chemotherapy is beneficial to treat cancer, these compounds can promote SASP secretion via increased DNA damage, leading to inflammation and subsequent cancer progression [48]. It is actually known that several anti-cancer drugs, such as docetaxel, bleomycin, cyclophosphamide,

doxorubicin, vincristine, etoposide, 5-fluorouracil (5-FU), cisplatin and also ionizing radiation can mediate tumor-induced senescence [34,49]. This mechanism is principally mediated by DNA damage and inflammation in the tumor microenvironment. In this context, Tato-Costa et al. (2016) showed that the SASP induced by 5-fluorouracil (5-FU) and doxorubicin causes epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) *in vitro* and in clinical samples from patients with rectal cancer [49]. Another important factor included in SASP is NO [50]. Senescent cells are able to secrete NO, via nitric oxide synthase (NOS). In the SASP microenvironment, fibroblasts are major NO producers, enhancing cancer cell proliferation. It is well known that NO is involved in monocyte differentiation, and these cells, under certain conditions, can induce cancer progression [51,52]. Moreover, NO is also involved in the modulation of a large number of signaling pathways [53].

### 3. Role of NO in the Induction of the SASP

According to previous reports, several mechanisms are involved in the regulation of SASP factors. Considering the large number of signaling molecules involved in SASP secretion, the present review is focused on the most crucial ones. The transcription factor NF- $\kappa$ B plays an important role in SASP. It can be activated by several SASP inducers such as toll like receptor 2 (TLR2), TNF $\alpha$ , reactive oxygen species (ROS) and genotoxic agents [54,55]. The activation of NF- $\kappa$ B involves I $\kappa$ B phosphorylation by I $\kappa$ B kinase (IKK), which leads to its degradation by the proteasome, enabling the active NF- $\kappa$ B transcription factor (p65/p50) to translocate into the nucleus and thereby induce the expression of target genes such as those which code for IL-6, IL-8 and CXCL1 [56–58]. Other senescence activators such as CXCR2 ligands IL-8 and GRO/Gro1 are also upregulated in cells undergoing senescence following the activation of mitogen-activated kinases [59]. Recently, Loo et al. (2017) reported that the expression of cyclooxygenase 2 (COX-2), a rate limiting enzyme involved in prostaglandin biosynthesis, is increased in senescent hepatic stellate cells and triggers the overproduction of the SASP prostaglandin E2 (PGE2) via PGE2 receptor EP4, limiting anti-tumor immunity in obesity-associated HCC [60].

The identification of signals that can promote senescence in a given tumor type may provide new therapeutic targets for cancer. Several drugs (see below) modulate some of these signals, including NO.

NO, a highly reactive free radical, has pleiotropic functions in multiple biological processes, such as neurotransmission, vasodilatation and macrophage-mediated immunity. NO is synthesized from L-arginine by NOS in the presence of oxygen. Endothelial NOS (eNOS) and neuronal NOS (nNOS), two NOSs whose activities are dependent on calcium levels, produce low amounts of NO, while the third NOS is inducible (iNOS) and independent of calcium levels. iNOS is activated by IL-1 $\beta$ , Toll Like 4 receptor agonists (TLR4), interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) and oxidative stress and produces higher amounts of NO [61]. As a very unstable molecule, NO reacts mainly with the superoxide anion to generate peroxynitrite, a compound with high oxidative potential [62].

NO is also released from pharmacological agents. There are direct NO donors—such as sodium nitroprusside, molsidomine or diethylamino-NONOate—and donors that require metabolism such as the classic nitrovasodilators and organic nitrate and nitrite esters—including nitroglycerin (also called glyceryl trinitrate or GTN), isosorbide dinitrate, isosorbide 5-mononitrate and nicorandil—that have been used in the treatment of cardiovascular diseases [63–65].

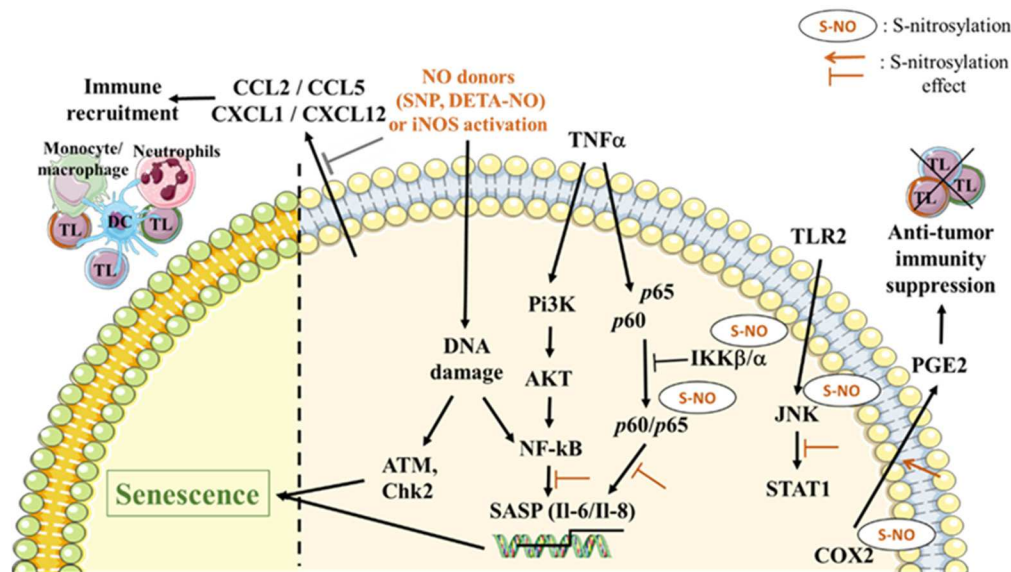
In cancer, NO plays a role in promoting as well as inhibiting tumors [62,66,67]. This dichotomy seems to be related to its concentration, its location and its targets [68]. A few clinical studies have shown that NO donors could mediate anti-tumor activities used alone or in combination with standard therapies [69–71]. Indeed, in the first phase II clinical trial, the use of nitroglycerin combined with vinorelbine and cisplatin improved the overall response and time to disease progression in patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC) [69]. In a second phase II study, the addition of nitroglycerin to cisplatin and vinorelbine and concurrent radiotherapy in patients with advanced NSCLC had an acceptable toxicity profile and the possibility of adding nitroglycerin to chemotherapy and radiotherapy was supported [70]. In another phase II study conducted in patients with prostate

cancer, nitroglycerin increased the prostate-specific antigen (PSA) doubling time and the safety of the drug was confirmed [71].

NO-induced survival or cell death seems to be related to its biochemical action on proteins by causing post-translational modifications [31]. S-nitrosylation, the transfer of NO to a free-SH group of a specific cysteine residue, is now considered to be essential for regulating the function of many proteins and signaling pathways including those involved in cancer regulation [72]. It modulates protein structure, function, expression, location or interaction with other protein partners [73]. The ambivalent nature of NO in cancer is dictated by the impact of S-nitrosylation on proteins involved in signaling pathways that trigger both survival and cell death. Thus, NO and its derivatives, such as peroxynitrites, are able to cause direct or indirect DNA damage. Direct damage includes DNA base deamination, adduct formation and single strand breaks in the DNA. Indirect damage is due to the interactions of NO reactive species with other molecules such as amines, thiols or lipids [74]. Furthermore, NO and its derivatives modulate SASP factors. Recently, the NO donors sodium nitroprusside dihydrate (SNP) and diethylenetriamine/nitric oxide adduct (DETA/NO) have been reported to cause DNA double-strand breaks (DSBs), initiating cellular senescence programs in numerous cell lines of different origins (cervical and lung cancers, fibroblastic cell lines). This effect is associated with the activation of the protein kinase ATM, an upstream activator of the DDR; the activation of NF- $\kappa$ B; and an increase in SASP factors like IL-6 and IL-8 [75]. NO can also regulate other pathways involved in the secretion of SASP factors such as NF- $\kappa$ B and the mitogen activated protein kinase c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathways [76]. Indeed, Reynaert et al. (2004) have reported that NO triggers the S-nitrosylation of the inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase subunit  $\beta$  (IKK $\beta$ , a regulator of the classical NF- $\kappa$ B pathway activation) at cysteine residue 179 and consequently results in NF- $\kappa$ B inhibition [77]. In addition, NO can S-nitrosylate both the p50 and p65 NF- $\kappa$ B subunits at cysteine residues 62 and 38, respectively, reducing their DNA binding and inhibiting target gene transcription [78,79]. Moreover, the tyrosine nitration of I $\kappa$ B $\alpha$  at tyrosine 181 by endogenous NO promotes NF- $\kappa$ B signaling through the dissociation of I $\kappa$ B $\alpha$  from NF- $\kappa$ B [80]. The endogenous production of NO or NO donors such S-nitro-N-acetyl-penicillamine (SNAP) can suppress JNK activation via S-nitrosylation at cysteine 116 [81]. However, the relationship of NO-induced senescence with its ability to target NF- $\kappa$ B and JNK has never been reported so far (Figure 1).

NO also targets some cytokines that belong to SASP factors. For instance, the NO-aspirin derivative NCX-4016 (100 mM) inhibits the release of numerous cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-8, IL-12, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ ) in monocytes isolated from human PBMCs of healthy donors after challenge with the bacterial endotoxin, lipopolysaccharides (LPS) (1  $\mu$ g/mL). This effect is due to the inhibition of IL-1 $\beta$  Converting Enzyme, also named caspase-1, required for intracellular processing/maturation of IL-1 $\beta$  and IL-18 [82]. These data may suggest that in the context of senescence, the NO-mediated inhibition of these pro-inflammatory cytokines could alleviate cancer development, invasion, and metastasis [83]. Furthermore, NO also targets another SASP factor, the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), an important target in cancer therapy and a key kinase involved in the IL-6 signaling pathway. Indeed, STAT3 is regulated by the S-nitrosylation of the cysteine residue at position 259, which inhibits STAT3 phosphorylation, its downstream activation and affects IL-6-mediated cell proliferation [84]. As mentioned before, COX2 expression is significantly increased in senescent cells. The overexpression of PGE2 (the major COX-2 product), which functions as a key SASP factor in the tumor microenvironment, suppresses the anti-tumor immunity and progression [60]. A previous study has established that NO can modulate COX2 activity. Indeed, Kim et al. (2005) showed that iNOS specifically binds to the enzyme COX2, induces its S-nitrosylation and enhances its catalytic activity [85]. NO can also modulate immune cell recruitment through its action on chemokines, another group of SASP factors. Indeed, Giustizieri et al. (2002) have reported that the NO donor, S-nitrosoglutathione (GSNO), diminished, in a dose-dependent manner, both the mRNA and protein levels of CCL5 (RANTES) and CXCL1 (GRO $\alpha$ ) in keratinocytes cultured from healthy or psoriatic patients [86]. These results were confirmed in another cellular model by Kashiwagi et al. (2002),

which showed that CCL5 and CXCL1 are up-regulated in renal cortex of rats chronically treated with an NO synthase inhibitor, and induced the recruitment of monocytes/macrophages [87] (Figure 1).



**Figure 1.** Impact of nitric oxide (NO) in senescence-mediated signaling pathways. NO plays important roles in different senescence-associated secretory phenotype (SASP) signaling pathways. Exogenous and endogenous NO can cause DNA damage that can lead to protein kinase ataxia-telangiectasia-mutated protein (ATM) and Chk2 activation, or NF-κB activation and interleukin 6 (IL-6)/IL-8 gene transcription. All these changes can induce the initiation of cellular senescence programs. NO is also able to induce direct modifications in NF-κB, either by S-nitrosylating both p60/p65 NF-κB subunits and leading to SASP gene transcription inhibition, or by S-nitrosylating the NF-κB kinase inhibitor subunit α (IKKα), which results in NF-κB inhibition. S-nitrosylation can also affect the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by leading to the inhibition of its activation. Moreover, cyclooxygenase 2 (COX2), a prostaglandin E2 (PGE2) secretion inducer, is also an NO target. The S-nitrosylation of COX2 stimulates its activity and induces anti-tumor immunity suppression. Another group of SASP factors altered by NO are chemokines such as CCL2, CCL5, CXCL1 and CXCL12, which can transcriptionally and translationally be decreased in response to NO donors, thus reducing immune cell recruitment.

#### 4. NO Involvement in Expression/Activation of Death Receptors and Death Ligands

The tumor necrosis factor (TNF) ligand family members TNFα, Fas ligand (FasL) and Tumor-necrosis-factor related apoptosis ligand (TRAIL) are major immunoregulatory cytokines of the tumor microenvironment, also found to be important SASP components (Table 1) [24]. These cytokines exert paradoxical functions, either by sustaining tumor growth and chemoresistance or by killing tumor cells, in the tumor microenvironment in a context-dependent manner [88]. One anti-tumor strategy would consist of switching the roles of TNFα, FasL and TRAIL from their pro-apoptotic functions to favor tumor cell death. A growing number of studies indicate that NO can regulate the signaling pathways driven by TNFα, FasL and TRAIL at many different levels [89,90]. Several studies have indicated that NO may exert dual effects in cancer, that can lead, on one hand, to enhanced tumor growth and progression (genotoxicity, apoptosis resistance, angiogenesis, invasion and metastasis) and on the other hand, to tumoricidal effects (cytostatic and/or cytotoxic effects on tumor cells) [91,92]. The biological impact of NO relies on various aspects (e.g., the NO concentration, tumor redox microenvironment and duration of NO exposure). Thus, NO donor-based therapies are currently under investigation to further sustain the tumoricidal effect of NO.

Several reports have demonstrated the role of NO-mediated sensitization of cancer cells to apoptosis in many ways [88]. Thus, NO-based therapies could represent a new potential strategy to

reduce the threshold of cancer cell resistance. Various NO donors are under investigation to understand the molecular mechanisms that underly their modes of action. It is becoming even more evident that the post-translational modifications of selective proteins by NO exert an important regulatory control, either positive or negative, over various signaling pathways engaged by TNF ligands and their receptors [88,93]. The cellular response at least relies on the relative threshold of NO production (either endogenous or from NO-releasing drugs), cellular context and severity of oxidative stress. If the biological outcome of the NO-induced S-nitrosylation of Fas [94], DR4 [95] and TNFR1 [96] results in cell death induction, the molecular mechanisms that control this process have not been fully unraveled yet. Importantly, the NO donor GTN can mediate the S-nitrosylation of Fas at cysteine 304, which consequently leads to its aggregation into lipid rafts to stimulate downstream signaling and cancer cell death [94]. In agreement, the S-nitrosylation of the transcriptional repressor Ying Yang 1 (YY1) inhibits its DNA-binding capacity to the silencer region of Fas promoter and then up-regulates *FAS* gene expression and consequently sensitizes cells to apoptosis [97,98].

The S-nitrosylation of TNFR1 by the NO donor NONOate has also been described in hepatoma cells; however, the exact targeted cysteine residue is unknown [96]. As previously described, the classical NF- $\kappa$ B pathway activated by the TNF $\alpha$ /TNFR1 system is controlled by the S-nitrosylation and nitration of specific target proteins at different levels of the molecular pathway. More recently, the S-nitrosylation of cIAP1 (a positive regulator of the NF- $\kappa$ B signaling pathway), induced by the NO donor GTN (particularly at cysteine 571), appeared as a critical cornerstone for switching the cancer cell fate from TNF $\alpha$ /TNFR1-mediated cell survival (through the activation of the classical NF- $\kappa$ B cascade) to TNF $\alpha$ /TNFR1-mediated cell death [90].

To date, the regulatory role of NO in the TRAIL/TRAIL receptors (TRAILR) system is less documented. Only DR4 was reported to undergo S-nitrosylation and, furthermore, by a specific NO donor (Nitrosylcobalamin), particularly at cysteine 336, and consequently foster cancer cell apoptosis [95]. Accordingly, NO disrupts the transcriptional repressor activity of YY1 not only on *FAS* but also on *DR5*, up-regulates its expression and sensitizes cancer cells to TRAIL-induced apoptosis [99].

Several crucial factors of apoptosis involved in the TNF signaling pathways, such as caspases, Bcl-2 family proteins or FLIP, can undergo post-translational modifications by NO that would impact cell fate [88,93]. Although SASP components include NO, the S-nitrosylation of Fas, DR4 and TNFR1 was demonstrated exclusively via the NO released by NO donors.

Interestingly, beside their dichotomous responses in cancer, TNF ligands, particularly TNF $\alpha$  and FasL, can lead to the process of senescence. Indeed, cancer cells' senescent phenotype can arise in response to TNF $\alpha$ /TNF receptor 1 (TNFR1) through the activation of the p16<sup>INK4A</sup>/Rb pathway [100]. The senescent phenotype can also occur in response to FasL/Fas in a context-dependent manner, particularly in microsatellite instability-high type colon tumors. Mechanistically, Fas-induced senescence was caused by a chronic DNA damage response via caspase-activated DNase resulting in p53 activation and p21 expression [101].

Whether the SASP could modulate the TNF ligand systems via NO, either in an autocrine or paracrine manner, remains to be demonstrated.

## 5. Role of NO in the SASP-Immunomodulatory Effect

Because senescent cells remain viable and exhibit the SASP phenotype with a wide spectrum of diverse physiological functions, their existence in the tumor mass can have an ambivalent impact, from tumor regression to promotion. SASP cytokines act on the recruitment and activation states of immune cells. They can cause the tumor infiltration of immunosuppressive cells like macrophages and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), thus promoting tumor growth. Conversely, they can also induce the tumor infiltration of natural killer cells (NK) and effector T lymphocytes and thus have anti-tumor properties [102].

In recent years, NO has emerged as an important immunomodulatory agent in the tumor microenvironment [32,103]. In situ, different sources of endogenous NO can be considered. Indeed, NO can

be produced by various types of cell expressing iNOS and eNOS. Moreover, NO, as well as ROS, can also derive from senescent cells as non-macromolecular components of the SASP [24] (Table 1). It has been demonstrated that the tumor microenvironment has all the conditions for iNOS expression and NO production, which is important for the maintenance and progression of an aggressive tumor phenotype in breast cancer [104]. iNOS has an immunosuppressive role within the tumor microenvironment via its actions on MDSCs as well as via the loss of the effector function of cytotoxic T lymphocytes (CTLs). Furthermore, two studies have shown that two NO-releasing drugs—NO-aspirin and NO-aspirin derivative (AT38)—induced, in numerous types of cancer, a feedback inhibition of iNOS in MDSCs [105,106]. Such effects result in the decreased MDSC-induced nitration of T-cell receptors, a massive infiltration of the tumor by T-cells and an enhanced efficacy of DNA cancer vaccination [105,106]. Indeed, NO from iNOS-expressing tumor cells disturbs the polarization and directional secretion of cytotoxic granules in the immune synapse of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) [107]. Nitration by iNOS-derived NO is also involved in the polarization of tumor-associated macrophages. NO leads to the suppression of the M1 macrophage signature gene activation and induces a pro-tumorigenic environment [108].

Among the SASP chemokine data for nitration, CCL2 and CXCL12 have been reported. These chemokines interact with the G-protein coupled receptors CCR2 and CXCR4, respectively, and bind to glycosaminoglycans (GAGs) present on the surface of endothelial cells and in the extracellular matrix. CCL2, also known as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), greatly contributes to the recruitment of monocytes, memory T cells and dendritic cells into sites of inflammation and tumors. It has been shown that peroxynitrite-treated CCL2 lost its ability to recruit CD8<sup>+</sup> T cells, but the recruitment of myeloid-derived suppressor cells was unaltered [106]. Nitrated CCL2 has a reduced affinity to its receptor CCR2, which may explain its failure to induce the chemotaxis of CD8<sup>+</sup> T cells expressing low levels of the CCR2 but the retention of its ability to induce the migration of myeloid cells expressing high levels of CCR2 [109]. CXCL12, also known as stroma cell-derived factor-1 (SDF-1), represents the single natural ligand for the chemokine receptor CXCR4 and induces the activation and migration of most leucocytes. The nitration of tyrosine 7 in CXCL12 hampers the chemokine's ability to induce lymphocyte chemotaxis (Figure 1). This nitration of CXCL12 does not affect its ability to bind to the CXCR4 receptor but does impair its ability to signal through this receptor. If nitrated CXCL12 binds to GAGs with a similar affinity as wild type CXCL12, nitrated CCL2 has a reduced ability to bind GAGs compared to wild type CCL2, and therefore could limit further leukocyte chemotaxis. When nitration reduces receptor activation capacity without affecting receptor affinity, this influences the receptor's signaling in situations where many chemokines can bind the same receptor [110].

NO from MDSCs has been described to suppress T lymphocyte proliferation via the suppression of STAT5 phosphorylation [111]. However, as we have underlined above, the immunosuppressive effect of MDSCs can be constrained by NO-releasing drugs [105,106]. NO is also involved in STAT3 phosphorylation through src homology protein tyrosine phosphatase 2 (SHP2) nitration, known as a negative regulator of STAT3 phosphorylation [112]. This study was conducted in a mouse model of ulcerative colitis, and the impact of NO on STAT3 phosphorylation was investigated in LPS-activated macrophages but not in a tumor context or in T lymphocytes in whose activation STAT3 plays a key role.

SASP is also involved in immune resistance mechanisms, since high levels of IFN $\gamma$  drive the expression of the programmed death ligand 1 (PD-L1), one of the targets of immune checkpoint inhibitor therapy (ICT). In tumors, high expression of the transcription factor YY1 modulates PD-L1 expression. Treatment with NO donors results in the inhibition of PD-L1 expression via the S-nitrosylation of YY1 [113]. By a nitroproteomic approach, authors uncover a potential mechanism for the ICT where a key protein for T cell activation is nitrated and inactivated by MDSCs. Indeed, lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK), an initiating tyrosine kinase in the T cell receptor signaling cascade, is nitrated at tyrosine 394 by MDSCs [114]. After ICT, high expression of iNOS is observed in intratumoral myeloid cells and is dependent on IFN $\gamma$  as evidenced using high dimensional profiling [115]. Thus, IFN $\gamma$  drives the polarization of newly recruited monocytes to become iNOS-positive macrophages. This remodeling by ICT is also correlated with an increase in activated T cells and a decrease in Tregs.

Therefore, combining ICT with reactive nitrogen species reducing agents could represent treatment strategies for ICT-resistant cancers.

Growing literature suggests that the induction of senescence in the immune compartment is also a mechanism used by the immune system to regulate the immune response. Human Tregs induce senescence in responder T cells by the regulation of STAT1/STAT3 signaling [116]. Moreover, the autologous infusion of tumor antigen specific CD4<sup>+</sup> Th1 lymphocyte can promote senescence in pancreatic tumor cells by releasing SASP factors such as IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ . Such cytokine-induced senescence strictly requires STAT1 and TNFR1 signaling pathways, themselves affected by S-nitrosylation [100].

Since NO is present in the tumor microenvironment associated with senescent cells, it seems important to precisely determine the nitration or S-nitrosylation state of molecules detected in SASP or involved in SASP signaling.

Altogether, several studies put forward arguments to show the immunosuppressive effect of NO. In most cases, these arguments are based on the immunosuppressive effect of endogenous NO produced, in small amounts, by NOSs expressed in immune cells, particularly in MDSCs. On the other hand, NO donors generating high amounts of NO can reduce this immunosuppression. Such effects may be due to the ability of these donors to induce a feedback inhibition of iNOS, a key mechanism of MDSC-mediated immunosuppression. However, few clinical trials have tested the anti-tumor potential of the agonist TLR4, known to induce the production of iNOS and NO [117,118].

## 6. Senolytic Drugs and NO

As discussed in the “senescence and cancer” part, senescence can play an anti- or a pro-tumorigenic role in cancer. In fact, senescent cells correspond to cells that have irreversibly lost their capability to divide but that are very resistant to apoptotic stimuli [119]. We can distinguish six Senescent-Cell Anti-Apoptotic Pathways (SCAPs): BCL-2/BCL-XL, the PI3K/AKT/ceramide metabolic network, MDM2/p53/p21/serpin elements, Ephirins/dependence receptors/tyrosine kinases, the hypoxia inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ) pathway, and the heat shock protein 90 (HSP-90)-dependent pathway [27]. It seems as though the inhibition of these different pathways could induce apoptosis preferentially in senescent cells, which thus could delay age-associated pathologies [119]. Molecules used to induce senescent cell removal are called senolytics. To this group belong dasatinib and quercetin, BCL-2 family inhibitors, Forkhead box O 4 (FOXO4) inhibitors and others such as nicotinamide riboside, danazol, fisetin, piperlongumine and heat shock protein 90 (HSP90) inhibitors [34]. Thus far, many researchers view senolytics as a second wave of adjuvant tumor therapy, following chemotherapy or radiotherapy [120]. At this stage, links also exist between NO and senolytic drugs as described below.

### 6.1. Dasatinib/Quercetin

Dasatinib is a second-generation tyrosine kinase inhibitor that targets several kinases including breakpoint cluster region–protein Abelson (Bcr-Abl), c-Kit, and platelet-derived growth factor receptor A (PDGFRA) and B but also Src kinase family members. It is commonly used in the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients [121,122]. Quercetin, instead, is a polyphenol compound that can be found in food like nuts, teas, vegetables and herbs and which is highlighted for its cytotoxic effects in several types of cancer without harming healthy cells [123]. Many modifications can be induced by these two senolytic drugs of NO levels. Indeed, dasatinib can induce an increase in plasma NO in pulmonary artery and smooth muscle cells [124]. Additionally, Hu et al. (2018) recently found that Src inhibition by dasatinib increases iNOS, a pro-inflammatory macrophage marker, in both intestinal and bone marrow-derived macrophages [125]. Conversely, Cruz et al. (2016) reported that dasatinib is able to reduce lung inflammation and fibrosis by promoting the polarization of macrophages from the M1 to M2 phenotype. This effect is due to the ability of dasatinib to reduce iNOS expression specifically in silicotic macrophages [126]. Concerning quercetin, all studies demonstrated that this senolytic drug induces a downregulation of iNOS expression, thus inhibiting nitric oxide production in vivo and in vitro (Table 2) [127–133].



**Table 2.** Senolytic-induced nitric oxide (NO) modulations.

Senolytic Drugs	NO Changes	Model	References
Dasatinib	Increased NO	Pulmonary artery endothelial cells and smooth muscle cells	[124]
	Increase iNOS expression	Intestinal and bone marrow-derived macrophages	[125]
	Decrease iNOS expression	Silicotic macrophages	[126]
Quercetin	Inhibition of iNOS		[127]
	Inhibition of mRNA iNOS	Human hepatocyte-derived cell line	[128]
	Inhibition of NO production and iNOS expression	Livers of CCl4-treated mice	[129]
		In vitro (rat hepatocyte)	[130]
		In vitro and in vivo (RAW 264.7 macrophages, primary peritoneal macrophages and Balb/c mice)	[131]
		Chronic cadmium nephrotoxicity in rats	[132]
Lung adenocarcinoma cell lines	[133]		
Hsp90 inhibitor	Reduction of NO production	Endothelial cells	[134]
	Blocked VEGF-induced increase in eNOS activity	Endothelial cells	[135]

### 6.2. Bcl-2 Inhibitors

The Bcl2 family is composed of a set of proteins that play an important role in promoting (Bax, Bak, Bid and Bim) but also in inhibiting (Bcl-2, Bcl-xL, and Bcl-W) apoptosis. Thus, the overexpression of anti-apoptotic members such as Bcl-2 or the downregulation or mutation of pro-apoptotic ones may be the cause of acquired resistance to apoptosis and cancer development [136]. Targeting apoptotic inhibitors represents, then, an efficient and promising cancer treatment. Post-translational modifications induced by NO on Bcl-2 have been reported. Indeed, Wright et al. (2016) revealed that Bcl-2 can be S-nitrosylated with NO donor DPTA-NONOate, thus inducing resistance to autophagy initiation in malignantly transformed lung cells [137].

### 6.3. Hsp90 Inhibitors

Hsp90 is a chaperone protein that assists the regulation, the folding and the stabilization/degradation of multiple proteins involved in multiple signaling pathways [138]. Proteins involved in tumor growth (EGFR, HER2, BRAF, Akt, etc.) can also be stabilized by this chaperone protein, leading to cancer development [139]. Hsp90 inhibitors are thus highlighted as anti-cancer drugs. In 1998, Garcia-Cardena et al. reported that Hsp90 can interact with eNOS and enhance its activity to induce NO production [140]. This activation seems to be induced by Hsp90 and Akt [134]. Indeed, it has been demonstrated that the Hsp90-dependent phosphorylation of eNOS at serine 1177 (human eNOS) or 1179 (bovine eNOS) is a key post-translational modification in the initiation of eNOS activation and NO synthesis [141]. The inhibition of Hsp90 by Geldanamycin [134] or taxotere [135] induced a marked reduction in eNOS activity (Table 2). eNOS can also be responsible for post-translational modifications of Hsp90 and further inhibiting eNOS activation. Martínez-Ruiz et al. (2005) were the first to determine that human Hsp90 can be S-nitrosylated at cysteine 597 in endothelial cells, which inhibits its ATPase activity in vitro [142] and in vivo [143].

In order to improve anti-cancer treatments, new combination therapies could be tested to successively induce the therapy-induced senescence (TIS) and the subsequent elimination of senescent cells by the immune system (senotherapy). Indeed, Xue et al. (2007) have shown in a p53 rescue

experiment that innate immune cells such as macrophages, neutrophils and NK cells are involved in senescent cell removal [144]. Adaptive immune cells such as the Th1 subclass of CD4<sup>+</sup> cells are also involved in immune-mediated clearance in a model of OIS in murine hepatocytes [145].

More recently, the combination of senescence-inducing chemotherapy (oxaliplatin or cisplatin) with a TLR4 agonist, the lipid A OM-174, has demonstrated strong anti-tumor efficacy in a model of advanced colon carcinoma [146]. The anti-tumor efficacy of this Lipid A has previously been demonstrated in several models of tumors [147–149] and was dependent on cytokine secretion (IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ ), iNOS activation and tumor-associated neutrophil (TAN) reprogramming into anti-tumorigenic N1 [149,150]. Moreover, the safety and tolerance at biologically active concentrations of the lipid A compound have been demonstrated in a phase I clinical trial in patients with cancers of different origins [117]. However, in our animal model with advanced colon carcinoma, lipid A—when used alone (as well as with platinum drugs)—failed to induce tumor regression, while pretreatment with oxaliplatin or cisplatin followed by lipid A injections induced a large regression of colorectal tumors [146]. The anti-tumor effect of this combination is correlated with a sequential induction of (1) cancer cell senescence and the recruitment of pro-tumorigenic TAN (N2), induced by platinum derivative drugs; and (2) apoptosis and N1 TAN recruitment triggered by lipid A.

## 7. Conclusions

In the fight against cancer, the search for new therapeutic combinations remains a major challenge. Senescence and, more particularly, SASP are major targets of these treatments. Indeed, many treatments currently used in anti-cancer therapies induce senescence, which is called therapy-induced senescence (TIS). These treatments include docetaxel, bleomycin, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, etoposide and oxaliplatin [48,146] but also ionizing radiation [34]. However, senescence and, more particularly, SASP have an early anti-tumorigenic effect whereas in the long term, they will have a pro-tumorigenic role via their autocrine and paracrine actions [151]. In order to avoid the negative side effects of SASP after TIS, a new type of therapy called senotherapy has emerged to either counteract these SASP effects or to specifically eliminate senescent cells. The first strategy consists of counteracting the pro-tumorigenic effects of SASP. This can be achieved with the use of telomerase inhibitors, the therapeutic modulation of the cell cycle, p53 and myc targeting, the use of immunotherapy that targets MDSCs, and the reprogramming of SASP [34]. In this review, we highlighted NO as an innovative approach to modulate SASP effects. Even though NO has been described to induce the senescence of tumor cells [75], it also mainly modulates the expression of SASP factors, as well as other senomorphic agents [34], by regulating numerous signaling pathways such as NF- $\kappa$ B and STAT3 [84,93]. The second therapeutic strategy consists of inducing senescence and subsequently clearing the senescent cells either specifically, by inducing their apoptosis, or by activating the immune system. The use of NO donors as senotherapy seems to be a promising solution since they are described to potentiate the apoptosis induced by death ligands such as FasL, TNF $\alpha$  and TRAIL. In addition, several clinical trials have shown the advantage of using an NO donor such as GTN in combination with TIS agents such as vincristine, cisplatin and radiotherapy in the treatment of non-small cell lung cancer [69,71]. NO, through its immunomodulatory potential, can also be used to eliminate senescent cells. Thus, the combination of TIS agents such as oxaliplatin and cisplatin with an immunomodulatory agent such as lipid A has significant anti-tumor efficacy in an advanced cancer model [146]. Overall, the recent clinical trials that involved either TLR4 agonists [117,118] or NO donors [69–71] suggest that these therapies, used alone or in combination with TIS, might be beneficial to treat cancer. These results prompt us to reconsider the commonly accepted pro-tumorigenic effect of NO based on its production by immunosuppressive MDSCs. Further studies will be needed to better understand the pathophysiological conditions that determine whether NO will tip the balance to tumor progression or cancer cure.

**Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** The authors acknowledge the financial support from Région Bourgogne, La Ligue Contre le Cancer (Conférence de coordination Interrégionale Est) and Qatar Foundation, but also acknowledge Olivier Burgy for manuscript editing.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Davaapil, H.; Brockes, J.P.; Yun, M.H. Conserved and novel functions of programmed cellular senescence during vertebrate development. *Development* **2017**, *144*, 106–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Lee, J.S. Cellular senescence, aging, and age-related disease: Special issue of BMB Reports in 2019. *BMB Rep.* **2019**, *52*, 1–2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Cerella, C.; Grandjetté, C.; Dicato, M.; Diederich, M. Roles of Apoptosis and Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Curr. Drug Targets* **2016**, *17*, 405–415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Fane, M.; Weeraratna, A.T. How the ageing microenvironment influences tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **2020**, *20*, 89–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Aunan, J.R.; Cho, W.C.; Søreide, K. The Biology of Aging and Cancer: A Brief Overview of Shared and Divergent Molecular Hallmarks. *Aging Dis.* **2017**, *8*, 628–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Hayflick, L.; Moorhead, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **1961**, *25*, 585–621. [[CrossRef](#)]
7. Harley, C.B.; Futcher, A.B.; Greider, C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **1990**, *345*, 458–460. [[CrossRef](#)]
8. Campisi, J.; d’Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 729–740. [[CrossRef](#)]
9. Muñoz-Espín, D.; Serrano, M. Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 482–496. [[CrossRef](#)]
10. Serrano, M.; Lin, A.W.; McCurrach, M.E.; Beach, D.; Lowe, S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **1997**, *88*, 593–602. [[CrossRef](#)]
11. Gorgoulis, V.G.; Halazonetis, T.D. Oncogene-induced senescence: The bright and dark side of the response. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2010**, *22*, 816–827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Di Micco, R.; Fumagalli, M.; Cicalese, A.; Piccinin, S.; Gasparini, P.; Luise, C.; Schurra, C.; Garre, M.; Nuciforo, P.G.; Bensimon, A.; et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **2006**, *444*, 638–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bartkova, J.; Rezaei, N.; Liontos, M.; Karakaidos, P.; Kletsas, D.; Issaeva, N.; Vassiliou, L.V.; Kolettas, E.; Niforou, K.; Zoumpourlis, V.C.; et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **2006**, *444*, 633–637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Chen, Z.; Trotman, L.C.; Shaffer, D.; Lin, H.K.; Dotan, Z.A.; Niki, M.; Koutcher, J.A.; Scher, H.I.; Ludwig, T.; Gerald, W.; et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **2005**, *436*, 725–730. [[CrossRef](#)]
15. Alimonti, A.; Nardella, C.; Chen, Z.; Clohessy, J.G.; Carracedo, A.; Trotman, L.C.; Cheng, K.; Varmeh, S.; Kozma, S.C.; Thomas, G.; et al. A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 681–693. [[CrossRef](#)]
16. Hernandez-Segura, A.; Nehme, J.; Demaria, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* **2018**, *28*, 436–453. [[CrossRef](#)]
17. Dimri, G.P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E.E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 9363–9367. [[CrossRef](#)]
18. Michaloglou, C.; Vredeveld, L.C.; Soengas, M.S.; Denoyelle, C.; Kuilman, T.; van der Horst, C.M.; Majoor, D.M.; Shay, J.W.; Mooi, W.J.; Peepers, D.S. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **2005**, *436*, 720–724. [[CrossRef](#)]
19. Braig, M.; Lee, S.; Loddenkemper, C.; Rudolph, C.; Peters, A.H.; Schlegelberger, B.; Stein, H.; Dörken, B.; Jenuwein, T.; Schmitt, C.A. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **2005**, *436*, 660–665. [[CrossRef](#)]

20. Collado, M.; Gil, J.; Efeyan, A.; Guerra, C.; Schuhmacher, A.J.; Barradas, M.; Benguría, A.; Zaballos, A.; Flores, J.M.; Barbacid, M.; et al. Tumour biology: Senescence in premalignant tumours. *Nature* **2005**, *436*, 642. [[CrossRef](#)]
21. Krtolica, A.; Parrinello, S.; Lockett, S.; Desprez, P.Y.; Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 12072–12077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Milanovic, M.; Fan, D.N.Y.; Belenki, D.; Däbritz, J.H.M.; Zhao, Z.; Yu, Y.; Dörr, J.R.; Dimitrova, L.; Lenze, D.; Monteiro Barbosa, I.A.; et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* **2018**, *553*, 96–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Acosta, J.C.; Banito, A.; Wuestefeld, T.; Georgilis, A.; Janich, P.; Morton, J.P.; Athineos, D.; Kang, T.W.; Lasitschka, F.; Andrulis, M.; et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 978–990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Coppé, J.P.; Desprez, P.Y.; Krtolica, A.; Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: The dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.* **2010**, *5*, 99–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Faget, D.V.; Ren, Q.; Stewart, S.A. Unmasking senescence: Context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19*, 439–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sun, Y.; Coppé, J.P.; Lam, E.W. Cellular Senescence: The Sought or the Unwanted? *Trends Mol. Med.* **2018**, *24*, 871–885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sikora, E.; Bielak-Zmijewska, A.; Mosieniak, G. Targeting normal and cancer senescent cells as a strategy of senotherapy. *Ageing Res. Rev.* **2019**, *55*, 100941. [[CrossRef](#)]
28. Laberge, R.M.; Sun, Y.; Orjalo, A.V.; Patil, C.K.; Freund, A.; Zhou, L.; Curran, S.C.; Davalos, A.R.; Wilson-Edell, K.A.; Liu, S.; et al. mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 1049–1061. [[CrossRef](#)]
29. Herranz, N.; Gallage, S.; Mellone, M.; Wuestefeld, T.; Klotz, S.; Hanley, C.J.; Raguz, S.; Acosta, J.C.; Innes, A.J.; Banito, A.; et al. Erratum: mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 1370. [[CrossRef](#)]
30. Fuhrmann-Stroissnigg, H.; Ling, Y.Y.; Zhao, J.; McGowan, S.J.; Zhu, Y.; Brooks, R.W.; Grassi, D.; Gregg, S.Q.; Stripay, J.L.; Dorronsoro, A.; et al. Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 422. [[CrossRef](#)]
31. Leon, L.; Jeannin, J.F.; Beltaieb, A. Post-translational modifications induced by nitric oxide (NO): Implication in cancer cells apoptosis. *Nitric Oxide* **2008**, *19*, 77–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bogdan, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. *Trends Immunol.* **2015**, *36*, 161–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Tchkonja, T.; Zhu, Y.; van Deursen, J.; Campisi, J.; Kirkland, J.L. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: Therapeutic opportunities. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 966–972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Calcinotto, A.; Kohli, J.; Zagato, E.; Pellegrini, L.; Demaria, M.; Alimonti, A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 1047–1078. [[CrossRef](#)]
35. Kaur, A.; Ecker, B.L.; Douglass, S.M.; Kugel, C.H.; Webster, M.R.; Almeida, F.V.; Somasundaram, R.; Hayden, J.; Ban, E.; Ahmadzadeh, H.; et al. Remodeling of the Collagen Matrix in Aging Skin Promotes Melanoma Metastasis and Affects Immune Cell Motility. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 64–81. [[CrossRef](#)]
36. Lopes-Paciencia, S.; Saint-Germain, E.; Rowell, M.C.; Ruiz, A.F.; Kalegari, P.; Ferbeyre, G. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine* **2019**, *117*, 15–22. [[CrossRef](#)]
37. Zeng, S.; Shen, W.H.; Liu, L. Senescence and Cancer. *Cancer Transl. Med.* **2018**, *4*, 70–74. [[CrossRef](#)]
38. Reimann, M.; Lee, S.; Loddenkemper, C.; Dörr, J.R.; Tabor, V.; Aichele, P.; Stein, H.; Dörken, B.; Jenuwein, T.; Schmitt, C.A. Tumor stroma-derived TGF-beta limits myc-driven lymphomagenesis via Suv39h1-dependent senescence. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 262–272. [[CrossRef](#)]
39. Alessio, N.; Aprile, D.; Squillaro, T.; Di Bernardo, G.; Finicelli, M.; Melone, M.A.; Peluso, G.; Galderisi, U. The senescence-associated secretory phenotype (SASP) from mesenchymal stromal cells impairs growth of immortalized prostate cells but has no effect on metastatic prostatic cancer cells. *Ageing (Albany N.Y.)* **2019**, *11*, 5817–5828. [[CrossRef](#)]
40. Loo, T.M.; Miyata, K.; Tanaka, Y.; Takahashi, A. Cellular senescence and senescence-associated secretory phenotype via the cGAS-STING signaling pathway in cancer. *Cancer Sci.* **2020**, *111*, 304–311. [[CrossRef](#)]

41. Glück, S.; Ablasser, A. Innate immunosensing of DNA in cellular senescence. *Curr. Opin. Immunol.* **2019**, *56*, 31–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Barber, G.N. STING: Infection, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 760–770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Salcedo, R.; Cataisson, C.; Hasan, U.; Yuspa, S.H.; Trinchieri, G. MyD88 and its divergent toll in carcinogenesis. *Trends Immunol.* **2013**, *34*, 379–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Swann, J.B.; Vesely, M.D.; Silva, A.; Sharkey, J.; Akira, S.; Schreiber, R.D.; Smyth, M.J. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 652–656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ahn, J.; Xia, T.; Konno, H.; Konno, K.; Ruiz, P.; Barber, G.N. Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Takahashi, A.; Loo, T.M.; Okada, R.; Kamachi, F.; Watanabe, Y.; Wakita, M.; Watanabe, S.; Kawamoto, S.; Miyata, K.; Barber, G.N.; et al. Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kitajima, S.; Ivanova, E.; Guo, S.; Yoshida, R.; Campisi, M.; Sundararaman, S.K.; Tange, S.; Mitsuishi, Y.; Thai, T.C.; Masuda, S.; et al. Suppression of STING Associated with LKB1 Loss in KRAS-Driven Lung Cancer. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 34–45. [[CrossRef](#)]
48. Ewald, J.A.; Desotelle, J.A.; Wilding, G.; Jarrard, D.F. Therapy-induced senescence in cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2010**, *102*, 1536–1546. [[CrossRef](#)]
49. Tato-Costa, J.; Casimiro, S.; Pacheco, T.; Pires, R.; Fernandes, A.; Alho, I.; Pereira, P.; Costa, P.; Castelo, H.B.; Ferreira, J.; et al. Therapy-Induced Cellular Senescence Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Increases Invasiveness in Rectal Cancer. *Clin. Colorectal. Cancer* **2016**, *15*, 170–178.e3. [[CrossRef](#)]
50. Sato, I.; Morita, I.; Kaji, K.; Ikeda, M.; Nagao, M.; Murota, S. Reduction of nitric oxide producing activity associated with in vitro aging in cultured human umbilical vein endothelial cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *195*, 1070–1076. [[CrossRef](#)]
51. MacMicking, J.; Xie, Q.W.; Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **1997**, *15*, 323–350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Cassetta, L.; Pollard, J.W. Targeting macrophages: Therapeutic approaches in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 887–904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Bettaieb, A.; Plenchette, S.; Paul, C.; Laurens, V.; Romagny, S.; Jeannin, J.F. S-nitrosylation of cancer cells. In *Nitric Oxide and Cancer: Pathogenesis and Therapy*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 97–109.
54. Hari, P.; Millar, F.R.; Tarrats, N.; Birch, J.; Quintanilla, A.; Rink, C.J.; Fernández-Duran, I.; Muir, M.; Finch, A.J.; Brunton, V.G.; et al. The innate immune sensor Toll-like receptor 2 controls the senescence-associated secretory phenotype. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaaw0254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Salminen, A.; Kauppinen, A.; Kaarniranta, K. Emerging role of NF- $\kappa$ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Signal.* **2012**, *24*, 835–845. [[CrossRef](#)]
56. Wajapeyee, N.; Serra, R.W.; Zhu, X.; Mahalingam, M.; Green, M.R. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* **2008**, *132*, 363–374. [[CrossRef](#)]
57. Kuilman, T.; Michaloglou, C.; Vredeveld, L.C.; Douma, S.; van Doorn, R.; Desmet, C.J.; Aarden, L.A.; Mooi, W.J.; Peeper, D.S. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **2008**, *133*, 1019–1031. [[CrossRef](#)]
58. Acosta, J.C.; O’Loughlen, A.; Banito, A.; Guijarro, M.V.; Augert, A.; Raguz, S.; Fumagalli, M.; Da Costa, M.; Brown, C.; Popov, N.; et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **2008**, *133*, 1006–1018. [[CrossRef](#)]
59. Odagiri, N.; Matsubara, T.; Higuchi, M.; Takada, S.; Urushima, H.; Sato-Matsubara, M.; Teranishi, Y.; Yoshizato, K.; Kawada, N.; Ikeda, K. Involvement of ERK1/2 activation in the gene expression of senescence-associated secretory factors in human hepatic stellate cells. *Mol. Cell Biochem.* **2019**, *455*, 7–19. [[CrossRef](#)]
60. Loo, T.M.; Kamachi, F.; Watanabe, Y.; Yoshimoto, S.; Kanda, H.; Arai, Y.; Nakajima-Takagi, Y.; Iwama, A.; Koga, T.; Sugimoto, Y.; et al. Gut Microbiota Promotes Obesity-Associated Liver Cancer through PGE. *Cancer Discov.* **2017**, *7*, 522–538. [[CrossRef](#)]

61. Mishra, D.; Patel, V.; Banerjee, D. Nitric Oxide and S-Nitrosylation in Cancers: Emphasis on Breast Cancer. *Breast. Cancer (Auckl.)* **2020**, *14*, 1178223419882688. [[CrossRef](#)]
62. Kamm, A.; Przychodzen, P.; Kuban-Jankowska, A.; Jacewicz, D.; Dabrowska, A.M.; Nussberger, S.; Wozniak, M.; Gorska-Ponikowska, M. Nitric oxide and its derivatives in the cancer battlefield. *Nitric Oxide* **2019**, *93*, 102–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Gruetter, C.A.; Barry, B.K.; McNamara, D.B.; Gruetter, D.Y.; Kadowitz, P.J.; Ignarro, L. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *J. Cyclic Nucleotide Res.* **1979**, *5*, 211–224. [[PubMed](#)]
64. Gruetter, C.A.; Barry, B.K.; McNamara, D.B.; Kadowitz, P.J.; Ignarro, L.J. Coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by cigarette smoke, N'-nitrosonornicotine and nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1980**, *214*, 9–15. [[PubMed](#)]
65. Gruetter, C.A.; Gruetter, D.Y.; Lyon, J.E.; Kadowitz, P.J.; Ignarro, L.J. Relationship between cyclic guanosine 3':5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: Effects of methylene blue and methemoglobin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1981**, *219*, 181–186.
66. Jeannin, J.F.; Leon, L.; Cortier, M.; Sassi, N.; Paul, C.; Bettaieb, A. Nitric oxide-induced resistance or sensitization to death in tumor cells. *Nitric Oxide* **2008**, *19*, 158–163. [[CrossRef](#)]
67. Bonavida, B.; Baritaki, S. Dual role of NO donors in the reversal of tumor cell resistance and EMT: Downregulation of the NF- $\kappa$ B/Snail/YY1/RKIP circuitry. *Nitric Oxide* **2011**, *24*, 1–7. [[CrossRef](#)]
68. Ridnour, L.A.; Thomas, D.D.; Donzelli, S.; Espey, M.G.; Roberts, D.D.; Wink, D.A.; Isenberg, J.S. The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology. *Antioxid. Redox Signal.* **2006**, *8*, 1329–1337. [[CrossRef](#)]
69. Yasuda, H.; Yamaya, M.; Nakayama, K.; Sasaki, T.; Ebihara, S.; Kanda, A.; Asada, M.; Inoue, D.; Suzuki, T.; Okazaki, T.; et al. Randomized phase II trial comparing nitroglycerin plus vinorelbine and cisplatin with vinorelbine and cisplatin alone in previously untreated stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 688–694. [[CrossRef](#)]
70. Siemens, D.R.; Heaton, J.P.; Adams, M.A.; Kawakami, J.; Graham, C.H. Phase II study of nitric oxide donor for men with increasing prostate-specific antigen level after surgery or radiotherapy for prostate cancer. *Urology* **2009**, *74*, 878–883. [[CrossRef](#)]
71. Arrieta, O.; Blake, M.; de la Mata-Moya, M.D.; Corona, F.; Turcott, J.; Orta, D.; Alexander-Alatorre, J.; Gallardo-Rincón, D. Phase II study. Concurrent chemotherapy and radiotherapy with nitroglycerin in locally advanced non-small cell lung cancer. *Radiother. Oncol.* **2014**, *111*, 311–315. [[CrossRef](#)]
72. Stamler, J.S.; Lamas, S.; Fang, F.C. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* **2001**, *106*, 675–683. [[CrossRef](#)]
73. Hess, D.T.; Stamler, J.S. Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 4411–4418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Felley-Bosco, E. Role of nitric oxide in genotoxicity: Implication for carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* **1998**, *17*, 25–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Bagheri, M.; Nair, R.R.; Singh, K.K.; Saini, D.K. ATM-ROS-iNOS axis regulates nitric oxide mediated cellular senescence. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2017**, *1864*, 177–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Picco, V.; Pagès, G. Linking JNK Activity to the DNA Damage Response. *Genes Cancer* **2013**, *4*, 360–368. [[CrossRef](#)]
77. Reynaert, N.L.; Ckless, K.; Korn, S.H.; Vos, N.; Guala, A.S.; Wouters, E.F.; van der Vliet, A.; Janssen-Heininger, Y.M. Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8945–8950. [[CrossRef](#)]
78. Kelleher, Z.T.; Matsumoto, A.; Stamler, J.S.; Marshall, H.E. NOS2 regulation of NF-kappaB by S-nitrosylation of p65. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 30667–30672. [[CrossRef](#)]
79. Marshall, H.E.; Stamler, J.S. Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation. *Biochemistry* **2001**, *40*, 1688–1693. [[CrossRef](#)]
80. Yakovlev, V.A.; Barani, I.J.; Rabender, C.S.; Black, S.M.; Leach, J.K.; Graves, P.R.; Kellogg, G.E.; Mikkelsen, R.B. Tyrosine nitration of IkappaBalpha: A novel mechanism for NF-kappaB activation. *Biochemistry* **2007**, *46*, 11671–11683. [[CrossRef](#)]

81. Park, H.S.; Park, E.; Kim, M.S.; Ahn, K.; Kim, I.Y.; Choi, E.J. Selenite inhibits the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) through a thiol redox mechanism. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 2527–2531. [[CrossRef](#)]
82. Fiorucci, S.; Santucci, L.; Cirino, G.; Mencarelli, A.; Familiari, L.; Soldato, P.D.; Morelli, A. IL-1 beta converting enzyme is a target for nitric oxide-releasing aspirin: New insights in the antiinflammatory mechanism of nitric oxide-releasing nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 5245–5254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Wang, S.; Song, Y.; Liu, D. EAI045: The fourth-generation EGFR inhibitor overcoming T790M and C797S resistance. *Cancer Lett.* **2017**, *385*, 51–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Kim, J.; Won, J.S.; Singh, A.K.; Sharma, A.K.; Singh, I. STAT3 regulation by S-nitrosylation: Implication for inflammatory disease. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20*, 2514–2527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Kim, S.F.; Huri, D.A.; Snyder, S.H. Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science* **2005**, *310*, 1966–1970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Giustizieri, M.L.; Albanesi, C.; Scarponi, C.; De Pità, O.; Girolomoni, G. Nitric oxide donors suppress chemokine production by keratinocytes in vitro and in vivo. *Am. J. Pathol.* **2002**, *161*, 1409–1418. [[CrossRef](#)]
87. Kashiwagi, M.; Masutani, K.; Shinozaki, M.; Hirakata, H. MCP-1 and RANTES are expressed in renal cortex of rats chronically treated with nitric oxide synthase inhibitor. Involvement in macrophage and monocyte recruitment. *Nephron* **2002**, *92*, 165–173. [[CrossRef](#)]
88. Plenchette, S.; Romagny, S.; Laurens, V.; Bettaieb, A. NO and cancer: Itinerary of a double agent. *Med. Sci. (Paris)* **2016**, *32*, 625–633. [[CrossRef](#)]
89. Plenchette, S. Role Of S-Nitrosylation In The Extrinsic Apoptotic Signalling Pathway In Cancer. *Redox Biol.* **2015**, *5*, 415. [[CrossRef](#)]
90. Romagny, S.; Bouaouiche, S.; Lucchi, G.; Ducoroy, P.; Bertoldo, J.B.; Terenzi, H.; Bettaieb, A.; Plenchette, S. S-Nitrosylation of cIAP1 Switches Cancer Cell Fate from TNF $\alpha$ /TNFR1-Mediated Cell Survival to Cell Death. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 1948–1957. [[CrossRef](#)]
91. Choudhari, S.K.; Chaudhary, M.; Bagde, S.; Gadail, A.R.; Joshi, V. Nitric oxide and cancer: A review. *World J. Surg. Oncol.* **2013**, *11*, 118. [[CrossRef](#)]
92. Cheng, H.; Wang, L.; Mollica, M.; Re, A.T.; Wu, S.; Zuo, L. Nitric oxide in cancer metastasis. *Cancer Lett.* **2014**, *353*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Plenchette, S.; Romagny, S.; Laurens, V.; Bettaieb, A. S-Nitrosylation in TNF superfamily signaling pathway: Implication in cancer. *Redox Biol.* **2015**, *6*, 507–515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Leon-Bollotte, L.; Subramaniam, S.; Cauvard, O.; Plenchette-Colas, S.; Paul, C.; Godard, C.; Martinez-Ruiz, A.; Legembre, P.; Jeannin, J.F.; Bettaieb, A. S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells. *Gastroenterology* **2011**, *140*, 2009–2018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Tang, Z.; Bauer, J.A.; Morrison, B.; Lindner, D.J. Nitrosylcobalamin promotes cell death via S nitrosylation of Apo2L/TRAIL receptor DR4. *Mol. Cell Biol.* **2006**, *26*, 5588–5594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Rodríguez-Hernández, A.; Navarro-Villarán, E.; González, R.; Pereira, S.; Soriano-De Castro, L.B.; Sarrias-Giménez, A.; Barrera-Pulido, L.; Álamo-Martínez, J.M.; Serrablo-Requejo, A.; Blanco-Fernández, G.; et al. Regulation of cell death receptor S-nitrosylation and apoptotic signaling by Sorafenib in hepatoblastoma cells. *Redox Biol.* **2015**, *6*, 174–182. [[CrossRef](#)]
97. Hongo, F.; Garban, H.; Huerta-Yepez, S.; Vega, M.; Jazirehi, A.R.; Mizutani, Y.; Miki, T.; Bonavida, B. Inhibition of the transcription factor Yin Yang 1 activity by S-nitrosation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *336*, 692–701. [[CrossRef](#)]
98. Garbán, H.J.; Bonavida, B. Nitric oxide inhibits the transcription repressor Yin-Yang 1 binding activity at the silencer region of the Fas promoter: A pivotal role for nitric oxide in the up-regulation of Fas gene expression in human tumor cells. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 75–81. [[CrossRef](#)]
99. Huerta-Yepez, S.; Vega, M.; Escoto-Chavez, S.E.; Murdock, B.; Sakai, T.; Baritaki, S.; Bonavida, B. Nitric oxide sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of the DR5 transcription repressor Yin Yang 1. *Nitric Oxide* **2009**, *20*, 39–52. [[CrossRef](#)]
100. Braumüller, H.; Wieder, T.; Brenner, E.; Aßmann, S.; Hahn, M.; Alkhaled, M.; Schilbach, K.; Essmann, F.; Kneilling, M.; Griessinger, C.; et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* **2013**, *494*, 361–365. [[CrossRef](#)]

101. Raats, D.A.; Frenkel, N.; van Schelven, S.J.; Rinkes, I.H.; Laoukili, J.; Kranenburg, O. CD95 ligand induces senescence in mismatch repair-deficient human colon cancer via chronic caspase-mediated induction of DNA damage. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2669. [[CrossRef](#)]
102. Burton, D.G.A.; Stolzing, A. Cellular senescence: Immunosurveillance and future immunotherapy. *Ageing Res. Rev.* **2018**, *43*, 17–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. PeÑarando, J.; Aranda, E.; RodrÍguez-Ariza, A. Immunomodulatory roles of nitric oxide in cancer: Tumor microenvironment says “NO” to antitumor immune response. *Transl Res.* **2019**, *210*, 99–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Heinecke, J.L.; Ridnour, L.A.; Cheng, R.Y.; Switzer, C.H.; Lizardo, M.M.; Khanna, C.; Glynn, S.A.; Hussain, S.P.; Young, H.A.; Ambs, S.; et al. Tumor microenvironment-based feed-forward regulation of NOS2 in breast cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 6323–6328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. De Santo, C.; Serafini, P.; Marigo, I.; Dolcetti, L.; Bolla, M.; Del Soldato, P.; Melani, C.; Guiducci, C.; Colombo, M.P.; Iezzi, M.; et al. Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 4185–4190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Molon, B.; Ugel, S.; Del Pozzo, F.; Soldani, C.; Zilio, S.; Avella, D.; De Palma, A.; Mauri, P.; Monegal, A.; Rescigno, M.; et al. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 1949–1962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Bronte, V.; Kasic, T.; Gri, G.; Gallana, K.; Borsellino, G.; Marigo, I.; Battistini, L.; Iafrate, M.; Prayer-Galetti, T.; Pagano, F.; et al. Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J. Exp. Med.* **2005**, *201*, 1257–1268. [[CrossRef](#)]
108. Lu, G.; Zhang, R.; Geng, S.; Peng, L.; Jayaraman, P.; Chen, C.; Xu, F.; Yang, J.; Li, Q.; Zheng, H.; et al. Myeloid cell-derived inducible nitric oxide synthase suppresses M1 macrophage polarization. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6676. [[CrossRef](#)]
109. Thompson, S.; Martínez-Burgo, B.; Sepuru, K.M.; Rajarathnam, K.; Kirby, J.A.; Sheerin, N.S.; Ali, S. Regulation of Chemokine Function: The Roles of GAG-Binding and Post-Translational Nitration. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1692. [[CrossRef](#)]
110. Janssens, R.; Mortier, A.; Boff, D.; Vanheule, V.; Gouwy, M.; Franck, C.; Larsen, O.; Rosenkilde, M.M.; Van Damme, J.; Amaral, F.A.; et al. Natural nitration of CXCL12 reduces its signaling capacity and chemotactic activity in vitro and abrogates intra-articular lymphocyte recruitment in vivo. *Oncotarget* **2016**, *7*, 62439–62459. [[CrossRef](#)]
111. Sato, K.; Ozaki, K.; Oh, I.; Meguro, A.; Hatanaka, K.; Nagai, T.; Muroi, K.; Ozawa, K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* **2007**, *109*, 228–234. [[CrossRef](#)]
112. Tun, X.; Yasukawa, K.; Yamada, K.I. Nitric Oxide Is Involved in Activation of Toll-Like Receptor 4 Signaling through Tyrosine Nitration of Src Homology Protein Tyrosine Phosphatase 2 in Murine Dextran Sulfate-Induced Colitis. *Biol. Pharm. Bull.* **2018**, *41*, 1843–1852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Hays, E.; Bonavida, B. Nitric Oxide-Mediated Enhancement and Reversal of Resistance of Anticancer Therapies. *Antioxidants* **2019**, *8*, 407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Feng, S.; Cheng, X.; Zhang, L.; Lu, X.; Chaudhary, S.; Teng, R.; Frederickson, C.; Champion, M.M.; Zhao, R.; Cheng, L.; et al. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T cell activation through nitrating LCK in mouse cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 10094–10099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Gubin, M.M.; Esaulova, E.; Ward, J.P.; Malkova, O.N.; Runci, D.; Wong, P.; Noguchi, T.; Arthur, C.D.; Meng, W.; Alspach, E.; et al. High-Dimensional Analysis Delineates Myeloid and Lymphoid Compartment Remodeling during Successful Immune-Checkpoint Cancer Therapy. *Cell* **2018**, *175*, 1014–1030.e1019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Liu, X.; Mo, W.; Ye, J.; Li, L.; Zhang, Y.; Hsueh, E.C.; Hoft, D.F.; Peng, G. Regulatory T cells trigger effector T cell DNA damage and senescence caused by metabolic competition. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 249. [[CrossRef](#)]
117. Isambert, N.; Fumoleau, P.; Paul, C.; Ferrand, C.; Zanetta, S.; Bauer, J.; Ragot, K.; Lizard, G.; Jeannin, J.F.; Bardou, M. Phase I study of OM-174, a lipid A analogue, with assessment of immunological response, in patients with refractory solid tumors. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 172. [[CrossRef](#)]



118. Galluzzi, L.; Vacchelli, E.; Eggermont, A.; Fridman, W.H.; Galon, J.; Sautès-Fridman, C.; Tartour, E.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology* **2012**, *1*, 699–716. [[CrossRef](#)]
119. Kang, C. Senolytics and Senostatics: A Two-Pronged Approach to Target Cellular Senescence for Delaying Aging and Age-Related Diseases. *Mol. Cells* **2019**, *42*, 821–827. [[CrossRef](#)]
120. Short, S.; Fielder, E.; Miwa, S.; von Zglinicki, T. Senolytics and senostatics as adjuvant tumour therapy. *EBioMedicine* **2019**, *41*, 683–692. [[CrossRef](#)]
121. Kannaiyan, R.; Mahadevan, D. A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev. Anticancer. Ther.* **2018**, *18*, 1249–1270. [[CrossRef](#)]
122. Ghione, S.; Mabrouk, N.; Paul, C.; Bettaieb, A.; Plenchette, S. Protein kinase inhibitor-based cancer therapies: Considering the potential of nitric oxide (NO) to improve cancer treatment. *Biochem. Pharmacol.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Shafabakhsh, R.; Asemi, Z. Quercetin: A natural compound for ovarian cancer treatment. *J. Ovarian Res.* **2019**, *12*, 55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Baumgart, B.; Guha, M.; Hennen, J.; Li, J.; Woicke, J.; Simic, D.; Graziano, M.; Wallis, N.; Sanderson, T.; Bunch, R.T. In vitro and in vivo evaluation of dasatinib and imatinib on physiological parameters of pulmonary arterial hypertension. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, *79*, 711–723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Hu, X.; Wang, H.; Han, C.; Cao, X. Src promotes anti-inflammatory (M2) macrophage generation via the IL-4/STAT6 pathway. *Cytokine* **2018**, *111*, 209–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Cruz, F.F.; Horta, L.F.; Maia, L.e.A.; Lopes-Pacheco, M.; da Silva, A.B.; Morales, M.M.; Gonçalves-de-Albuquerque, C.F.; Takiya, C.M.; de Castro-Faria-Neto, H.C.; Rocco, P.R. Dasatinib Reduces Lung Inflammation and Fibrosis in Acute Experimental Silicosis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0147005. [[CrossRef](#)]
127. Singh, S.P.; Konwar, B.K. Molecular docking studies of quercetin and its analogues against human inducible nitric oxide synthase. *Springerplus* **2012**, *1*, 69. [[CrossRef](#)]
128. García-Mediavilla, V.; Crespo, I.; Collado, P.S.; Esteller, A.; Sánchez-Campos, S.; Tuñón, M.J.; González-Gallego, J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *557*, 221–229. [[CrossRef](#)]
129. Ma, J.Q.; Li, Z.; Xie, W.R.; Liu, C.M.; Liu, S.S. Quercetin protects mouse liver against CCl<sub>4</sub>-induced inflammation by the TLR2/4 and MAPK/NF- $\kappa$ B pathway. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *28*, 531–539. [[CrossRef](#)]
130. Martínez-Flórez, S.; Gutiérrez-Fernández, B.; Sánchez-Campos, S.; González-Gallego, J.; Tuñón, M.J. Quercetin attenuates nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide production in interleukin-1beta-activated rat hepatocytes. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 1359–1365. [[CrossRef](#)]
131. Shen, S.C.; Lee, W.R.; Lin, H.Y.; Huang, H.C.; Ko, C.H.; Yang, L.L.; Chen, Y.C. In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E(2) production. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *446*, 187–194. [[CrossRef](#)]
132. Morales, A.I.; Vicente-Sánchez, C.; Jerkic, M.; Santiago, J.M.; Sánchez-González, P.D.; Pérez-Barriocanal, F.; López-Novoa, J.M. Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *210*, 128–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Banerjee, T.; Van der Vliet, A.; Ziboh, V.A. Downregulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2002**, *66*, 485–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Takahashi, S.; Mendelsohn, M.E. Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: Calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 30821–30827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Murtagh, J.; Lu, H.; Schwartz, E.L. Taxotere-induced inhibition of human endothelial cell migration is a result of heat shock protein 90 degradation. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 8192–8199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Hassan, M.; Watari, H.; AbuAlmaaty, A.; Ohba, Y.; Sakuragi, N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 150845. [[CrossRef](#)]
137. Wright, C.; Iyer, A.K.; Kulkarni, Y.; Azad, N. S-Nitrosylation of Bcl-2 Negatively Affects Autophagy in Lung Epithelial Cells. *J. Cell Biochem.* **2016**, *117*, 521–532. [[CrossRef](#)]

138. Scroggins, B.T.; Neckers, L. Just say NO: Nitric oxide regulation of Hsp90. *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 1093–1094. [[CrossRef](#)]
139. Pillai, R.N.; Ramalingam, S.S. Heat shock protein 90 inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **2014**, *26*, 159–164. [[CrossRef](#)]
140. García-Cardena, G.; Fan, R.; Shah, V.; Sorrentino, R.; Cirino, G.; Papapetropoulos, A.; Sessa, W.C. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* **1998**, *392*, 821–824. [[CrossRef](#)]
141. Natarajan, M.; Konopinski, R.; Krishnan, M.; Roman, L.; Bera, A.; Hongying, Z.; Habib, S.L.; Mohan, S. Inhibitor- $\kappa$ B kinase attenuates Hsp90-dependent endothelial nitric oxide synthase function in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2015**, *308*, C673–C683. [[CrossRef](#)]
142. Martínez-Ruiz, A.; Lamas, S. Detection and identification of S-nitrosylated proteins in endothelial cells. *Methods Enzymol.* **2005**, *396*, 131–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Retzlaff, M.; Stahl, M.; Eberl, H.C.; Lagleder, S.; Beck, J.; Kessler, H.; Buchner, J. Hsp90 is regulated by a switch point in the C-terminal domain. *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 1147–1153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Xue, W.; Zender, L.; Miething, C.; Dickins, R.A.; Hernando, E.; Krizhanovsky, V.; Cordon-Cardo, C.; Lowe, S.W. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **2007**, *445*, 656–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Kang, T.W.; Yevsa, T.; Woller, N.; Hoenicke, L.; Wuestefeld, T.; Dauch, D.; Hohmeyer, A.; Gereke, M.; Rudalska, R.; Potapova, A.; et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **2011**, *479*, 547–551. [[CrossRef](#)]
146. Seignez, C.; Martin, A.; Rollet, C.E.; Racœur, C.; Scagliarini, A.; Jeannin, J.F.; Bettaieb, A.; Paul, C. Senescence of tumor cells induced by oxaliplatin increases the efficiency of a lipid A immunotherapy via the recruitment of neutrophils. *Oncotarget* **2014**, *5*, 11442–11451. [[CrossRef](#)]
147. Onier, N.; Hilpert, S.; Reveneau, S.; Arnould, L.; Saint-Giorgio, V.; Exbrayat, J.M.; Jeannin, J.F. Expression of inducible nitric oxide synthase in tumors in relation with their regression induced by lipid A in rats. *Int. J. Cancer* **1999**, *81*, 755–760. [[CrossRef](#)]
148. Gautier, T.; Paul, C.; Deckert, V.; Desrumaux, C.; Klein, A.; Labbé, J.; Le Guern, N.; Athias, A.; Monier, S.; Hammann, A.; et al. Innate immune response triggered by triacyl lipid A is dependent on phospholipid transfer protein (PLTP) gene expression. *FASEB J.* **2010**, *24*, 3544–3554. [[CrossRef](#)]
149. Lamrani, M.; Sassi, N.; Paul, C.; Yousfi, N.; Boucher, J.L.; Gauthier, N.; Labbé, J.; Seignez, C.; Racœur, C.; Athias, A.; et al. TLR4/IFN $\gamma$  pathways induce tumor regression via NOS II-dependent NO and ROS production in murine breast cancer models. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1123369. [[CrossRef](#)]
150. Martin, A.; Seignez, C.; Racœur, C.; Isambert, N.; Mabrouk, N.; Scagliarini, A.; Reveneau, S.; Arnould, L.; Bettaieb, A.; Jeannin, J.F.; et al. Tumor-derived granzyme B-expressing neutrophils acquire antitumor potential after lipid A treatment. *Oncotarget* **2018**, *9*, 28364–28378. [[CrossRef](#)]
151. Eggert, T.; Wolter, K.; Ji, J.; Ma, C.; Yevsa, T.; Klotz, S.; Medina-Echeverez, J.; Longerich, T.; Forgues, M.; Reisinger, F.; et al. Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell* **2016**, *30*, 533–547. [[CrossRef](#)]



2. Revue 2 : Protein kinase inhibitor-based cancer therapies: Considering the potential of nitric oxide (NO) to improve cancer treatment



## Review

# Protein kinase inhibitor-based cancer therapies: Considering the potential of nitric oxide (NO) to improve cancer treatment

Silvia Ghione<sup>a,b,1</sup>, Nesrine Mabrouk<sup>a,b,1</sup>, Catherine Paul<sup>a,b</sup>, Ali Bettaieb<sup>a,b</sup>,  
Stéphanie Plenchette<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers, EPHE, PSL Research University, 75000 Paris, France

<sup>b</sup> LIIC, EA7269, Université de Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Kinase  
Kinase inhibitor  
Cancer  
Nitric oxide  
Post-translational modification

## ABSTRACT

The deregulation of a wide variety of protein kinases is associated with cancer cell initiation and tumor progression. Owing to their indispensable function in signaling pathways driving malignant cell features, protein kinases constitute major therapeutic targets in cancer. Over the past two decades, intense efforts in drug development have been dedicated to this field. The development of protein kinase inhibitors (PKIs) have been a real breakthrough in targeted cancer therapy. Despite obvious successes across patients with different types of cancer, the development of PKI resistance still prevails. Combination therapies are part of a comprehensive approach to address the problem of drug resistance. The therapeutic use of nitric oxide (NO) donors to bypass PKI resistance in cancer has never been tested in clinic yet but several arguments suggest that the combination of PKIs and NO donors may exert a potential anticancer effect. The present review summarized the current state of knowledge on common targets to both PKIs and NO. Herein, we attempt to provide the rationale underlying a potential combination of PKIs and NO donors for future directions and design of new combination therapies in cancer.

## 1. Introduction

Phosphorylation events are the most common and extensively studied protein post-translational modifications in mammalian systems. Coordinated by a large and diverse family of kinases, phosphorylation is a pivotal biochemical phenomenon involved in signal transduction and

multiple cellular functions including cell survival, differentiation, proliferation and migration. The human kinome, which comprises approximately 535 protein kinases, controls many signaling pathways and their crosstalk that leads to virtually all fundamental biological processes [1,2]. It is now well established that protein kinase activities disorders exert a crucial role in cancer development and progression

**Abbreviations:** 5-FU, 5-Fluorouracil; AKT, Akt serine/threonine kinase; Bcr-Abl, Breakpoint cluster region-protein Abelson; BTK, Bruton tyrosine kinase; CNS, Central nervous system; cIAP1, Cellular inhibitor of apoptosis protein 1; CLL, Chronic lymphoid leukemia; CML, Chronic myeloid leukemia; CRC, Colorectal carcinoma; EGFR, Endothelial growth factor receptor; eNOS, Endothelial nitric oxide synthase; EMT, Epithelial to mesenchymal transition; ERK, Extracellular signal-regulated kinases; FasL, Fas Ligand; FGF, Fibroblast growth factor; FGFR, Fibroblast growth factor receptor; FL, Follicular lymphoma; FDA, Food and Drugs Administration; GIST, Gastrointestinal stromal tumors; GC, Guanylate cyclase; HCC, Hepatocellular carcinoma; Ido1, Indoleamine 2,3-dioxygenase 1; iNOS, Inducible nitric oxide synthase; IL, Interleukin; JAK2, Janus kinase 2; M1/M2, Macrophage 1/2 phenotype; mTOR, Mammalian target of rapamycin; MET, MET proto-oncogene receptor tyrosine kinase; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; MEK, Mitogen extracellular kinases; miRNA, Micro RNA; MDSC, Myeloid-derived suppressor cells; H89, (N-[2-bromocinnamylamino]ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide); nNOS, Neuronal nitric oxide synthase; NO, Nitric Oxide; NTG, Nitroglycerin; L-NMMA, NG-monomethyl-L-arginine monoacetate; NHL, Non-Hodgkin lymphoma; NSCLC, Non-small-cell lung carcinoma; OS, Overall survival; PTEN, Phosphatase and tensin homolog; PI3K, Phosphoinositide-3 kinase; PDGFR, Platelet-derived growth factor receptor; PFS, Progression free survival; EP2, Prostaglandin E receptor 2; PKA, Protein kinase A; PKI(s), Protein kinase inhibitor(s); RR-DTC, Radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer; Rheb, Ras homolog enriched in brain; ROS, Reactive oxygen species; RFS, Recurrence-free survival; RCC, Renal cell carcinoma; STAT3, Signal transducer and activator of transcription 3; RSNO, S-nitrosothiols; Shp2, Src homology 2 domain-containing phosphatase 2; TSC, Tuberous sclerosis complex; TNF, Tumor necrosis factor; TRAIL, Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand; TKI, Tyrosine kinase inhibitor; VEGFR, Vascular endothelial growth factor receptor

\* Corresponding author at: Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers (LIIC), UFR Sciences de Santé, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, BP 87900, F-21000 Dijon, France.

E-mail addresses: [Stephanie.plenchette@u-bourgogne.fr](mailto:Stephanie.plenchette@u-bourgogne.fr), [stephanie.plenchette-colas@ephe.psl.eu](mailto:stephanie.plenchette-colas@ephe.psl.eu) (S. Plenchette).

<sup>1</sup> Equal contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113855>

Received 30 November 2019; Accepted 10 February 2020

Available online 13 February 2020

0006-2952/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

[3]. As such, protein kinases are frequently found to be oncogenic by distinct mechanisms including somatic mutations, chromosomal translocation, amplification and also epigenetic regulation [4]. Since, many efforts have been made to develop new therapeutic strategies to restrict protein kinase activities for clinical application in oncology.

In the past two decades, a wide range of protein kinase inhibitors (PKIs) types, with various properties and mode of action *i.e.* including different selectivity and modes of binding to kinases, have entered different phases of clinical development and several are currently approved by the FDA. Thus, PKIs have become a major class of cancer drugs and their therapeutic potential is still an area of increased interest. Indeed, the study of kinase biology associated with the development of PKIs is a significant component of targeted therapies. Despite encouraging clinical benefits for patients, the use of PKIs, as cancer therapeutics, remains frequently overshadowed by drug resistance mechanisms [5].

The dynamic evolution of cancer cells reflected by constant acquired mutations and genomic instability toward various protein kinases has a dramatic impact on PKI-based therapy effectiveness. The ability of cancer cells to resist to PKI therapies gives rise to a need to develop new therapeutic options. For this reason, new generation PKIs were developed and tested in an attempt to overcome resistance. Despite therapeutic benefit of PKIs to cancer patients, primary and acquired resistance still represent a major challenge in kinase-targeted drug development for cancer therapy. New combinatorial PKI-based approach that would selectively target cancer cells would open new therapeutic windows to neutralize cancer cell evasion from targeted therapies. Basically, two possible approaches might be considered to lower cancer cell resistance to PKI. Combinatorial strategies of PKI with drugs that would target the same protein kinase or alternate signaling pathways. As a key post-translational modification, protein phosphorylation has been the foundation for signal transduction therapy for cancer. Beside phosphorylation, a number of proteins involved in signal transduction pathways are also a target of a multitude of other post-translational modifications such as glycosylation, ubiquitination, SUMOylation, acetylation or methylation among others, revealing a complex regulatory network. Such post-translation modifications modulating cellular signaling represent putative antitumor strategies that could be considered along the use of PKI.

Nitric oxide (NO)-mediated protein post-translation modifications have gained increasing consideration in the context of cancer. Studies have demonstrated that NO can regulate many classes of protein associated with signaling pathways involved either in cancer development, progression or inhibition [6–8]. Several features such as localization, concentration, cellular time exposure or the redox environment dictate the complex dichotomous action of NO in cancers: either pro-tumoral or anti-tumoral [9]. NO production is generally assumed to play a crucial role in cancer cell fate decisions. Low rate of NO can contribute to tumorigenesis and progression whereas high rate of NO can promote cancer cell death [10–12]. The insights gained into NO mode of action revealed that both S-nitrosylation (the covalent binding of NO moiety to a free cysteine of target protein), and nitration (the covalent binding of NO moiety to a tyrosine residue) are key regulatory protein post-translational modifications in cellular signaling.

As a highly selective and rapidly reversible protein post-translational modification, S-nitrosylation has probably one of the most significant biochemical impact over protein function inducing multiple changes in protein activity, conformation, localization or interaction with other protein partners [6]. Enzymes are a class of protein frequently targeted by NO. Although protein post-translational modifications induced by NO have the ability to both activate or inhibit kinases, a wide range of enzymes involved in cell survival, proliferation or cell death signaling pathways are negatively regulated by NO post-translational modifications [6].

The purpose of this review is to survey the PKIs from the perspective of how NO could have a beneficial anti-tumoral effect on PKI-based

therapies. The current review will discuss the link between PKIs and NO with the aim of considering NO as potential novel combination therapies using PKIs and NO donors.

## 2. Background on the main PKIs

The discovery of PKIs and their clinical use have revolutionized targeted therapy in cancer. The real benefit of PKIs over conventional chemotherapy, results in less cytotoxicity for non-cancerous cells because of more selectivity and lower toxic manifestations. Despite the low toxicity, these molecules have specific toxicity profile, and the understanding of the mechanisms of action is necessary to understand this process [13,14].

The development of imatinib, the first PKI used in cancer therapy, allows to block the kinase activity of the aberrant protein breakpoint cluster region-protein Abelson (Bcr-Abl, characterized by a chromosomal translocation between chromosome 9 and chromosome 22 in the hematological malignancy chronic myeloid leukemia (CML)), and increases overall survival (OS). Because Bcr-Abl recombination is a driver oncogenic process in CML, patients are more sensitive to PKIs-based therapies than for patients with solid tumors because of high heterogeneity and mutational rate [15]. Imatinib is not specific for Bcr-Abl kinase, and targets other oncogenic kinases. Then, imatinib (STI-571) is approved by the FDA not only for the treatment of CML but also for gastrointestinal stromal tumors (GIST) harbouring c-Kit mutation [5,16,17] and dermatofibrosarcoma protuberans [15,18]. Imatinib is able to block the tyrosine kinase activity because it is an ATP competitor, which can interact with the inactive catalytic site of the kinase [19,20]. Other PKIs have the same mechanism of action, such as sorafenib, which is a multi-kinase inhibitor that blocks various kinases such as vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), BRAF and c-Kit [21]. Because of his multi-target activity, sorafenib is actually used for the treatment of GISTs such as imatinib [22]. Levatinib and regorafenib have the same mechanism of action. The first one principally inhibits VEGFR, and is approved for the treatment of iodine-refractory differentiated thyroid cancer and metastatic renal cell carcinoma (RCC) [23]. Regorafenib also targets VEGFR, PDGFR and BRAF and is mainly used for the treatment of advanced GIST, advanced hepatocellular carcinoma (HCC) and advanced colorectal carcinoma (CRC) [24].

Other PKIs, such as gefitinib, sunitinib and vemurafenib, are also ATP competitors [25]. Gefitinib is used to block the activation of mutated tyrosine kinase receptor EGFR (either deleted in exon 19 or L858R point mutated within exon 21) in NSCLC resulting in permanent activation of the ATP-binding site in absence of the ligand [26]. Sunitinib is not specific to endothelial growth factor receptor (EGFR), but can also inhibit VEGFR and c-Kit and for this reason, it can be used to treat GISTs in people who do not respond to imatinib treatment [27]. More recently, FDA approves osimertinib as first-line treatment of metastatic NSCLC patients based on the FLAURA trial [28]. Vemurafenib is used in patients with BRAF V600E mutated melanoma. This mutation can switch-on the serine/threonine kinase activity, with an abnormal activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinases (ERK) proliferating signaling pathway. Vemurafenib block the activation of the mutated protein, stopping cancer cells proliferation. Unfortunately, this drug shows side effects on healthy cells. Indeed, vemurafenib also targets the wild type form of BRAF, causing a kinase overactivation of MAPK/ERK signaling pathway in healthy cells. Despite this side effect, vemurafenib is an established efficient therapy [29,30].

Some PKI can block the kinase activity in an allosteric manner, by binding outside the catalytic ATP-binding site such as trametinib, a mitogen extracellular kinases (MEK) inhibitor [31,32]. Another mechanism of action relies on the covalent bond between the PKI and the catalytic site of the kinase, as for ibrutinib, a bruton tyrosine kinase (BTK) inhibitor [33,34].

Even though PKIs increase OS in many cancer subtypes, primary and secondary resistances are still frequently observed. Numerous potential mechanisms of resistance to PKIs have been described, requiring the use of second, third or fourth generation PKIs for patients refractory to treatment. Therefore, the development of novel combinational therapies may represent an attractive way to overcome PKI-resistant cancer cells [35].

### 3. Clinical use of the main PKIs in cancer

#### 3.1. Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors

##### 3.1.1. CML

The clinical development of imatinib has been a considerable leap in CML therapy. Indeed, in a phase II study involving 452 patients with CML who had failed to respond to interferon  $\alpha$  therapy, Kantarjian et al. demonstrated that imatinib treatment induced high rates of cytogenetic (60% of patients) and hematologic responses (95% of patients). Moreover, after a median follow-up of 18 months, 95% of patients were alive [36]. The last update of the ISIS study comparing interferon treatment versus imatinib (ISIS: international randomized study of interferon versus STI-571) showed an estimated OS of 83% at 10 years [37].

Imatinib resistance mechanisms were classified according to two criteria: Bcr-Abl dependent and independent mechanisms [38]. Bcr-Abl dependent mechanisms of resistance are associated with different point mutations which totally or partially impair the catalytic domain of Bcr-Abl or the imatinib-binding sites to this kinase. Almost 57 residues were identified, mostly in the ATP-binding loop (P-loop), the SH2 binding site, and the A-loop, which then dictate the efficacy of imatinib but also future therapeutic strategies to overcome imatinib-resistance [39,40]. Because of patients refractory to imatinib treatment, more PKIs were FDA-approved for the treatment of CML such as dasatinib (inhibitor of c-KIT, PDGFR-A and B for example) [41,42], nilotinib and bosutinib, three second generation PKIs. Another example, ponatinib, a third generation PKI is used to overcome T315I mutation (a frequent Bcr-Abl resistance mutation) not only for imatinib-resistant patients [43] but also for patients refractory to treatment with multiple PKIs [5].

The *ABL* gene deletion in 9q is another mechanism of imatinib resistance and poor prognosis in CML [44,45]. Moreover, microRNAs (miRNAs) such as miR-199b and miR-219-2 (centromeric to the *Abl* gene frequently lost in CML patients) were downregulated in patients bearing 9q deletion and associated with imatinib resistance [46].

##### 3.1.2. GIST

Imatinib has also revolutionized the medical treatment of KIT-driven GISTs. In a randomized phase III, Dematteo et al. showed that imatinib significantly improved recurrence-free survival compared with placebo (98% vs 83%) at 1 year [47]. Moreover, in another randomized phase III study including patients with KIT-positive GIST showed that, compared with a 1-year only treatment, post-operative imatinib administered for 3 years allowed longer recurrence-free survival (RFS) (47.9 vs 65.6% respectively) and longer OS (81.7% vs 92%, respectively) [48].

Furthermore, it has been shown that mutations in KIT or PDGFRA were frequently found in GISTs patients that are primary refractory to imatinib. These mutations seem to be present within an exon that render the protein less sensitive to imatinib, and contribute then to the development of drug resistance [49].

#### 3.2. EGFR tyrosine kinase inhibitors

##### 3.2.1. NSCLC

It is recognized that EGFR is overexpressed in ~80% and mutated in 20% of NSCLC [50,51]. Phosphorylation of EGFR (e.g. Y1173; Y1068; Y1045; and Y854 residues) is required to initiate cellular

signaling [52]. EGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) such as erlotinib, gefitinib and afatinib (non-exhaustive list) are widely used in cancer treatment. Erlotinib was the first EGFR-TKI assessed as first-line treatment for patients with NSCLC with EGFR mutations [5,53]. In the EURTAC randomized phase III trial, erlotinib treatment showed beneficial results with a progression-free survival (PFS) of 9.7 months compared to standard chemotherapy with a PFS of 5.2 months [54]. Gefitinib is also a first-generation EGFR-TKIs approved by FDA in 2015 for treatment of NSCLC patients with EGFR mutations. Indeed, Douillard et al. showed in a phase IV clinical trial that gefitinib as a first line treatment was effective and well tolerated in patients with stage IIIa/B/IV EGFR mutation-positive NSCLC [55]. Afatinib is a second-generation EGFR TKI and the first irreversible oral blocker of the ErbB family. This TKI has been approved by the FDA for the treatment of locally advanced or metastatic patients with NSCLC after the two randomized phase III studies Lux-Lung3 and Lux-lung6. In these studies, afatinib improves overall survival only in patients with del19EGFR mutations (33.3 months vs 21.1 months in the chemotherapy group) [56].

Many acquired resistance mechanisms to gefitinib, erlotinib and afatinib EGFR-TKIs have been reported and can be classified into three categories: target gene mutation, bypass signaling pathway activation and histological transformation [57,58]. The main mechanism of EGFR-TKIs resistance arises from the site mutation T790M in EGFR (detected in 50–60% of resistant cases), which prevents EGFR-TKIs binding [59–61]. Importantly, osimertinib has been found to prolong the survival for metastatic NSCLC patients with EGFR mutations (with or without the T790M mutation) [62].

#### 3.3. VEGFR tyrosine kinase inhibitors

Several VEGFR-TKIs have been developed and used to treat different types of cancer. These PKIs include (but are not limited to) sorafenib, sunitinib, pazopanib, cabozantinib, lenvatinib, vandetanib, regorafenib, as multi-targeted TKIs, and axitinib as the only VEGFR specific inhibitor.

##### 3.3.1. Sorafenib

As a non-specific inhibitor, sorafenib can also target PDGFRs, FLT3 receptor, BRAF, RET and c-kit [63]. Sorafenib has been the first TKI approved by the FDA for the treatment of RCC in 2005, based on the positive results of the randomized phase III TARGET trial. In this clinical trial, the sorafenib group was compared with a placebo group in a cohort of 903 patients with RCC that was resistant to standard therapy. PFS for these patients was significantly prolonged (5.5 months vs 2.8 months for placebo) [63]. This TKI is also used in HCC patients. Indeed, in a multicenter phase III trial, patients with advanced HCC receiving sorafenib had median survival, as well as time to radiologic progression nearly 3 months longer than patients receiving placebo [64].

However, multiple mechanisms that lead to sorafenib resistance have been reported including for example EGFR, Akt or c-Jun activation [65,66]. Furthermore, cancer stem cells, Src homology 2 domain-containing phosphatase 2 (Shp2) and upregulation of fibroblast growth factor (FGF) signaling pathway may also play a role [66]. As described for imatinib drug resistance, some miRNAs such as miR-181a [67], and miR-429 [68] can also be responsible for drug resistance.

Yet, some drug combination therapies have been used successfully. Sorafenib combined with capecitabine, in advanced solid tumors, including HCC, improved anti-tumor response and survival [69]. In addition, a phase II clinical trial combining sorafenib with doxorubicin shows a synergistically inhibition of tumor cells proliferation and new blood vessels formation in tumor nodules [70]. Moreover, combination of sorafenib with low-dose of 5-fluorouracil (5-FU) in HCC patients showed a positive response, which could reduce adverse effects by decreasing 5-FU dose intensity [66]. Other combinatory strategies reported better curative effect with decreased side effects, as uracil-

tegafur [71] or octreotide [72]. Furthermore, a clinical trial in patients with castration-resistant prostate cancer, reported that sorafenib can be combined safely with chemotherapy [73].

### 3.3.2. Sunitinib

Sunitinib is also a non-specific tyrosine kinase inhibitor approved by the FDA for the treatment of metastatic RCC and imatinib-resistant GIST based on the results of several randomized phase III trials [74,75].

However, sunitinib efficacy appeared to be influenced by primary KIT gene mutations (located in exon 11) [22,76,77] and secondary mutations in KIT exons 17 or 18 [76,78-80]. Furthermore, Tran et al., showed that sunitinib resistance was correlated with the upregulation of FGF1, in RCC cell line [81]. Alterations in some miRNAs expression either increased (miR-575, miR-642b-3p, miR-4430) or decreased (miR-18a-5p, miR-29b-1-5p, miR-431-3p, miR-4521) were associated with sunitinib resistance. [82].

Regorafenib is another TKI with an activity against VEGFR, but also KIT, PDGFRA and BRAF used as a third line therapy for GISTs patients refractory to imatinib and sunitinib treatment that was found to increase PFS [83-86]. Tomida and collaborators, showed that the blockade of VEGFR by regorafenib, stimulates PDGFR and FGF receptor (FGFR) activation and increases cancer cells malignancy [87].

### 3.3.3. Lenvatinib

Lenvatinib (Lenvima®) is approved since February 2015 by the FDA for the treatment of radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer (RR-DTC) [88]. This drug is generally a well-tolerated treatment that offers a good alternative to sorafenib (because of its ability to stop the epithelial to mesenchymal transition (EMT) process in combination with the histone deacetylase inhibitor HNHA), another PKI currently approved in RR-DTC [89,90]. Furthermore, most patients with diffuse thyroid diseases develop resistance to lenvatinib, with two principal mechanisms: upregulation of receptors (such as c-Met) or activation of alternative pathways (MEK and phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathways) [35,91-95].

### 3.4. BRAF V600E

BRAF mutations are common in cancer cells, with BRAF V600E mutation being the most frequent one, particularly in melanoma (nearly 50% of patients affected) [96-98]. Even though the FDA approved vemurafenib in 2011 for the treatment of metastatic melanoma associated with BRAF V600E mutation, a short term increase in patient survival and secondary resistance quickly appears [99]. Overactivation of MAPK/ERK or PI3K/Akt/mTOR signaling pathways, either driven by upstream receptors (EGFR, FGFR and PDGFR) or by alteration of component of signal cascades confer resistance to BRAF V600E mutated tumor cells [100-104]. Jazirehi and coworkers showed also KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase and MET expression in resistant cell lines [105]. Of note, the association of BRAF and MEK inhibitors represents a new strategy to treat metastatic melanoma resistant to vemurafenib [106].

## 4. Regulatory relationships between protein kinases, PKIs and NO in cancer

It is worthy to note that there is little knowledge available with regard to the relationship between protein kinases, their inhibitors and NO. Nevertheless, some arguments are in favor of a complex regulatory network in which PKIs may exert an influence on endogenous production of NO, and on the other way round, NO (from other sources, mainly NO donors) may have an impact on protein kinases. We reviewed the role of NO as a negative and positive regulator of protein kinases to evaluate whether NO could provide added value to the action of PKIs in cancer to ultimately overcome PKIs-mediated resistance

(Fig. 1).

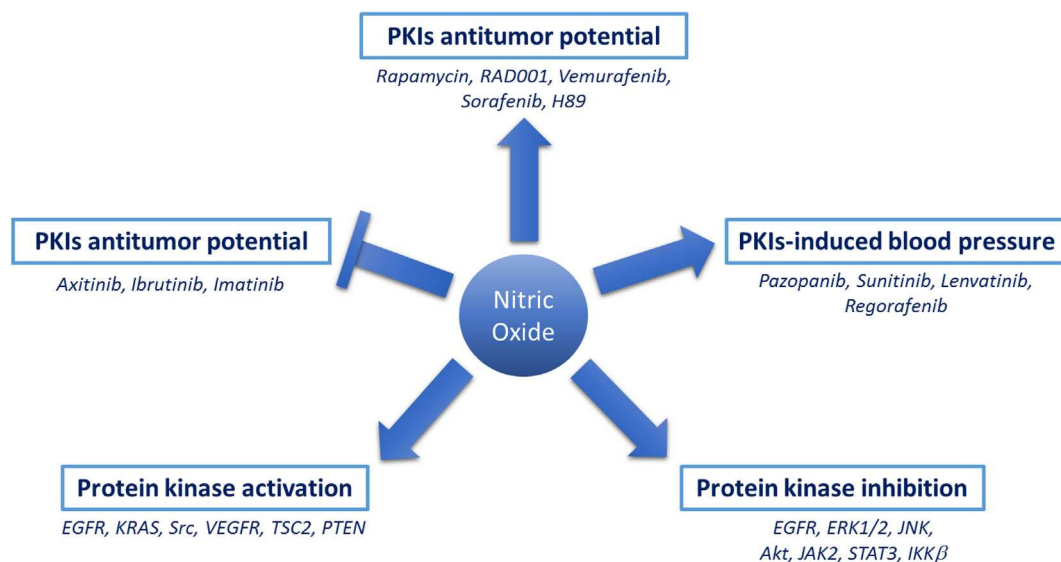
### 4.1. Involvement of NO in PKIs-mediated antitumor potential

It was reported that mTOR inhibitors such as rapamycin and RAD001 increased inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and NO production in glioma-activated microglia cells (involved in central nervous system (CNS) cancers) to express a macrophage 1 (M1) phenotype (antitumoral). In parallel, rapamycin and RAD001 prevented the acquisition of a M2 phenotype (protumoral) by reducing both arginase and *interleukin (IL)-10* gene expression, possibly resulting in antitumor action [107]. Another study reported that ibrutinib, an inhibitor of BTK and IL-2-inducible T-cell kinase, clinically used for the treatment of B-cell malignancies, modulates myeloid-derived suppressor cells (MDSC) function and generation. This inhibitory function is associated with ibrutinib-impaired iNOS and arginase 1 expression in MDSC cells (a hallmark for MDSC exhaustion) while indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) trended towards increased expression, revealing a potential strategy for enhancing immune-bases therapy in cancer [108]. Similarly, axitinib, a selective inhibitor of VEGFR tyrosine kinases, indicated in the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma after failure of previous treatment with sunitinib or cytokine, induced the same effect as ibrutinib. Indeed, axitinib suppressed the lung metastasis of melanoma cells, prolonged survival of tumor-bearing mice and reduced the proportion of MDSC. Furthermore, axitinib inhibited the expression of iNOS in MDSC cells affecting their immunosuppressive function [109]. A translational study determined the NO levels in CML patients after imatinib therapy, one of the most effective treatment for Bcr-Abl<sup>+</sup> CML patients. In this study, the authors showed that the imatinib decreased the plasma level of NO by three times (41.48 to 14.26  $\mu\text{mol/L}$ ). The authors concluded that NO levels might be used as a prognostic indicator in CML patients treated with imatinib [110].

While cancer treatment with the kinase inhibitors listed above decreases the NO level, other kinase inhibitors have the opposite effect, exemplified by vemurafenib and sorafenib. On the one hand, Yu et al. reported that vemurafenib initiates apoptosis and growth inhibition of BRAF V600E mutant human melanoma cell line A375, which is correlated with vemurafenib-inducing production of intracellular NO [111]. Such effect was abolished with NG-monomethyl-L-arginine monoacetate (L-NMMA), an iNOS inhibitor [111]. Caraglia et al. showed that in patients with advanced HCC, sorafenib induced an increase of 40% of serum NO levels [112]. This effect was observed only in sensitive patients to the treatment [112]. Thereby, the determination of the NO status in patient's serum could have high value in the prediction of response to sorafenib therapy in HCC patients.

### 4.2. NO favours PKIs toxicity

It is a proven fact that the use of PKIs, as well as antibodies directed against tumor-inducing signaling pathways, has shown very beneficial effects in several types of cancer. However, this benefit is associated with some toxicities. We will focus on those involving NO, known to regulate blood pressure. Indeed, whether many PKIs induced hypertension some others do the opposite. It is well documented that bevacizumab treatment (targeting VEGF pathway) of patients with a variety of solid tumors [113] was associated with a significant increased risk of developing raised blood pressure (grade 1-2, 25%; grade 3-4, 10%) [114,115]. The results also suggest that significant rise in blood pressure was associated with bevacizumab was dose-dependent. Indeed, high-dose of bevacizumab caused high blood pressure. In addition, increased blood pressure with high dose of bevacizumab was observed in patients with RCC and breast cancer, but not in patients with NSCLC, CRC and pancreatic cancer [115]. Although in this later work the involvement of NO in the raise of blood pressure was not investigated, other kinase inhibitors of the VEGF signaling pathway



**Fig. 1.** Impact of NO on protein kinases and PKIs activities. Summary of the ambivalent impact of NO toward PKI (either promoting or inhibiting PKI's antitumoral potential) and protein kinases function (regulated at the transcriptional or the post-translational level by NO).

have also shown a NO-dependent increase in blood pressure. It is the case of pazopanib and sunitinib in the treatment of advanced RCC in which it was shown that pazopanib-treatment was associated with hypertension and decreased urine and plasma nitrite/nitrate, the stable NO-metabolites [116]. Similarly, the urine nitrate concentration was lower in sunitinib-treated patients that developed hypertension [117]. It is also the case of lenvatinib and regorafenib, targeting the VEGF signaling pathway, which showed an increase in blood pressure that it was associated with a decrease of NO in sera of differentiated thyroid carcinoma [118] and in GISTs [119].

#### 4.3. Regulatory impact of NO on protein kinases

##### 4.3.1. NO as a protein kinase activator

Several reports have demonstrated that the intracellular production of NO by NOS is required for the phosphorylation of subsequent activation of EGFR signaling pathways.

It is well known that overexpression of iNOS is significantly associated with tumor growth and angiogenesis, in breast cancer among other cancer types [120,121]. Indeed, high iNOS expression significantly correlates with EGFR phosphorylation, its activation and poor survival in various breast cancer subtypes [122,123]. Accordingly, in response to ionizing radiation, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) increases NO production and EGFR phosphorylation and activation [124]. Another study has showed that eNOS-induced NO can promote EGFR S-nitrosylation and tyrosine residues phosphorylation. Donnini et al., demonstrating that the activation of iNOS/guanylate cyclase (CG) and MAPK-ERK1/2 are required to promote squamous cell carcinoma invasion and growth. This was mediated by EGFR transactivation via prostaglandin E receptor 2 (EP2)/protein kinase A (PKA) and c-Src signaling pathways [125]. Interestingly, EGFR, in the nucleus, can function as a transcription factor. Indeed the transcriptional activation of iNOS gene can result from the interaction of nuclear EGFR with signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) [126]. Together, these data indicate a possible feedback loop for the regulation of the EGFR signaling pathways.

NO derived from NO donors can also positively regulate the EGFR signaling pathways. Upon exposure of triple negative breast cancer cell lines (MDA-MB-468 and HCC1806) to the NO donor DETA/NO an increase in EGFR tyrosine phosphorylation (Y1173 in MDA-MB-468 and Y1173, Y1068 and Y1045 in HCC1806 cells) and subsequent activation were found involved in tumor cell migration and invasion [127].

Another very important tyrosine kinase receptor is VEGFR, which upon binding to its ligand VEGF leads to vasculogenesis and angiogenesis [128]. VEGF is known to be upregulated by cancer cells generating NO, which contributes to increased neovascularization and tumor metastasis [129]. Furthermore, Nakamura, Y. et al., showed that treatment of breast cancer cells MDA-MB6231 with the NO donor DETA/NONOate, induced an increase in VEGF-C expression and nitrite/nitrate production. All of these changes were correlated with lymph node metastasis [130].

NO can also positively regulate non-receptor tyrosine kinases as Src and KRAS. Indeed, NO donors such as DETANO triggered c-Src S-nitrosylation leading to tyrosine kinase activation attested by its phosphorylation at Tyr419 and increased Akt Ser473 and STAT3 Tyr705 phosphorylation [123]. Similarly, the NO donor SNP causes S-nitrosylation of c-Src at cysteine 498 to stimulate its kinase activity in fibroblasts. Similar effect was found in breast cancer cells treated with beta-estradiol via iNOS activation [131]. However iNOS can be targeted by Src. Actually Src induces Tyr1055 iNOS residue phosphorylation [132]. It is well documented that KRAS is also oncogenic. Its mutation in cancer maintained it in its activated status. KRAS activation could occur through other mechanisms. Studies showed that eNOS induces the S-nitrosylation of cysteine at position 118 and activation of wild-type Ras protein leading to the stimulation of PI3K/Akt signaling, thus promoting tumor growth [133]. The same year, Oliveira *et al.*, found that, in rabbit aortic endothelial cells, low concentrations of S-Nitrosothiols/NO (RSNO/NO) induced Ras S-nitrosylation and consequently Ras-ERK1/2 MAP kinase signaling pathway activation [134]. Lopez-Carera et al., investigated the impact of iNOS overexpression observed in melanoma and others cancer cells. They found that iNOS induced mTOR pathway activation in melanoma cells. Mechanistically, the authors showed that iNOS triggered S-nitrosylation of tuberous sclerosis complex (TSC) 2, a driver for the inhibition of dimerization of TSC2 with its inhibitory partner TSC1, increased GTPase activity of its target Ras homolog enriched in brain (Rheb), a key activator of mTOR signaling pathway [135]. NO could also activate the mTOR signaling pathway indirectly. Indeed, Zhu et al., showed that neuronal NOS (nNOS) S-nitrosylates the phosphatase and tensin homolog (PTEN) protein resulting to Akt/mTOR signaling activation, reducing autophagy and promoting the survival of nasopharyngeal carcinoma cells [136].



#### 4.3.2. NO as a protein kinase inhibitor

In agreement with the well-documented ambivalent role of NO in cancer, various studies have reported a negative regulatory effect of NO on protein kinases. Indeed, NO can inhibit pathways involved in the proliferation and survival of cancer cells via its potential to down-regulate the activity of several protein kinases. Some of these protein kinases are the target of selective PKIs currently undergoing clinical trials.

The S-nitrosylation of EGFR cysteine residues at position 166 and 305 leads to its inactivation in fibroblast and neuroblastoma cells, respectively [137,138]. Ruano et al., also demonstrated that NO-mediated inhibition of human epidermoid carcinoma cells was correlated with the inhibition of EGFR tyrosine phosphorylation and the induction of a tyrosine phosphorylation of a nitric oxide-induced 58 kDa phosphoprotein (NOIPP-58), only in the presence of EGF [139]. Accordingly, but in another context, tyrosine nitration of EGFR, caused by NO derived from iNOS, induces a decrease in tyrosine phosphorylation and an inhibition of neural stem cell proliferation [140].

In addition, the MEK family proteins ERK1/2 that are targeted by trametinib and cobimetinib in the treatment of *BRAF* mutated metastatic melanoma, are S-nitrosylated by NO. Indeed, NO donors SNP or GSNO led to increase in ERK1/2 S-nitrosylation at cysteine residue 183, and a reduction of ERK1/2 phosphorylation that can trigger cell growth inhibition and apoptosis of cancer cells [141,142]. Similarly, S-nitrosylated Akt (cysteine residue 224) [143] and nitrated Janus kinase-2 (JAK2) (tyrosine residues 1007 and 1008) [144] can negatively control both oncogenic PI3K/Akt and JAK2/STAT signaling pathways. These oncogenic pathways in various types of cancer are targeted by selective inhibitory molecules. Idelalisib and copenalisip (PI3K inhibitors) in the treatment of chronic lymphoid leukemia (CLL), non-Hodgkin lymphoma (NHL), follicular lymphoma (FL) and ruxolitinib (JAK2 inhibitor) in the treatment of myelofibrosis [145]. Several other protein kinases including STAT3, JNK and IKK  $\beta$  involved in growth factors or cytokine-mediated signaling pathways are also targeted by NO. STAT3, a key partner of JAK2 in IL-6 mediated signaling pathways, was inhibited by S-nitrosylation at cysteine residue 259 by the NO donor (GSNO) or through iNOS activation. This was associated with decreased cancer cell proliferation and increased apoptosis [146,147]. Also, JNK proteins (JNK1, 2, 3) are S-nitrosylated upon NO generation via interferon gamma (IFN $\gamma$ )-induced iNOS or the NO-donor SNAP in murine microglial cells thus suppressing their interaction and kinase activity [7]. Finally, the IKK $\beta$  kinase activity was also repressed by S-nitrosylation (Cysteine 179). Such effect caused inhibition of the enzymatic activity of this kinase preventing the activation of an essential cell survival pathway, the classical NF-kB pathway [148,149].

#### 4.3.3. Effect of NO on PKIs-mediated cell death

In addition to the different relationships between NO and kinase inhibitors mentioned above, NO can synergize with certain kinase inhibitors to induce death or inhibit the proliferation of cancer cells. Studies have shown that two EGFR signaling pathway inhibitors erlotinib and ZD1839 synergized with NO donors, NO-aspirin and SNP, to induced antiproliferative effect or cell death in several lung and prostatic cancer cell lines, respectively [150,151].

A synergistic effect, between PKIs and NO in promoting cancer cell death, has been also observed with other PKIs currently undergoing preclinical studies. Indeed, H89 (N-[2-bromocinnamylamino]ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide) is a small molecule that has always been known as PKA inhibitor [152]. Although Davies and collaborators showed that H89 is able to inhibit at least 8 other kinases, such as MSK1, S6K1, ROCK II, AMPK, CHK1, K $\beta$ , MAPKAP-K1b and SGK [13]. H89 structure is similar to ATP, so this small molecule is able to inhibit kinases activity competitively with ATP [153]. Some studies used H89 to assess the role of PKA in different tissues *in vitro*, such as heart muscle, liver, smooth muscle, epithelial cells and neuronal tissue [154-158]. Moreover, H89 also has an activity *in vivo* as an anti-

inflammatory strategy to treat inflammation in mice [159]. Unfortunately, the role of H89 in cancer is not well established. Recent studies have shown that H89 is able to enhance tetrandrine (a bisbenzylisoquinoline alkaloid) and HA22 (moxetumomab pasudotox) effect on human cancer cells *in vitro* and *in vivo* [160,161]. Recently, Li and coworkers showed that H89 is able to improve the activity of the oncolytic virus M1 to induce tumor regression in various cancer cells [162]. The relationship between H89 and NO is not clearly understood. The anti-tumor effect of the NO-donor nitroglycerin (NTG) is well established in various cancer types. Some studies have shown that the combination of H89 and NTG enhances cell death in colon cancer cells. Indeed, H89 induces reactive oxygen species (ROS) production which combined with NO, triggers apoptotic cell death by caspase activation [163]. Even if H89 is primarily known for kinases inhibition, Boina-Ali and coworkers showed that the molecule induces an unexpected Akt activation. In fact, Akt activation induced by H89 sensitizes colon cancer cells to death induced by NTG and triciribine (an Akt inhibitor) [164].

### 5. PKIs and NO donors: Towards potential combinatory treatments?

Over the last two decades, the clinical development and approval of a growing number of novel PKIs have tremendously improved the landscape of targeted therapies to treat cancer. Despite significant clinical benefits (improvement in OS and PFS) observed for some patients, persistent tumor intrinsic resistance or acquired resistance to PKIs are still a limitation of treatment. How to make the best use of PKIs to treat cancer patients remains an open question. To this end, better knowledge of the molecular mechanisms of resistance currently represents an intensive area of research to achieve durable efficacy.

As a hallmark of cancer cell development, novel mutations mediating resistance to PKIs occurs inevitably and rapidly with the emergence of resistant tumor clones. A first strategy consisted in developing the so called “next-generation” PKIs in order to improve over and over again their potency and selectivity toward specific newly mutated kinases. Indeed, the difficulty to circumvent protein kinase mutational resistance is well exemplified by EA1045, a fourth-generation EGFR PKI under current preclinical investigation [165]. Although EA1045 seems to unveil encouraging results in terms of overcoming resistance to the third-generation EGFR PKI in advanced NSCLC models, clinical trials with EA1045 have not been conducted yet. In the era of precision medicine, the design and development of novel generation of PKIs is a perpetual challenge in an attempt to maximize clinical benefit.

The second approach consists in combining PKIs with chemotherapeutic agents. Major success on combination therapies has been realized in cancer but the design of more personalized treatment is needed. PKIs are signaling therapeutic agents designed to mainly target some of the fundamental hallmarks of cancer *i.e.* cell proliferation, cell survival and tumor angiogenesis. Various clinical trials studying combinatorial strategies of such cytostatic agents with cytotoxic agents like chemotherapeutic drugs (soliciting other hallmarks of cancer) have been focused on NSCLC patients. Many clinical trials have demonstrated the clinical benefit of certain VEGFR-PKIs when combined with chemotherapy in NSCLC patients [166]. However, whether the combinations of either VEGFR-PKIs or EGFR-PKIs with various chemotherapeutic agents present higher efficiency than with PKIs alone in advanced NSCLC remain controversial [167-169]. From a molecular perspective, one possible explanation may in part account for p53 mutational status. *TP53* tumor suppressor gene is the most frequently mutated genes in cancers. It is well documented that p53 is associated with resistance to many chemotherapeutic agents [170]. Because of high frequency p53 mutations in tumors, the activation of alternative cell death pathways in a p53-independent manner, such as apoptosis promoted by cytokines of the Tumor Necrosis Factor (TNF) family, should be considered. A growing number of studies have demonstrated

sensitizing effect of NO to tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) [171], Fas Ligand (FasL) [172], and TNF  $\alpha$  [173] mediated apoptosis in cancer cells. A limited number of proteins modified by either S-nitrosylation or nitration processes are known to drive cell death pathways (for review [6]).

Interestingly, a substantial body of evidences indicate that NO-based treatment (particularly via NO donors) could potentially contribute to overcome resistance to PKIs in cancer patients.

It is now well recognized that NO-mediated post-translational modifications influence cell signaling in a similar extent as for phosphorylation or other major post-translation modification such as ubiquitination [174]. S-nitrosylation is a critical regulator of phosphorylation, ubiquitination or acetylation for example. S-nitrosylation is also an important regulatory mechanism of several protein kinases and subsequent post-translational modification by phosphorylation. Even though protein post-translation modification by S-nitrosylation can either activate or inhibit enzymatic activities, S-nitrosylated protein kinases are most likely inhibited [174]. NO can alter protein kinase activity not only by S-nitrosylation of the cysteine residue in its catalytic domain, but also by preventing the binding to its downstream target. Consistently, tyrosine nitration can also change the function of key proteins involved in cellular signaling events. Phosphorylation and nitration can occur within the same tyrosine residue. Since tyrosine nitration rather inhibits than activate the function of proteins, tyrosine nitration may cooperate with PKIs to efficiently prevent phosphorylation events and downstream signaling pathways that control cancer cell growth. Thus, NO has the added benefit to act not only as a multi-targeted kinase inhibitor but also as inhibitor of numerous protein substrates which are of particular interest to overcome PKI resistance-mediated activation of redundant and alternative signaling pathways.

Recent preclinical reports currently abound for the development of NO donors to overcome primary or acquired resistance to PKIs. For example, NO donor/natural product hybrids represent a promising anticancer strategy to potentiate different PKIs anti-cancer properties. Indeed, an oleanolic acid/hederagenin-NO donor hybrid has demonstrated potent cytotoxicity against gefitinib-resistant (EGFR—L858R/T790M mutations) and osimertinib-resistant (EGFR-L858R/T790M/C797S mutations) NSCLC cancer cells. This novel NO-donor hybrid represents a potent compound to overcome frequent EGFR-PKI resistance in NSCLC lung cancer [175]. The design of a dual-functional inhibitor NO donor/selective STAT3 inhibitor ((NO)-releasing quinolone-1,2,4-triazole/oxime hybrid) significantly improved the cytotoxicity of melanoma cell lines with BRAF V600E mutant and resistant to BRAF inhibitors [176]. Interestingly, in a previous report, a series of NO donor/EGFR inhibitors (phenylsulfonylfuroxan-based anilino-pyrimidines) harbouring a strong activity against EGFR T790M mutant, had yet demonstrated EGFR kinase inhibitory and antiproliferative potential against EGFR mutated NSCLC cell lines [177].

The treatment of the Bcr-Abl<sup>+</sup> CML cell line K562 with the NO donor sodium nitroprusside has shown to enhance imatinib-mediated apoptosis [178]. Moreover, NAC mediated scavenging of ROS in Bcr-Abl<sup>+</sup> CML cell lines and primary cells from CML patients (imatinib-resistant and imatinib-sensitive cells) co-treated with imatinib is correlated with enhanced production of NO and subsequent NO-dependent cell death [178].

Vemurafenib-mediated growth inhibition of the BRAF V600E melanoma cell line A375 has been shown to be dependent on the production of the superoxide anion O<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO [179]. These results suggest a peroxynitrite-dependent cytotoxicity involving protein tyrosine nitration. Thus, NO appears as a key factor for PKI efficacy which sustains the rationale for the development of novel combination therapies PKI/NO donor.

Preclinical studies demonstrated that vemurafenib-mediated anti-tumor activities can be enhanced by abrogating nucleus translocation of NF- $\kappa$ B p50/p65 [179]. On the other hand, NO (either endogenously produced or released by NO donors) can inhibit the activation of the

NF- $\kappa$ B pathway through the S-nitrosylation of IKK  $\beta$ , p50, p65 and cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1) [148,173,180-182].

## 6. Concluding remarks

The mode of action of both PKIs and NO-based protein post-translational modifications revealed functional overlaps for some oncogenic targets underlying an interest in PKIs and NO donors combination in cancer therapy. In this context, the effect of NO (S-nitrosylation or nitration) could possibly overcome PKI resistance. Whether it acts through a direct or indirect way, NO may exert a regulatory control over protein kinases involved in important cancer signaling pathways as observed with PKIs.

A growing number of clinical studies have evaluated the NO donor NTG as an anticancer drug in combination with either radiotherapy or chemotherapy agents. The majority of clinical studies were conducted in patients with NSCLC. The results obtained for the first phase II trial demonstrated clinical benefit (improved overall survival) for patients treated with the combination therapy NTG/vinorelbine and cisplatin [183].

New combinatorial treatments, designed with PKIs currently approved by the FDA and NO donors (such as NTG), have never been explored yet. Studies are needed to determine whether the use of NO donors would enhance the effectiveness of PKIs in cancer treatment.

The authors declare no conflicts of interest

## CRediT authorship contribution statement

**Silvia Ghione:** Writing - original draft. **Nesrine Mabrouk:** Writing - original draft. **Catherine Paul:** Writing - original draft. **Ali Bettaieb:** Writing - original draft. **Stéphanie Plenchette:** Writing - original draft, Writing - review & editing.

## Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from “Région Bourgogne, France”; “Ligue Contre le Cancer (Conférence de coordination Interrégionale Est JMG/SP - n°41AJ.2019), France”; “Qatar Foundation, Qatar”.

## References

- [1] L.J. Wilson, A. Linley, D.E. Hammond, F.E. Hood, J.M. Coulson, D.J. MacEwan, S.J. Ross, J.R. Slupsky, P.D. Smith, P.A. Evers, I.A. Prior, New Perspectives, Opportunities, and Challenges in Exploring the Human Protein Kinome, *Cancer Res.* 78 (1) (2018) 15–29.
- [2] F. Ardito, M. Giuliani, D. Perrone, G. Troiano, L. Lo Muzio, The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review), *Int. J. Mol. Med.* 40 (2) (2017) 271–280.
- [3] J. Cienas, E. Zalyte, A. Bairoch, P. Gaudet, Kinases and Cancer, *Cancers (Basel)* 10 (3) (2018).
- [4] A. Tsatsanis, D.A. Spandidos, The role of oncogenic kinases in human cancer (Review), *Int. J. Mol. Med.* 5 (6) (2000) 583–590.
- [5] R. Kannaiyan, D. Mahadevan, A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy, *Expert Rev. Anticancer Ther.* 18 (12) (2018) 1249–1270.
- [6] S. Plenchette, S. Romagny, V. Laurens, A. Bettaieb, NO and cancer: itinerary of a double agent, *Med Sci (Paris)* 32 (6–7) (2016) 625–633.
- [7] S. Plenchette, S. Romagny, V. Laurens, A. Bettaieb, S-Nitrosylation in TNF superfamily signaling pathway: Implication in cancer, *Redox Biol.* 6 (2015) 507–515.
- [8] A. Bettaieb, S. Plenchette, C. Paul, V. Laurens, S. Romagny, J.F. Jeannin, S-Nitrosylation in Cancer Cells: To Prevent or to Cause? in: B. Bonavida (Ed.), *Nitric Oxide and Cancer: Pathogenesis and Therapy*, Springer, 2015, pp. 97–105.
- [9] D. Vasudevan, D.D. Thomas, Insights into the diverse effects of nitric oxide on tumor biology, *Vitam. Horm.* 96 (2014) 265–298.
- [10] A.J. Burke, F.J. Sullivan, F.J. Giles, S.A. Glynn, The yin and yang of nitric oxide in cancer progression, *Carcinogenesis* 34 (3) (2013) 503–512.
- [11] M.W. Foster, D.T. Hess, J.S. Stamler, Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective, *Trends Mol. Med.* 15 (9) (2009) 391–404.
- [12] L.A. Ridnour, D.D. Thomas, S. Donzelli, M.G. Espey, D.D. Roberts, D.A. Wink, J.S. Isenberg, The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology, *Antioxid. Redox Signal.* 8 (7–8) (2006) 1329–1337.
- [13] S.P. Davies, H. Reddy, M. Caiwano, P. Cohen, Specificity and mechanism of action

- of some commonly used protein kinase inhibitors, *Biochem. J.* 351 (Pt 1) (2000) 95–105.
- [14] B.J. Druker, M. Talpaz, D.J. Resta, B. Peng, E. Buchdunger, J.M. Ford, N.B. Lydon, H. Kantarjian, R. Capdeville, S. Ohno-Jones, C.L. Sawyers, Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.* 344 (14) (2001) 1031–1037.
- [15] M.J. Pishvaian, R. Slack, E.Y. Koh, J.H. Beumer, M.L. Hartley, I. Cotarla, J. Deeken, A.R. He, J. Hwang, S. Malik, K. Firozvi, M. Liu, B. Elston, S. Strychor, M.J. Egorin, J.L. Marshall, A Phase I clinical trial of the combination of imatinib and paclitaxel in patients with advanced or metastatic solid tumors refractory to standard therapy, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 70 (6) (2012) 843–853.
- [16] G.D. Demetri, M. von Mehren, C.D. Blanke, A.D. Van den Abbeele, B. Eisenberg, P.J. Roberts, M.C. Heinrich, D.A. Tuveson, S. Singer, M. Janicek, J.A. Fletcher, S.G. Silverman, S.L. Silberman, R. Capdeville, B. Kiese, B. Peng, S. Dimitrijevic, B.J. Druker, C. Corless, C.D. Fletcher, H. Joensuu, Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors, *N. Engl. J. Med.* 347 (7) (2002) 472–480.
- [17] B.J. Druker, Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML, *Blood* 112 (13) (2008) 4808–4817.
- [18] G.A. McArthur, Dermatofibrosarcoma protuberans: a surgical disease with a molecular savior, *Curr. Opin. Oncol.* 18 (4) (2006) 341–346.
- [19] I. Kufareva, R. Abagyan, Type-II kinase inhibitor docking, screening, and profiling using modified structures of active kinase states, *J. Med. Chem.* 51 (24) (2008) 7921–7932.
- [20] M. Suttorp, M. Bornhäuser, M. Metzler, F. Millot, E. Schleyer, Pharmacology and pharmacokinetics of imatinib in pediatric patients, *Expert Rev Clin Pharmacol* 11 (3) (2018) 219–231.
- [21] M.M. Gounder, M.R. Mahoney, B.A. Van Tine, V. Ravi, S. Attia, H.A. Deshpande, A.A. Gupta, M.M. Milhem, R.M. Conry, S. Movva, M.J. Pishvaian, R.F. Riedel, T. Sabagh, W.D. Tap, N. Horvat, E. Basch, L.H. Schwartz, R.G. Maki, N.P. Agaram, R.A. Lefkowitz, Y. Mazaheri, R. Yamashita, J.J. Wright, A.C. Dueck, G.K. Schwartz, Sorafenib for Advanced and Refractory Desmoid Tumors, *N. Engl. J. Med.* 379 (25) (2018) 2417–2428.
- [22] P. Rutkowski, E. Bylina, A. Klimczak, T. Switaj, S. Falkowski, J. Kroc, I. Lugowska, M. Brzeskwiniewicz, W. Melerowicz, C. Osuch, E. Mierzejewska, K. Wasielewski, A. Woźniak, U. Grzesiakowska, Z.I. Nowecki, J.A. Siedlecki, J. Limon, The outcome and predictive factors of sunitinib therapy in advanced gastrointestinal stromal tumors (GIST) after imatinib failure - one institution study, *BMC Cancer* 12 (2012) 107.
- [23] M. Capozzi, C. De Divitiis, A. Ottaiano, C. von Arx, S. Scala, F. Tatangelo, P. Delrio, S. Tafuto, Lenvatinib, a molecule with versatile application: from preclinical evidence to future development in anti-cancer treatment, *Cancer Manag Res* 11 (2019) 3847–3860.
- [24] T.J. Ettrich, T. Seufferlein, Regorafenib, *Recent Results Cancer Res.* 211 (2018) 45–56.
- [25] Y. Liu, N.S. Gray, Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations, *Nat. Chem. Biol.* 2 (7) (2006) 358–364.
- [26] A.F. Rahmani, H.M. Korashy, M.G. Kassem, Gefitinib, *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol* 39 (2014) 239–264.
- [27] W. Yang, K. Li, J. Yu, C. Shou, Q. Zhang, Y. Hong, J. Sun, H. Yu, Y. Gao, Q. Shen, Z. Zhao, S. Zheng, Clinical outcomes of imatinib dose escalation versus sunitinib in first-line imatinib-failure gastrointestinal stromal tumour, *Scand. J. Gastroenterol.* 53 (10–11) (2018) 1328–1334.
- [28] Y. Ohe, F. Imamura, N. Nogami, I. Okamoto, T. Kurata, T. Kato, S. Sugawara, S.S. Ramalingam, H. Uchida, R. Hodge, S.L. Wovler, A. Walding, K. Nakagawa, Osimertinib versus standard-of-care EGFR-TKI as first-line treatment for EGFRm advanced NSCLC: FLAURA Japanese subset, *Jpn. J. Clin. Oncol.* 49 (1) (2019) 29–36.
- [29] W. Zhang, D. Heinzmann, J.F. Grippo, Clinical Pharmacokinetics of Vemurafenib, *Clin. Pharmacokinet.* 56 (9) (2017) 1033–1043.
- [30] M. Das Thakur, F. Salangsang, A.S. Landman, W.R. Sellers, N.K. Pryer, M.P. Levesque, R. Dummer, M. McMahon, D.D. Stuart, Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance, *Nature* 494 (7436) (2013) 251–255.
- [31] V. Lamba, I. Ghosh, New directions in targeting protein kinases: focusing upon true allosteric and bivalent inhibitors, *Curr. Pharm. Des.* 18 (20) (2012) 2936–2945.
- [32] R. Zeiser, H. Andrlóvá, F. Meiss, Trametinib (GSK1120212), *Recent Results Cancer Res.* 211 (2018) 91–100.
- [33] E.D. Deeks, Ibrutinib: A Review in Chronic Lymphocytic Leukaemia, *Drugs* 77 (2) (2017) 225–236.
- [34] M.S. Cohen, C. Zhang, K.M. Shokat, J. Taunton, Structural bioinformatics-based design of selective, irreversible kinase inhibitors, *Science* 308 (5726) (2005) 1318–1321.
- [35] B.N. Rexer, J.A. Engelman, C.L. Arteaga, Overcoming resistance to tyrosine kinase inhibitors: lessons learned from cancer cells treated with EGFR antagonists, *Cell Cycle* 8 (1) (2009) 18–22.
- [36] H. Kantarjian, C. Sawyers, A. Hochhaus, F. Guilhot, C. Schiffer, C. Gambacorti-Passerini, D. Niederwieser, D. Resta, R. Capdeville, U. Zoellner, M. Talpaz, B. Druker, J. Goldman, S.G. O'Brien, N. Russell, T. Fischer, O. Ottmann, P. Cony-Makhoul, T. Facon, R. Stone, C. Miller, M. Tallman, R. Brown, M. Schuster, T. Loughran, A. Gratwohl, F. Mandelli, G. Saglio, M. Lazzarino, D. Russo, M. Baccarani, E. Morra, S.C.S. Group, Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia, *N. Engl. J. Med.* 346 (9) (2002) 645–652.
- [37] G. Gugliotta, F. Castagnetti, M. Breccia, L. Levato, M. D'Adda, F. Stagno, M. Tiribelli, M. Salvucci, C. Fava, B. Martino, M. Cedrone, M. Bocchia, E. Trabacchi, F. Cavazzini, E. Usala, A. Russo Rossi, M.T. Bocchicchio, S. Soverini, G. Alimena, M. Cavo, F. Pane, G. Martinelli, G. Saglio, M. Baccarani, G. Rosti, G.C.W. Party, Long-term outcome of a phase 2 trial with nilotinib 400 mg twice daily in first-line treatment of chronic myeloid leukemia, *Haematologica* 100 (9) (2015) 1146–1150.
- [38] P. Ramirez, J.F. DiPersio, Therapy options in imatinib failures, *Oncologist* 13 (4) (2008) 424–434.
- [39] M. Deininger, E. Buchdunger, B.J. Druker, The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia, *Blood* 105 (7) (2005) 2640–2653.
- [40] S. Soverini, A. Hochhaus, F.E. Nicolini, F. Gruber, T. Lange, G. Saglio, F. Pane, M.C. Müller, T. Ernst, G. Rosti, K. Porkka, M. Baccarani, N.C. Cross, G. Martinelli, BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet, *Blood* 118 (5) (2011) 1208–1215.
- [41] M.M. Schittenhelm, S. Shiraga, A. Schroeder, A.S. Corbin, D. Griffith, F.Y. Lee, C. Bokemeyer, M.W. Deininger, B.J. Druker, M.C. Heinrich, Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies, *Cancer Res.* 66 (1) (2006) 473–481.
- [42] L.J. Lombardo, F.Y. Lee, P. Chen, D. Norris, J.C. Barrish, K. Behnia, S. Castaneda, L.A. Cornelius, J. Das, A.M. Doweiko, C. Fairchild, J.T. Hunt, I. Inigo, K. Johnston, A. Kamath, D. Kan, H. Klei, P. Marathe, S. Pang, R. Peterson, S. Pitt, G.L. Schieven, R.J. Schmidt, J. Tokarski, M.L. Wen, J. Wityak, R.M. Borzilleri, Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/ABL kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays, *J. Med. Chem.* 47 (27) (2004) 6658–6661.
- [43] P. La Rosée, A.S. Corbin, E.P. Stoffregen, M.W. Deininger, B.J. Druker, Activity of the Bcr-Abl kinase inhibitor PD180970 against clinically relevant Bcr-Abl isoforms that cause resistance to imatinib mesylate (Gleevec, STI571), *Cancer Res.* 62 (24) (2002) 7149–7153.
- [44] B.J. Huntly, A.G. Reid, A.J. Bench, L.J. Campbell, N. Telford, P. Shepherd, J. Szer, H.M. Prince, P. Turner, C. Grace, E.P. Nacheva, A.R. Green, Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia, *Blood* 98 (6) (2001) 1732–1738.
- [45] P.B. Sinclair, E.P. Nacheva, M. Leversha, N. Telford, J. Chang, A. Reid, A. Bench, K. Champion, B. Huntly, A.R. Green, Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia, *Blood* 95 (3) (2000) 738–743.
- [46] D. Joshi, S. Chandrakala, S. Korgaonkar, K. Ghosh, B.R. Vundinti, Down-regulation of miR-199b associated with imatinib drug resistance in 9q34.1 deleted BCR/ABL positive CML patients, *Gene* 542 (2) (2014) 109–112.
- [47] R.P. Dematteo, K.V. Ballman, C.R. Antonescu, R.G. Maki, P.W. Pisters, G.D. Demetri, M.E. Blackstein, C.D. Blanke, M. von Mehren, M.F. Brennan, S. Patel, M.D. McCarter, J.A. Polikoff, B.R. Tan, K. Owzar, A.C.o.S.O.G.A.I.A.G.S. Team, Adjuvant imatinib mesylate after resection of localised, primary gastrointestinal stromal tumour: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet* 373 (9669) (2009) 1097–1104.
- [48] H. Joensuu, M. Eriksson, K. Sundby Hall, J.T. Hartmann, D. Pink, J. Schütte, G. Ramadori, P. Hohenberger, J. Duyster, S.E. Al-Batran, M. Schlemmer, S. Bauer, E. Wardelmann, M. Sarlomo-Rikala, B. Nilsson, H. Sihto, O.R. Monge, P. Bono, R. Kallio, A. Vehtari, M. Leinonen, T. Alvegård, P. Reichardt, One vs three years of adjuvant imatinib for operable gastrointestinal stromal tumor: a randomized trial, *JAMA* 307 (12) (2012) 1265–1272.
- [49] M.C. Heinrich, C.L. Corless, G.D. Demetri, C.D. Blanke, M. von Mehren, H. Joensuu, L.S. McGreevey, C.J. Chen, A.D. Van den Abbeele, B.J. Druker, B. Kiese, B. Eisenberg, P.J. Roberts, S. Singer, C.D. Fletcher, S. Silberman, S. Dimitrijevic, J.A. Fletcher, Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor, *J. Clin. Oncol.* 21 (23) (2003) 4342–4349.
- [50] T.J. Lynch, D.W. Bell, R. Sordella, S. Gurubhagavatula, R.A. Okimoto, B.W. Brannigan, P.L. Harris, S.M. Haserlat, J.G. Supko, F.G. Haluska, D.N. Louis, D.C. Christiani, J. Settleman, D.A. Haber, Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib, *N. Engl. J. Med.* 350 (21) (2004) 2129–2139.
- [51] W. Pao, J. Chmielecki, Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer, *Nat. Rev. Cancer* 10 (11) (2010) 760–774.
- [52] A.F. Gazdar, Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors, *Oncogene* 28 (Suppl 1) (2009) S24–S31.
- [53] R. Rosell, T. Morán, E. Carcereny, V. Quiroga, M.A. Molina, C. Costa, S. Benlloch, M. Tarón, Non-small-cell lung cancer harbouring mutations in the EGFR kinase domain, *Clin. Transl. Oncol.* 12 (2) (2010) 75–80.
- [54] R. Rosell, E. Carcereny, R. Gervais, A. Vergnenegre, B. Massuti, E. Felip, R. Palmero, R. Garcia-Gomez, C. Pallares, J.M. Sanchez, R. Porta, M. Cobo, P. Garrido, F. Longo, T. Moran, A. Insa, F. De Marinis, R. Corre, I. Bover, A. Illiano, E. Dansin, J. de Castro, M. Milella, N. Reguart, G. Altavilla, U. Jimenez, M. Provencio, M.A. Moreno, J. Terrasa, J. Muñoz-Langa, J. Valdivia, D. Isla, M. Domine, O. Molinier, J. Mazieres, N. Baize, R. Garcia-Campelo, G. Robinet, D. Rodriguez-Abreu, G. Lopez-Vivanco, V. Gebbia, L. Ferrera-Delgado, P. Bombardieri, R. Bernabe, A. Bearz, A. Artal, E. Cortesi, C. Rolfo, M. Sanchez-Ronco, A. Drozdowski, C. Queralt, I. de Aguirre, J.L. Ramirez, J.J. Sanchez, M.A. Molina, M. Tarón, L. Paz-Ares, S.L.C.G.I.c.w.G.F.d.P.-C.a.A.I.O. Toracic, Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European

- patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial, *Lancet Oncol.* 13 (3) (2012) 239–246.
- [55] J.Y. Douillard, G. Ostoros, M. Cobo, T. Ciuleanu, R. McCormack, A. Webster, T. Milenkova, First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study, *Br. J. Cancer* 110 (1) (2014) 55–62.
- [56] J.C. Yang, J.Y. Shih, W.C. Su, T.C. Hsia, C.M. Tsai, S.H. Ou, C.J. Yu, G.C. Chang, C.L. Ho, L.V. Sequist, A.Z. Dudek, M. Shahidi, X.J. Cong, R.M. Lorence, P.C. Yang, V.A. Miller, Afatinib for patients with lung adenocarcinoma and epidermal growth factor receptor mutations (LUX-Lung 2): a phase 2 trial, *Lancet Oncol.* 13 (5) (2012) 539–548.
- [57] J. Gao, H.R. Li, C. Jin, J.H. Jiang, J.Y. Ding, Strategies to overcome acquired resistance to EGFR TKI in the treatment of non-small cell lung cancer, *Clin. Transl. Oncol.* 21 (10) (2019) 1287–1301.
- [58] T. Nagano, M. Tachihara, Y. Nishimura, Mechanism of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors and a Potential Treatment Strategy, *Cells* 7 (11) (2018).
- [59] S. Kobayashi, T.J. Boggon, T. Dayaram, P.A. Jänne, O. Kocher, M. Meyerson, B.E. Johnson, M.J. Eck, D.G. Tenen, B. Halmos, EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib, *N. Engl. J. Med.* 352 (8) (2005) 786–792.
- [60] D.R. Camidge, W. Pao, L.V. Sequist, Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11 (8) (2014) 473–481.
- [61] K. Uchibori, M. Satouchi, N. Sueoka-Aragane, Y. Urata, A. Sato, F. Imamura, T. Inoue, M. Tachihara, K. Kobayashi, N. Katakami, C. Kokan, T. Hirashima, K. Iwanaga, M. Mori, K. Aoe, S. Morita, S. Negoro, Phase II trial of gefitinib plus pemetrexed after relapse using first-line gefitinib in patients with non-small cell lung cancer harboring EGFR gene mutations, *Lung Cancer* 124 (2018) 65–70.
- [62] X. Hu, W. Chen, X. Li, C. Zhao, C. Zhang, F. Xiong, H. Wu, Clinical efficacy analysis of Osimertinib treatment for a patient with leptomeningeal metastasis of EGFR + non-small cell lung cancer without the T790M mutation, *Ann Palliat Med* 8 (5) (2019) 525–531.
- [63] B. Escudier, T. Eisen, W.M. Stadler, C. Szczylik, S. Oudard, M. Siebels, S. Negrier, C. Chevreau, E. Solska, A.A. Desai, F. Rolland, T. Demkow, T.E. Hutson, M. Gore, S. Freeman, B. Schwartz, M. Shan, R. Simantov, R.M. Bukowski's Group, Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma, *N. Engl. J. Med.* 356 (2) (2007) 125–134.
- [64] J.M. Llovet, S. Ricci, V. Mazzaferro, P. Hilgard, E. Gane, J.F. Blanc, A.C. de Oliveira, A. Santoro, J.L. Raoul, A. Forner, M. Schwartz, C. Porta, S. Zeuzem, L. Bolondi, T.F. Greten, P.R. Galle, J.F. Seitz, I. Borbath, D. Häussinger, T. Giannaris, M. Shan, M. Moscovici, D. Voliotis, J. Bruix's I.S. Group, Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma, *N. Engl. J. Med.* 359 (4) (2008) 378–390.
- [65] L. Niu, L. Liu, S. Yang, J. Ren, P.B.S. Lai, G.G. Chen, New insights into sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: Responsible mechanisms and promising strategies, *Biochim. Biophys. Acta. Rev. Cancer* 1868 (2) (2017) 564–570.
- [66] Y.J. Zhu, B. Zheng, H.Y. Wang, L. Chen, New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver cancer, *Acta Pharmacol. Sin.* 38 (5) (2017) 614–622.
- [67] J. Azumi, T. Tsubota, T. Sakabe, G. Shiota, miR-181a induces sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells through downregulation of RASSF1 expression, *Cancer Sci.* 107 (9) (2016) 1256–1262.
- [68] L. Li, J. Tang, B. Zhang, W. Yang, M. Liu, Gao, R. Wang, Y. Tan, J. Fan, Y. Chang, J. Fu, F. Jiang, C. Chen, Y. Yang, J. Gu, D. Wu, L. Guo, D. Cao, H. Li, G. Cao, M. Wu, M.Q. Zhang, L. Chen, H. Wang, Epigenetic modification of miR-429 promotes liver tumour-initiating cell properties by targeting Rb binding protein 4, *Gut* 64 (1) (2015) 156–167.
- [69] Y. Patt, C. Rojas-Hernandez, H.M. Fekrazad, P. Bansal, F.C. Lee, Phase II Trial of Sorafenib in Combination with Capecitabine in Patients with Hepatocellular Carcinoma: INST 08–20, *Oncologist* 22 (10) (2017) 1158–e116.
- [70] G.K. Abou-Alfa, P. Johnson, J.J. Knox, M. Capanu, I. Davidenko, J. Lacava, T. Leung, B. Gansukh, L.B. Saltz, Doxorubicin plus sorafenib vs doxorubicin alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a randomized trial, *JAMA* 304 (19) (2010) 2154–2160.
- [71] C.H. Hsu, Y.C. Shen, Z.Z. Lin, P.J. Chen, Y.Y. Shao, Y.H. Ding, C. Hsu, A.L. Cheng, Phase II study of combining sorafenib with metronomic tegafur/uracil for advanced hepatocellular carcinoma, *J. Hepatol.* 53 (1) (2010) 126–131.
- [72] S.D. Prete, L. Montella, M. Caraglia, L. Maiorino, G. Cennamo, V. Montesarchio, G. Piai, A. Febraro, L. Tarantino, E. Capasso, G. Palmieri, R. Guarrasi, M. Bianco, R. Mamone, C. Savastano, A. Pisano, B. Vincenzi, A. Sabia, A. D'Agostino, V. Faiola, R. Addeo, Sorafenib plus octreotide is an effective and safe treatment in advanced hepatocellular carcinoma: multicenter phase II So.LAR. study, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66 (5) (2010) 837–844.
- [73] A. Meyer, P. Cygan, K. Tolzien, A.G. Galvez, J.D. Bitran, T.M. Lestingi, C. Nabhan, Role of sorafenib in overcoming resistance of chemotherapy-failure castration-resistant prostate cancer, *Clin Genitourin Cancer* 12 (2) (2014) 100–105.
- [74] R.J. Motzer, T.E. Hutson, P. Tomczak, M.D. Michaelson, R.M. Bukowski, O. Rixe, S. Oudard, S. Negrier, C. Szczylik, S.T. Kim, I. Chen, P.W. Bycott, C.M. Baum, R.A. Figlin, Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma, *N. Engl. J. Med.* 356 (2) (2007) 115–124.
- [75] G.D. Demetri, A.T. van Oosterom, C.R. Garrett, M.E. Blackstein, M.H. Shah, J. Verweij, G. McArthur, I.R. Judson, M.C. Heinrich, J.A. Morgan, J. Desai, C.D. Fletcher, S. George, C.L. Bello, X. Huang, C.M. Baum, P.G. Casali, Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial, *Lancet* 368 (9544) (2006) 1329–1338.
- [76] M.C. Heinrich, R.G. Maki, C.L. Corless, C.R. Antonescu, A. Harlow, D. Griffith, A. Town, A. McKinley, W.B. Ou, J.A. Fletcher, C.D. Fletcher, X. Huang, D.P. Cohen, C.M. Baum, G.D. Demetri, Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor, *J. Clin. Oncol.* 26 (33) (2008) 5352–5359.
- [77] D.H. Yoon, M.H. Ryu, B.Y. Ryou, M. Beck, D.R. Choi, Y. Cho, J.L. Lee, H.M. Chang, T.W. Kim, Y.K. Kang, Sunitinib as a second-line therapy for advanced GISTs after failure of imatinib: relationship between efficacy and tumor genotype in Korean patients, *Invest. New Drugs* 30 (2) (2012) 819–827.
- [78] K.S. Gajiwala, J.C. Wu, J. Christensen, G.D. Deshmukh, W. Diehl, J.P. DiNitto, J.M. English, M.J. Greig, Y.A. He, S.L. Jacques, E.A. Lunney, M. McTigue, D. Molina, T. Quenzer, P.A. Wells, X. Yu, Y. Zhang, A. Zou, M.R. Emmett, A.G. Marshall, H.M. Zhang, G.D. Demetri, KIT kinase mutants show unique mechanisms of drug resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor patients, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (5) (2009) 1542–1547.
- [79] T. Nishida, T. Takahashi, A. Nishitani, T. Doi, K. Shirao, Y. Komatsu, K. Nakajima, S. Hirota, J.S.G.o. GIST, Sunitinib-resistant gastrointestinal stromal tumors harbor cis-mutations in the activation loop of the KIT gene, *Int J Clin Oncol* 14 (2) (2009) 143–149.
- [80] J. Gao, Y. Tian, J. Li, N. Sun, J. Yuan, L. Shen, Secondary mutations of c-KIT contribute to acquired resistance to imatinib and decrease efficacy of sunitinib in Chinese patients with gastrointestinal stromal tumors, *Med. Oncol.* 30 (2) (2013) 522.
- [81] T.A. Tran, H.S. Leong, A. Pavia-Jimenez, S. Fedyshyn, J. Yang, B. Kucejova, S. Sivanand, P. Spence, X.J. Xie, S. Peña-Llópez, N. Power, J. Brugarolas, Fibroblast Growth Factor Receptor-Dependent and -Independent Paracrine Signaling by Sunitinib-Resistant Renal Cell Carcinoma, *Mol. Cell. Biol.* 36 (13) (2016) 1836–1855.
- [82] N. Yamaguchi, M. Osaki, K. Onuma, T. Yumioka, H. Iwamoto, T. Sejima, H. Kugoh, A. Takenaka, F. Okada, Identification of microRNAs Involved in Resistance to Sunitinib in Renal Cell Carcinoma Cells, *Anticancer Res.* 37 (6) (2017) 2985–2992.
- [83] S.M. Wilhelm, J. Dumas, L. Adnane, M. Lynch, C.A. Carter, G. Schütz, K.H. Thierauch, D. Zopf, Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity, *Int. J. Cancer* 129 (1) (2011) 245–255.
- [84] Y. Saito, T. Takahashi, K. Tanaka, Y. Miyazaki, T. Makino, Y. Kurokawa, M. Yamasaki, K. Nakajima, S. Takiguchi, M. Mori, Y. Doki, Treatment of Regorafenib in Patients with Metastatic or Unresectable Gastrointestinal Stromal Tumor after Failure of Imatinib and Sunitinib, *Gan To Kagaku Ryoho* 45 (1) (2018) 121–123.
- [85] Z. Zhang, T. Jiang, W. Wang, D. Piao, Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumor after failure with imatinib and sunitinib treatment: A meta-analysis, *Medicine (Baltimore)* 96 (48) (2017).
- [86] G.D. Demetri, P. Reichardt, Y.K. Kang, J.Y. Blay, P. Rutkowski, H. Gelderblom, P. Hohenberger, M. Leahy, M. von Mehren, H. Joensuu, G. Badalamenti, M. Blackstein, A. Le Cesne, P. Schöffski, R.G. Maki, S. Bauer, B.B. Nguyen, J. Xu, T. Nishida, J. Chung, C. Kappeler, I. Kuss, D. Laurent, P.G. Casali, G.s. investigators, Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial, *Lancet* 381 (9863) (2013) 295–302.
- [87] C. Tomida, H. Nagano, N. Yamagishi, T. Uchida, A. Ohno, K. Hirasaka, T. Nikawa, S. Teshima-Kondo, Regorafenib induces adaptive resistance of colorectal cancer cells via inhibition of vascular endothelial growth factor receptor, *J Med Invest* 64(3.4) (2017) 262–265.
- [88] N. Kiyota, B. Robinson, M. Shah, A.O. Hoff, M.H. Taylor, D. Li, C.E. Dutcus, E.K. Lee, S.B. Kim, M. Tahara, Defining Radioiodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer: Efficacy and Safety of Lenvatinib by Radioiodine-Refractory Criteria in the SELECT Trial, *Thyroid* 27 (9) (2017) 1135–1141.
- [89] J.E. Frampton, Lenvatinib: A Review in Refractory Thyroid Cancer, *Target Oncol* 11 (1) (2016) 115–122.
- [90] Y.S. Lee, S.M. Kim, B.W. Kim, H.J. Chang, S.Y. Kim, C.S. Park, K.C. Park, H.S. Chang, Anti-cancer Effects of HNHA and Lenvatinib by the Suppression of EMT-Mediated Drug Resistance in Cancer Stem Cells, *Neoplasia* 20 (2) (2018) 197–206.
- [91] M. Luo, L.W. Fu, Redundant kinase activation and resistance of EGFR-tyrosine kinase inhibitors, *Am J Cancer Res* 4 (6) (2014) 608–628.
- [92] M. Saji, M.D. Ringel, The PI3K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors, *Mol. Cell. Endocrinol.* 321 (1) (2010) 20–28.
- [93] M. Ghidini, F. Petrelli, A. Ghidini, G. Tomasello, J.C. Hahne, R. Passalacqua, S. Barni, Clinical development of mTOR inhibitors for renal cancer, *Expert Opin. Invest. Drugs* 26 (11) (2017) 1229–1237.
- [94] F. Shojaei, J.H. Lee, B.H. Simmons, A. Wong, C.O. Esparza, P.A. Plumlee, J. Feng, A.E. Stewart, D.D. Hu-Lowe, J.G. Christensen, HGF/c-Met acts as an alternative angiogenic pathway in sunitinib-resistant tumors, *Cancer Res.* 70 (24) (2010) 10090–10100.
- [95] B. Sennino, D.M. McDonald, Controlling escape from angiogenesis inhibitors, *Nat. Rev. Cancer* 12 (10) (2012) 699–709.
- [96] T. Zhang, K. Dutton-Regester, K.M. Brown, N.K. Hayward, The genomic landscape of cutaneous melanoma, *Pigment Cell Melanoma Res* 29 (3) (2016) 266–283.
- [97] A.M. Menzies, L.E. Haydu, L. Visintin, M.S. Carlino, J.R. Howle, J.F. Thompson, R.F. Kefford, R.A. Scolyer, G.V. Long, Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma, *Clin. Cancer Res.* 18 (12) (2012) 3242–3249.
- [98] H. Davies, G.R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M.J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B.A. Gusterson,

- C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G.J. Riggins, D.D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J.W. Ho, S.Y. Leung, S.T. Yuen, B.L. Weber, H.F. Seigler, T.L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C.J. Marshall, R. Wooster, M.R. Stratton, P.A. Futreal, Mutations of the BRAF gene in human cancer, *Nature* 417 (6892) (2002) 949–954.
- [99] P.B. Chapman, A. Hauschild, C. Robert, J.B. Haanen, P. Ascierto, J. Larkin, R. Dummer, C. Garbe, A. Testori, M. Maio, D. Hogg, P. Lorigan, C. Lebbe, T. Jouary, D. Schadendorf, A. Ribas, S.J. O'Day, J.A. Sosman, J.M. Kirkwood, A.M. Eggermont, B. Dreno, K. Nolop, J. Li, B. Nelson, J. Hou, R.J. Lee, K.T. Flaherty, G.A. McArthur-B.S. Group, Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation, *N. Engl. J. Med.* 364 (26) (2011) 2507–2516.
- [100] S.M. Shaffer, M.C. Dunagin, S.R. Torborg, E.A. Torre, B. Emert, C. Krepler, M. Beqiri, K. Sproesser, P.A. Brafford, M. Xiao, E. Eggen, I.N. Anastopoulos, C.A. Vargas-Garcia, A. Singh, K.L. Nathanson, M. Herlyn, A. Raj, Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance, *Nature* 546 (7658) (2017) 431–435.
- [101] R. Nazarian, H. Shi, Q. Wang, X. Kong, R.C. Koya, H. Lee, Z. Chen, M.K. Lee, N. Attar, H. Sazegar, T. Chodon, S.F. Nelson, G. McArthur, J.A. Sosman, A. Ribas, R.S. Lo, Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation, *Nature* 468 (7326) (2010) 973–977.
- [102] Y. Shao, A.E. Aplin, BH3-only protein silencing contributes to acquired resistance to PLX4720 in human melanoma, *Cell Death Differ.* 19 (12) (2012) 2029–2039.
- [103] N. Komatsu, Y. Fujita, M. Matsuda, K. Aoki, mTORC1 upregulation via ERK-dependent gene expression change confers intrinsic resistance to MEK inhibitors in oncogenic KRas-mutant cancer cells, *Oncogene* 34 (45) (2015) 5607–5616.
- [104] W. Hu, L. Jin, C.C. Jiang, G.V. Long, R.A. Scolyer, Q. Wu, X.D. Zhang, Y. Mei, M. Wu, AEBP1 upregulation confers acquired resistance to BRAF (V600E) inhibition in melanoma, *Cell Death Dis.* 4 (2013) e914.
- [105] A.R. Jazirehi, R. Nazarian, A.X. Torres-Collado, J.S. Economou, Aberrant apoptotic machinery confers melanoma dual resistance to BRAF(V600E) inhibitor and immune effector cells: immunosensitization by a histone deacetylase inhibitor, *Am J Clin Exp Immunol* 3 (1) (2014) 43–56.
- [106] S.J. Welsh, H. Rizos, R.A. Scolyer, G.V. Long, Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: Where to next? *Eur. J. Cancer* 62 (2016) 76–85.
- [107] L. Lisi, E. Laudati, P. Navarra, C. Dello Russo, The mTOR kinase inhibitors polarize glioma-activated microglia to express a M1 phenotype, *J Neuroinflammation* 11 (2014) 125.
- [108] A. Stiff, P. Trikha, R. Wesolowski, K. Kendra, V. Hsu, S. Uppati, E. McMichael, M. Duggan, A. Campbell, K. Keller, I. Landi, Y. Zhong, J. Dubovsky, J.H. Howard, L. Yu, B. Harrington, M. Old, S. Reiff, T. Mace, S. Tridandapani, N. Muthusamy, M.A. Caligiuri, J.C. Byrd, W.E. Carson, Myeloid-Derived Suppressor Cells Express Bruton's Tyrosine Kinase and Can Be Depleted in Tumor-Bearing Hosts by Ibrutinib Treatment, *Cancer Res.* 76 (8) (2016) 2125–2136.
- [109] X. Zhang, X. Fang, Z. Gao, W. Chen, F. Tao, P. Cai, H. Yuan, Y. Shu, Q. Xu, Y. Sun, Y. Gu, Axitinib, a selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor, exerts an anticancer effect in melanoma through promoting antitumor immunity, *Anticancer Drugs* 25 (2) (2014) 204–211.
- [110] V.S. Ghalaut, L. Sangwan, K. Dahiya, P.S. Ghalaut, R. Dhankhar, R. Saharan, Effect of imatinib therapy with and without turmeric powder on nitric oxide levels in chronic myeloid leukemia, *J Oncol Pharm Pract* 18 (2) (2012) 186–190.
- [111] L. Yu, L.X. Gao, X.Q. Ma, F.X. Hu, C.M. Li, Z. Lu, Involvement of superoxide and nitric oxide in BRAF(V600E) inhibitor PLX4032-induced growth inhibition of melanoma cells, *Integr Biol (Camb)* 6 (12) (2014) 1211–1217.
- [112] M. Caraglia, G. Giuberti, M. Marra, R. Addeo, L. Montella, M. Murolo, P. Sperlongano, B. Vincenzi, S. Naviglio, S.D. Prete, A. Abbruzzese, P. Stiuso, Oxidative stress and ERK1/2 phosphorylation as predictors of outcome in hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib plus octreotide LAR, *Cell Death Dis.* 2 (2011) e150.
- [113] R. Dienstmann, I. Braña, J. Rodon, J. Taberero, Toxicity as a biomarker of efficacy of molecular targeted therapies: focus on EGFR and VEGF inhibiting anticancer drugs, *Oncologist* 16 (12) (2011) 1729–1740.
- [114] S. Geiger-Gritsch, B. Stollenwerk, R. Miksad, B. Guba, C. Wild, U. Siebert, Safety of bevacizumab in patients with advanced cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Oncologist* 15 (11) (2010) 1179–1191.
- [115] M.M. An, Z. Zou, H. Shen, P. Liu, M.L. Chen, Y.B. Cao, Y.Y. Jiang, Incidence and risk of significantly raised blood pressure in cancer patients treated with bevacizumab: an updated meta-analysis, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 66 (8) (2010) 813–821.
- [116] A.R. Tinning, C. Bengtson, N.V. Jensen, L. Bastholt, B.L. Jensen, K. Madsen, Pazopanib-Induced Hypertension in Patients With Renal Cell Carcinoma Is Associated With Low Urine Excretion of NO Metabolites, *Hypertension* 71 (3) (2018) 473–480.
- [117] A. Dalbeni, C. Ciccarese, M. Bevilacqua, M. Benati, C. Caimmi, L. Cerrito, F. Famà, R. Iacovelli, A. Mantovani, F.M.A. Meneguzzi, P. Minuz, M. Montagnana, G. Orsolini, M. Rossini, G. Tortora, O. Viapiana, C. Fava, Effects of Antiangiogenic Drugs on Microcirculation and Macrocirculation in Patients with Advanced-Stage Renal Cancer, *Cancers (Basel)* 11 (1) (2018).
- [118] D. Sueta, K. Suyama, A. Sueta, N. Tabata, T. Yamashita, M. Tomiguchi, T. Takeshita, M. Yamamoto-Ibusuki, E. Yamamoto, Y. Izumiya, K. Kaikita, Y. Yamamoto, S. Hokimoto, H. Iwase, K. Tsujita, Lenvatinib, an oral multi-kinases inhibitor, -associated hypertension: Potential role of vascular endothelial dysfunction, *Atherosclerosis* 260 (2017) 116–120.
- [119] N. de Jesus-Gonzalez, E. Robinson, R. Penchev, M. von Mehren, M.C. Heinrich, W. Tap, Q. Wang, G. Demetri, S. George, B.D. Humphreys, Regorafenib induces rapid and reversible changes in plasma nitric oxide and endothelin-1, *Am. J. Hypertens.* 25 (10) (2012) 1118–1123.
- [120] S. Ekmekcioglu, J. Ellerhorst, C.M. Smid, V.G. Prieto, M. Munsell, A.C. Buzaid, E.A. Grimm, Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival, *Clin. Cancer Res.* 6 (12) (2000) 4768–4775.
- [121] M. Vakkala, K. Kahlos, E. Lakari, P. Pääkkö, V. Kinnula, Y. Soini, Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in situ and invasive breast carcinomas, *Clin. Cancer Res.* 6 (6) (2000) 2408–2416.
- [122] S.A. Glynn, B.J. Boersma, T.H. Dorsey, M. Yi, H.G. Yfantis, L.A. Ridnour, D.N. Martin, C.H. Switzer, R.S. Hudson, D.A. Wink, D.H. Lee, R.M. Stephens, S. Ambs, Increased NOS2 predicts poor survival in estrogen receptor-negative breast cancer patients, *J Clin Invest* 120 (11) (2010) 3843–3854.
- [123] C.H. Switzer, S.A. Glynn, R.Y. Cheng, L.A. Ridnour, J.E. Green, S. Ambs, D.A. Wink, S-nitrosylation of EGFR and Src activates an oncogenic signaling network in human basal-like breast cancer, *Mol. Cancer Res.* 10 (9) (2012) 1203–1215.
- [124] H.C. Lee, S. An, H. Lee, S.H. Woo, H.O. Jin, S.K. Seo, T.B. Choe, D.H. Yoo, S.J. Lee, Y.J. Hong, M.J. Park, C.H. Rhee, I.C. Park, S.I. Hong, Activation of epidermal growth factor receptor and its downstream signaling pathway by nitric oxide in response to ionizing radiation, *Mol. Cancer Res.* 6 (6) (2008) 996–1002.
- [125] S. Donnini, F. Finetti, R. Solito, E. Terzuoli, A. Sacchetti, L. Morbidelli, P. Patrignani, M. Ziche, EP2 prostanoid receptor promotes squamous cell carcinoma growth through epidermal growth factor receptor transactivation and iNOS and ERK1/2 pathways, *FASEB J.* 21 (10) (2007) 2418–2430.
- [126] H.W. Lo, S.C. Hsu, M. Ali-Seyed, M. Gunduz, W. Xia, Y. Wei, G. Bartholomeusz, J.Y. Shih, M.C. Hung, Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway, *Cancer Cell* 7 (6) (2005) 575–589.
- [127] P. Garrido, A. Shalaby, E.M. Walsh, N. Keane, M. Webber, M.M. Keane, F.J. Sullivan, M.J. Kerin, G. Callagy, A.E. Ryan, S.A. Glynn, Impact of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression on triple negative breast cancer outcome and activation of EGFR and ERK signaling pathways, *Oncotarget* 8 (46) (2017) 80568–80588.
- [128] M. Shibuya, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies, *Genes Cancer* 2 (12) (2011) 1097–1105.
- [129] S. Ambs, W.G. Merriam, M.O. Ogunfusika, W.P. Bennett, N. Ishibe, S.P. Hussain, E.E. Tzeng, D.A. Geller, T.R. Billiar, C.C. Harris, p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells, *Nat. Med.* 4 (12) (1998) 1371–1376.
- [130] Y. Nakamura, H. Yasuoka, M. Tsujimoto, K. Yoshidome, M. Nakahara, K. Nakao, M. Nakamura, K. Kakudo, Nitric oxide in breast cancer: induction of vascular endothelial growth factor-C and correlation with metastasis and poor prognosis, *Clin. Cancer Res.* 12 (4) (2006) 1201–1207.
- [131] M.A. Rahman, T. Senga, S. Ito, T. Hyodo, H. Hasegawa, M. Hamaguchi, S-nitrosylation at cysteine 498 of c-Src tyrosine kinase regulates nitric oxide-mediated cell invasion, *J. Biol. Chem.* 285 (6) (2010) 3806–3814.
- [132] A. Tyryshkin, F.M. Gorgun, E. Abdel Fattah, T. Mazumdar, L. Pandit, S. Zeng, N.T. Eissa, Src kinase-mediated phosphorylation stabilizes inducible nitric-oxide synthase in normal cells and cancer cells, *J. Biol. Chem.* 285 (1) (2010) 784–792.
- [133] K.H. Lim, B.B. Ancrile, D.F. Kashatus, C.M. Counter, Tumour maintenance is mediated by eNOS, *Nature* 452 (7187) (2008) 646–649.
- [134] C.J. Oliveira, M.F. Curcio, M.S. Moraes, M. Tsujita, L.R. Travassos, A. Stern, H.P. Monteiro, The low molecular weight S-nitrosothiol, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, promotes cell cycle progression in rabbit aortic endothelial cells, *Nitric Oxide* 18 (4) (2008) 241–255.
- [135] E. Lopez-Rivera, P. Jayaraman, F. Parikh, M.A. Davies, S. Ekmekcioglu, S. Izadmeh, D.R. Milton, J.E. Chipuk, E.A. Grimm, Y. Estrada, J. Aguirre-Ghisso, A.G. Sikora, Inducible nitric oxide synthase drives mTOR pathway activation and proliferation of human melanoma by reversible nitrosylation of TSC2, *Cancer Res.* 74 (4) (2014) 1067–1078.
- [136] L. Zhu, L. Li, Q. Zhang, X. Yang, Z. Zou, B. Hao, F.M. Marincola, Z. Liu, Z. Zhong, M. Wang, X. Li, Q. Wang, K. Li, W. Gao, K. Yao, Q. Liu, NOS1, *Cell Death Discov* 3 (2017) 17011.
- [137] C. Estrada, C. Gómez, J. Martín-Nieto, T. De Frutos, A. Jiménez, A. Villalobo, Nitric oxide reversibly inhibits the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, *Biochem. J.* 326 (Pt 2) (1997) 369–376.
- [138] M. Murillo-Carretero, A. Torroglosa, C. Castro, A. Villalobo, C. Estrada, S-Nitrosylation of the epidermal growth factor receptor: a regulatory mechanism of receptor tyrosine kinase activity, *Free Radic Biol Med* 46 (4) (2009) 471–479.
- [139] M.J. Ruano, S. Hernández-Hernando, A. Jiménez, C. Estrada, A. Villalobo, Nitric oxide-induced epidermal growth factor-dependent phosphorylations in A431 tumour cells, *Eur. J. Biochem.* 270 (8) (2003) 1828–1837.
- [140] B.P. Carreira, M.I. Morte, A.I. Santos, A.S. Lourenço, A.F. Ambrósio, C.M. Carvalho, I.M. Araújo, Nitric oxide from inflammatory origin impairs neural stem cell proliferation by inhibiting epidermal growth factor receptor signaling, *Front. Cell. Neurosci.* 8 (2014) 343.
- [141] X. Feng, T. Sun, Y. Bei, S. Ding, W. Zheng, Y. Lu, P. Shen, S-nitrosylation of ERK inhibits ERK phosphorylation and induces apoptosis, *Sci. Rep.* 3 (2013) 1814.
- [142] L. Jin, Y. Cao, T. Zhang, P. Wang, D. Ji, X. Liu, H. Shi, L. Hua, R. Yu, S. Gao, Effects of ERK1/2 S-nitrosylation on ERK1/2 phosphorylation and cell survival in glioma cells, *Int. J. Mol. Med.* 41 (3) (2018) 1339–1348.
- [143] T. Yasukawa, E. Tokunaga, H. Ota, H. Sugita, J.A. Martyn, M. Kaneki, S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance, *J. Biol. Chem.* 280 (9) (2005) 7511–7518.

- [144] T.H. Elsasser, S. Kahl, C.J. Li, J.L. Sartin, W.M. Garrett, J. Rodrigo, Caveolae nitration of Janus kinase-2 at the 1007Y–1008Y site: coordinating inflammatory response and metabolic hormone readjustment within the somatotrophic axis, *Endocrinology* 148 (8) (2007) 3803–3813.
- [145] N.T. Moldogazieva, S.V. Lutsenko, A.A. Terentiev, Reactive Oxygen and Nitrogen Species-Induced Protein Modifications: Implication in Carcinogenesis and Anticancer Therapy, *Cancer Res.* 78 (21) (2018) 6040–6047.
- [146] I. Singh, J. Kim, A.K. Singh, A.K. Sharma, J.S. Won, STAT3 Regulation By S-Nitrosylation: Implication In Cancer, *Redox Biol.* 5 (2015) 416–417.
- [147] K. Kaliyaperumal, A.K. Sharma, D.G. McDonald, J.S. Dhindsa, C. Yount, A.K. Singh, J.S. Won, I. Singh, S-nitrosoglutathione-mediated STAT3 regulation in efficacy of radiotherapy and cisplatin therapy in head and neck squamous cell carcinoma, *Redox Biol.* 6 (2015) 41–50.
- [148] N.L. Reynaert, K. Ckless, S.H. Korn, N. Vos, A.S. Guala, E.F. Wouters, A. van der Vliet, Y.M. Janssen-Heininger, Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (24) (2004) 8945–8950.
- [149] V.A. Yakovlev, L.J. Barani, C.S. Rabender, S.M. Black, J.K. Leach, P.R. Graves, G.E. Kellogg, R.B. Mikkelsen, Tyrosine nitration of IkappaBalpha: a novel mechanism for NF-kappaB activation, *Biochemistry* 46 (42) (2007) 11671–11683.
- [150] J.M. Song, P. Upadhyaya, F. Kassie, Nitric oxide-donating aspirin (NO-Aspirin) suppresses lung tumorigenesis in vitro and in vivo and these effects are associated with modulation of the EGFR signaling pathway, *Carcinogenesis* 39 (7) (2018) 911–920.
- [151] M. Mimeault, N. Jouy, P. Depreux, J.P. Hénichart, Synergistic antiproliferative and apoptotic effects induced by mixed epidermal growth factor receptor inhibitor ZD1839 and nitric oxide donor in human prostatic cancer cell lines, *Prostate* 62 (2) (2005) 187–199.
- [152] T. Chijiwa, A. Mishima, M. Hagiwara, M. Sano, K. Hayashi, T. Inoue, K. Naito, T. Toshioka, H. Hidaka, Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells, *J. Biol. Chem.* 265 (9) (1990) 5267–5272.
- [153] H. Hidaka, M. Hagiwara, T. Chijiwa, Molecular pharmacology of protein kinases, *Neurochem. Res.* 15 (4) (1990) 431–434.
- [154] A. Ferro, M. Coash, T. Yamamoto, J. Rob, Y. Ji, L. Queen, Nitric oxide-dependent beta2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt, *Br. J. Pharmacol.* 143 (3) (2004) 397–403.
- [155] J. Fassett, D. Tobolt, L.K. Hansen, Type I collagen structure regulates cell morphology and EGF signaling in primary rat hepatocytes through cAMP-dependent protein kinase A, *Mol. Biol. Cell* 17 (1) (2006) 345–356.
- [156] A. Robinet, G. Hoizey, H. Millart, PI 3-kinase, protein kinase C, and protein kinase A are involved in the trigger phase of beta1-adrenergic preconditioning, *Cardiovasc. Res.* 66 (3) (2005) 530–542.
- [157] K. Burvall, L. Palmberg, K. Larsson, Expression of TNFalpha and its receptors R1 and R2 in human alveolar epithelial cells exposed to organic dust and the effects of 8-bromo-cAMP and protein kinase A modulation, *Inflamm. Res.* 54 (7) (2005) 281–288.
- [158] K. Kaneishi, Y. Sakuma, H. Kobayashi, M. Kato, 3',5'-cyclic adenosine monophosphate augments intracellular Ca2+ concentration and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release in immortalized GnRH neurons in an Na+ -dependent manner, *Endocrinology* 143 (11) (2002) 4210–4217.
- [159] L.L. Reber, F. Daubeuf, S. Nemska, N. Frossard, The AGC kinase inhibitor H89 attenuates airway inflammation in mouse models of asthma, *PLoS ONE* 7 (11) (2012) e49512.
- [160] M. Yu, T. Liu, Y. Chen, Y. Li, W. Li, Combination therapy with protein kinase inhibitor H89 and Tetrandrine elicits enhanced synergistic antitumor efficacy, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 37 (1) (2018) 114.
- [161] X. Liu, F. Müller, A.S. Wayne, I. Pastan, Protein Kinase Inhibitor H89 Enhances the Activity of Pseudomonas Exotoxin A-Based Immunotoxins, *Mol. Cancer Ther.* 15 (5) (2016) 1053–1062.
- [162] K. Li, J. Liang, Y. Lin, H. Zhang, X. Xiao, Y. Tan, J. Cai, W. Zhu, F. Xing, J. Hu, G. Yan, A classical PKA inhibitor increases the oncolytic effect of M1 virus via activation of exchange protein directly activated by cAMP 1, *Oncotarget* 7 (30) (2016) 48443–48455.
- [163] M. Cortier, R. Boina-Ali, C. Racoecur, C. Paul, E. Solary, J.F. Jeannin, A. Bettaieb, H89 enhances the sensitivity of cancer cells to glyceryl trinitrate through a purinergic receptor-dependent pathway, *Oncotarget* 6 (9) (2015) 6877–6886.
- [164] R. Boina-Ali, M. Cortier, N. Decolonne, C. Racoecur-Godard, C. Seigne, M. Lamrani, J.F. Jeannin, C. Paul, A. Bettaieb, Activation of Akt by mamma lian target rapamycin complex 2 renders colon cancer cells sensitive to apoptosis induced by nitric oxide and Akt inhibitor, *J. Carcinogen. Mutagen.* S8 (2013).
- [165] S. Wang, Y. Song, D. Liu, EA1045: The fourth-generation EGFR inhibitor overcoming T790M and C797S resistance, *Cancer Lett.* 385 (2017) 51–54.
- [166] L. Liu, Y. Zhang, J. Wei, Z. Chen, J. Yu, VEGFR-TKIs combined with chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: A systematic review, *J. Cancer* 10 (4) (2019) 799–809.
- [167] M. Reck, Beyond the TRIBUTE trial: integrating HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitors with chemotherapy in advanced NSCLC, *Future Oncol.* 2 (1) (2006) 47–51.
- [168] M. Wen, J. Xia, Y. Sun, X. Wang, X. Fu, Y. Zhang, Z. Zhang, Y. Zhou, X. Li, Combination of EGFR-TKIs with chemotherapy versus chemotherapy or EGFR-TKIs alone in advanced NSCLC patients with EGFR mutation, *Biologics* 12 (2018) 183–190.
- [169] G. Scagliotti, S. Novello, J. von Pawel, M. Reck, J.R. Pereira, M. Thomas, J.E. Abrão Miziara, B. Balint, F. De Marinis, A. Keller, O. Arén, M. Csollak, I. Albert, C.H. Barrios, F. Grossi, M. Krzakowski, L. Cupit, F. Cihon, S. Dimatteo, N. Hanna, Phase III study of carboplatin and paclitaxel alone or with sorafenib in advanced non-small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.* 28 (11) (2010) 1835–1842.
- [170] P.A. Muller, K.H. Vousden, p53 mutations in cancer, *Nat. Cell Biol.* 15 (1) (2013) 2–8.
- [171] Z. Tang, J.A. Bauer, B. Morrison, D.J. Lindner, Nitrosylcobalamin promotes cell death via S nitrosylation of Apo2L/TRAIL receptor DR4, *Mol. Cell. Biol.* 26 (15) (2006) 5588–5594.
- [172] L. Leon-Bollotte, S. Subramaniam, O. Cauvard, S. Plenchette-Colas, C. Paul, C. Godard, A. Martinez-Ruiz, P. Legembre, J.F. Jeannin, A. Bettaieb, S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells, *Gastroenterology* 140(7) 2009–18 (2018) (2011) e1–4.
- [173] S. Romagny, S. Bouaouiche, G. Lucchi, P. Ducoroy, J.B. Bertoldo, H. Terenzi, A. Bettaieb, S. Plenchette, S-Nitrosylation of cIAP1 Switches Cancer Cell Fate from TNFalpha/TNFR1-Mediated Cell Survival to Cell Death, *Cancer Res.* 78 (8) (2018) 1948–1957.
- [174] D.T. Hess, J.S. Stamler, Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification, *J. Biol. Chem.* 287 (7) (2012) 4411–4418.
- [175] Z. Chen, K.Y. Huang, Y. Ling, M. Goto, H.Q. Duan, X.H. Tong, Y.L. Liu, Y.Y. Cheng, S.L. Morris-Natschke, P.C. Yang, S.L. Yang, K.H. Lee, Discovery of an Oleanolic Acid/Hederagenin-Nitric Oxide Donor Hybrid as an EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor for Non-Small-Cell Lung Cancer, *J. Nat. Prod.* 82 (11) (2019) 3065–3073.
- [176] T.S. Kaoud, A.M. Mohassab, H.A. Hassan, C. Yan, S.X. Van Ravenstein, D. Abdelhamid, K.N. Dalby, M. Abdel-Aziz, NO-releasing STAT3 inhibitors suppress BRAF-mutant melanoma growth, *Eur. J. Med. Chem.* 186 (2020) 111885.
- [177] C. Han, Z. Huang, C. Zheng, L. Wan, Y. Lai, S. Peng, K. Ding, H. Ji, Y. Zhang, Nitric oxide donating anilinopyrimidines: synthesis and biological evaluation as EGFR inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 66 (2013) 82–90.
- [178] S. Rakshit, J. Bagchi, L. Mandal, D. Ganguly, S. Bhattacharjee, M. Ghosh, N. Biswas, U. Chaudhuri, S. Bandyopadhyay, N-acetyl cysteine enhances imatinib-induced apoptosis of Bcr-Abl+ cells by endothelial nitric oxide synthase-mediated production of nitric oxide, *Apoptosis* 14 (3) (2009) 298–308.
- [179] J. Hao, W. Fan, Y. Li, R. Tang, C. Tian, Q. Yang, T. Zhu, C. Diao, S. Hu, M. Chen, P. Guo, Q. Long, C. Zhang, G. Qin, W. Yu, L. Li, L. Qin, J. Wang, X. Zhang, Y. Ren, P. Zhou, L. Zou, K. Jiang, W. Guo, W. Deng, Melatonin synergizes BRAF-targeting agent vemurafenib in melanoma treatment by inhibiting iNOS/hTERT signaling and cancer-stem cell traits, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38 (1) (2019) 48.
- [180] M. Colasanti, T. Persichini, Nitric oxide: an inhibitor of NF-kappaB/Rel system in glial cells, *Brain Res. Bull.* 52 (3) (2000) 155–161.
- [181] H.E. Marshall, J.S. Stamler, Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation, *Biochemistry* 40 (6) (2001) 1688–1693.
- [182] M. Chattopadhyay, S. Goswami, D.B. Rodes, R. Kodala, C.A. Velazquez, D. Boring, J.A. Crowell, K. Kashfi, NO-releasing NSAIDs suppress NF-kB signaling in vitro and in vivo through S-nitrosylation, *Cancer Lett.* 298 (2) (2010) 204–211.
- [183] H. Yasuda, M. Yamaya, K. Nakayama, T. Sasaki, S. Ebihara, A. Kanda, M. Asada, D. Inoue, T. Suzuki, T. Okazaki, H. Takahashi, M. Yoshida, T. Kaneta, K. Ishizawa, S. Yamanda, N. Tomita, M. Yamasaki, A. Kikuchi, H. Kubo, H. Sasaki, Randomized phase II trial comparing nitroglycerin plus vinorelbine and cisplatin with vinorelbine and cisplatin alone in previously untreated stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.* 24 (4) (2006) 688–794.

3. Article : Tumor-derived granzyme B-expressing neutrophils acquire antitumor potential after lipid A treatment

# Tumor-derived granzyme B-expressing neutrophils acquire antitumor potential after lipid A treatment

Amandine Martin<sup>1,2,\*</sup>, Cédric Seigneur<sup>1,2,\*</sup>, Cindy Racoer<sup>1,2</sup>, Nicolas Isambert<sup>1,2,3</sup>, Nesrine Mabrouk<sup>1,2</sup>, Alessandra Scagliarini<sup>1,2</sup>, Sylvie Reveneau<sup>1,2</sup>, Laurent Arnould<sup>3</sup>, Ali Bettaieb<sup>1,2</sup>, Jean-François Jeannin<sup>1,2</sup> and Catherine Paul<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers, EPHE, PSL Research University, 75000 Paris, France

<sup>2</sup>LIIC, EA7269, Université de Bourgogne Franche Comté, 21000 Dijon, France

<sup>3</sup>Centre Georges-François Leclerc, Dijon, F-21000, France

\*These authors contributed equally to this work

**Correspondence to:** Catherine Paul, **email:** catherine.paul@u-bourgogne.fr

**Keywords:** tumor-associated neutrophils; granzyme B; colon cancer; immune response; lipid A

**Received:** September 19, 2017

**Accepted:** April 21, 2018

**Published:** June 19, 2018

**Copyright:** Martin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## ABSTRACT

**Neutrophils are known to possess both pro- and anti-tumor properties, a feature that could be related to the diversity and plasticity of these cells. Here we explored the hypothesis that under an appropriate environment and stimuli, neutrophils could induce an effective response against tumor cells. In a rat and mouse models, we show that a substantial amount of colon tumor associated-neutrophils (TAN) expressed the cytolytic enzyme granzyme B, which is absent in spleen or blood circulating neutrophils. This TAN population was also found into tumors of patients with colon cancer. Tumor neutrophil infiltration was correlated with an increase of chemokines known to attract neutrophils in both rat models and patients. These cells were involved in a Lipid A analog-mediated colon tumor regression. Mechanistically, treating the rats with the Lipid A analog triggered granzyme B release from neutrophils in tumor cell vicinity, which was correlated to tumor regression. Alteration of granzyme B function in tumor cells decreased the cytotoxic effect of Lipid A in rat and mouse models. Granzyme B expression in neutrophils could be induced by the lipid A analog but also by some of the cytokines that were detected in the tumor microenvironment. These results identify a subpopulation of neutrophils expressing granzyme B that can act as a key player of lipid A-mediated colon cancer regression in rat and mouse models and the molecular mechanisms involved may provide novel approaches for human therapeutic intervention.**

## INTRODUCTION

A well-known example of cancer immunotherapy in use for more than 30 years is the Bacillus Calmette-Guérin (BCG) therapy of non-invasive bladder carcinomas. This is the first most effective immunotherapy for solid tumors [1]. The molecular mechanisms involved are likely dependent on the binding of BCG, an avirulent strain of *Mycobacterium bovis*, to the Toll-like receptors (TLR) 4 [2]. This TLR plays a critical role in the activation of the immune system by stimulating antigen

uptake and presentation, maturation of dendritic cells (DC), differentiation of helper T cells, and inhibition of regulatory T cells [3].

TLR4 is the classic receptor of lipopolysaccharides (LPS) and lipid (A) [4], the lipid part of LPS to which the anti-tumor activity of LPS was attributed [5]. However, LPS and natural forms of lipid A are too toxic to be used in clinic. Lipid A analogs have been developed and some of them, like OM-174 (LipA), are well tolerated by patients [6] and effective against tumors in animal models. LipA is a triacyl diglucosamine diphosphate acting through



TLR4 to induce total regression or growth inhibition of macroscopic tumors in rat and mouse models [7–11].

Immunotherapy results in tumor cell death. Granzymes, known to induce apoptosis, are the main mediators of cytotoxicity induced by cytotoxic T lymphocytes and natural killer (NK) cells [12, 13]. Over the last decade, there were some controversy about granzymes A and B expression in other cell types like neutrophils. Some reports show that granzymes are constitutively expressed in human blood neutrophils [14, 15] or transformed neutrophils in culture [16], while others indicate that granzymes are not at all expressed in neutrophils [17, 18]. The same controversy was extended to granzyme expression in mouse neutrophils [19]. Granzyme B (GZMB) expression in tumor neutrophils has not been studied. Even though neutrophils are known to support tumor growth by producing angiogenic factors like matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor [20], recent data demonstrate that the microenvironment can alter neutrophil activity. For example, blocking transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ 1) induced the switch of neutrophils from a pro-tumorigenic (N2) to an anti-tumorigenic (N1) state [21].

As neutrophils were implicated in the mechanism of action of BCG immunotherapy [22–24], we sought to elucidate their role in LipA immunotherapy in rat and mouse models of colon cancer and we checked that human neutrophil exhibited the same properties.

## RESULTS

### The antitumor effect of the LipA treatment is correlated with the infiltration of tumors by neutrophils

The LipA treatment induced the regression of tumors and cured 95% of tumor-bearing rats (Figure 1A) that died free of tumor nodules, as previously shown [8]. Typical structures of tumors after the second injection of physiological solution (control) or LipA are shown after hematoxylin-eosin Y (HE) staining (Figure 1B and 1C). Both types of tumors consisted of core of tumor cells surrounded by a distinct ring of non-tumor cells at the edges of nodules. It should be noted that no other tumor sites were observed (data not shown). However, in treated tumors, this ring was thicker than in control tumors (Figure 1C) and the number of tumor cells decreased drastically (Figure 1D). We analyzed the cytokine and chemokine contents of tumors using antibody arrays (Figure 2A). LipA treatment induced lot of modulations in cytokine levels. Furthermore, chemokines belonging to CXCL family such as CXCL1 (CINC-1) and CXCL2 (CINC-2 $\alpha/\beta$ , CINC-3) were significantly higher (approximately five-fold) in treated rats at days 15 and 17 (Figure 2A and 2B). In agreement, tumor *cxcl1* and *cxcl2* mRNA levels were higher after the first injection of LipA compared to control

rats (Figure 2C). As a consequence, tumors isolated from treated rats contained many more neutrophils than tumors from control rats (Figure 2D and 2E). In agreement, specific neutrophil mRNA transcripts (*ncf1* and *ncf2*) were higher in treated rats compared to control rats (Figure 2F). However, neutrophils remained at the edges of tumor nodules in control rats whereas they infiltrated the entire nodule after LipA treatment (Figure 2D). Moreover the antitumor effect of LipA in a mouse model of subcutaneous colon cancer was partially decreased by inhibition of neutrophils recruitment using a CXCR2 antagonist, SB225002 (Figure 2G, Supplementary Figure 1A).

### Apoptotic tumor cells are in the vicinity of anti-tumorigenic neutrophils in LipA treated rats

By TUNEL analysis, we found that apoptotic death occurred in cells that were located in the core of treated tumors (Figure 3A). We confirmed by immunostaining that most apoptotic cells containing cleaved caspase 3 in treated rats were tumor cells (Figure 3B), the percentage of apoptotic tumor cells increasing during treatment (Figure 3C). Moreover, double immunostaining of neutrophils and M30 (a marker of apoptotic epithelial cells) demonstrates that in treated tumors the death of tumor cells occurred near neutrophils (Figure 3D). LipA-induced apoptosis was also detected in the murine CT26 tumor cells co-cultured with tumor-associated neutrophils (Figure 3E), while the LipA treatment in absence of neutrophils did not trigger apoptosis (data not shown). These data revealed the anti-tumor potential of these TANs stimulated by LipA. On the contrary, apoptosis was not detected in control tumors in which neutrophils were at the edges of tumors, distant from tumor cells, and presented a pro-tumorigenic phenotype (N2 state) (Figure 2D and Figure 3F and 3G). However, LipA induced the acquisition of an anti-tumorigenic phenotype by neutrophils (N1 state) with iNOS expression and low arginase-1 content (Figure 3F and 3G).

### The cytotoxic effect of the LipA treatment correlates with the increase of granzyme B (GZMB) into tumor cells

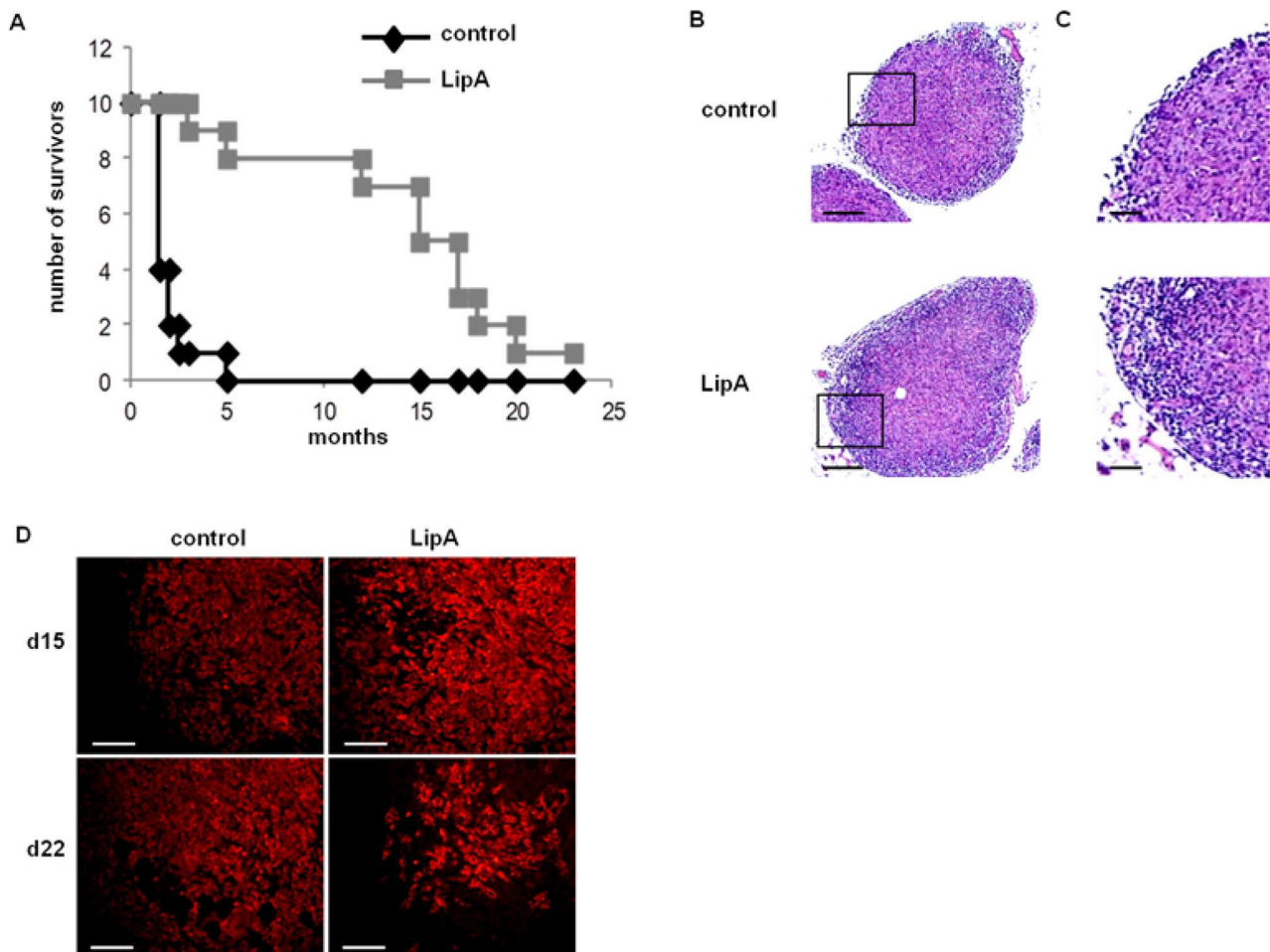
To further characterize the phenotype of tumor-associated neutrophils, we assessed the expression of GZMB, an arm used by NK and cytotoxic CD8 T-lymphocytes cells to kill their targets. Unexpectedly, GZMB was observed only at the edge of tumor sections from control rats, but throughout the whole tumor sections from treated rats (Figure 4A) while the presence of GZMB was associated with a large proportion of neutrophils in both treated and control tumors from rats (Figure 4A) but also in tumor-associated neutrophils from mice (Supplementary Figure 1B). Moreover, GZMB was also found inside tumor cells from treated rats, but not from

control rats (Figure 4B). Further, double immunostaining of GZMB and M30, a hallmark of apoptosis, demonstrates that apoptotic tumor cells in treated rats contained GZMB (Figure 4C). The involvement of GZMB in the anti-tumor effect of lipid A has been demonstrated by using cells expressing the serpin B9 (PI9-6 cells), a natural protein inhibitor of GZMB (Figure 4D). In fact, the percentage of tumor growth inhibition induced by LipA is 90% with CT26WT cells but only 37% with CT26 cells expressing serpin B9 (Figure 4E and 4F). Taken together, these data suggest that GZMB from neutrophils contributed to tumor cell apoptosis in LipA treated rats. Some other cells were known to express GZMB like NK cells and T lymphocytes ( $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$ ). However, these cells were present only at the edges of the tumors, none were detected in the core of tumors from control or treated rats (Supplementary Figure 2). As we showed that tumor cells were located

(Figure 1C) and died (Figure 3A, 3B and 3D) in the core of tumor nodules, we deduced that the latter cell types were not involved in tumor cell death in LipA immunotherapy, at least at the beginning of treatment.

We also showed that conditioned media of spleen neutrophils from control tumor-bearing rats were not cytotoxic (Figure 5A). However, conditioned media from neutrophils treated with LipA *in vivo* and/or *in vitro* induced cytotoxicity which was GZMB-dependent (Figure 5A). Furthermore, conditioned media from *in vitro* and/or *in vivo* LipA-treated neutrophils contained higher levels of GZMB compared to untreated neutrophils (Figure 5B). Altogether, these results indicated that not only the lipid A induces the release of GZMB of neutrophils but also increases the expression of this enzyme in these cells.

The involvement of GZMB produced by neutrophils in the anti-tumor effect of lipid A has also been

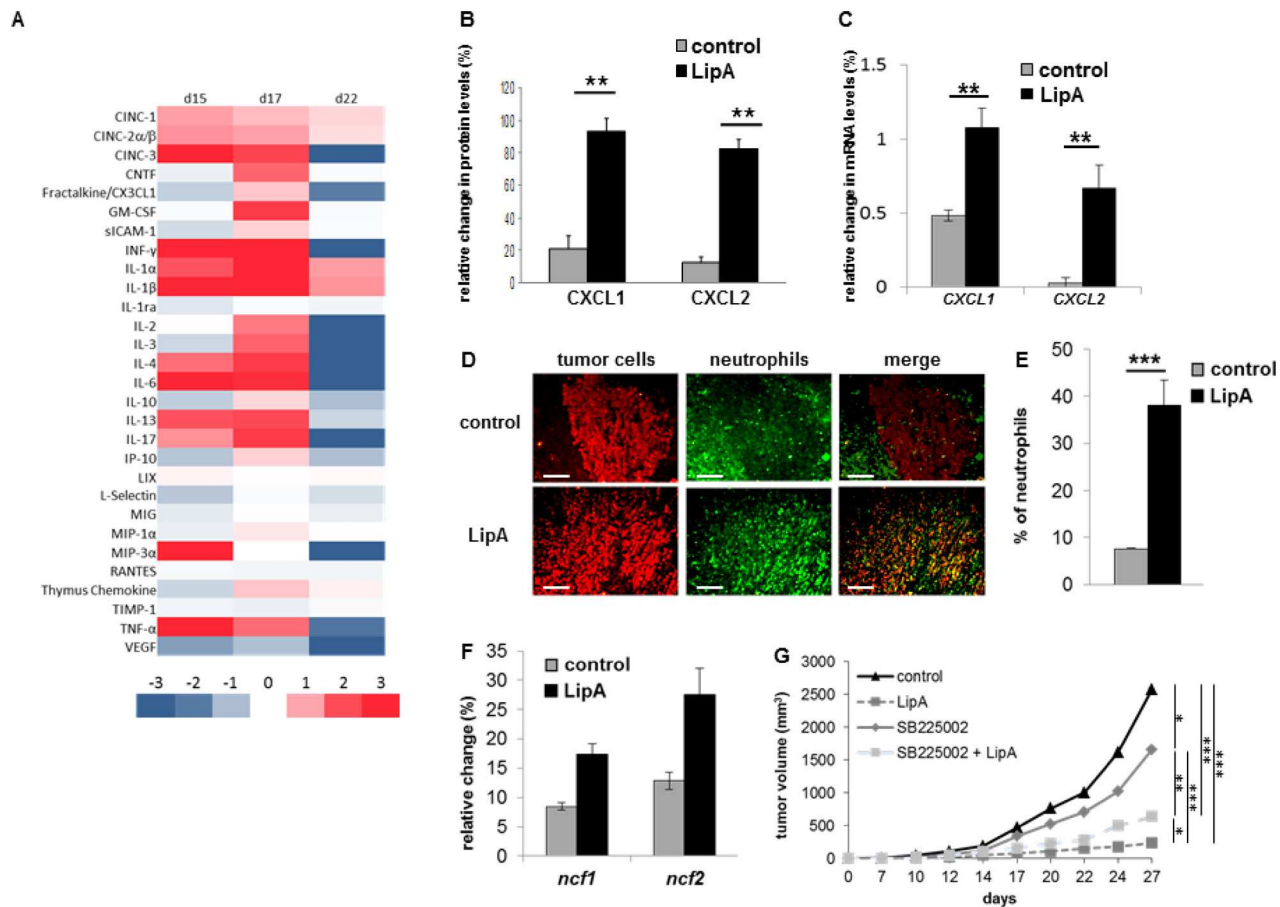


**Figure 1: LipA cured tumor-bearing rats.** (A) The lifespan of tumor-bearing rats was improved by LipA treatment. Fourteen days after i.p. injection of PROb cells, rats were treated i.v. with LipA (grey) or physiological solution (control, black) 3 times per week for 5 weeks. Results are representative of at least 3 independent experiments with 10 animals per group. (B) Hematoxylin-eosin staining of tumors from LipA treated or control rats (scale bars = 200  $\mu$ m). (C) Enlargement of regions outlined in figure B (scale bars = 50  $\mu$ m). The tumor core and surrounding ring of cells can be distinguished. (D) Tumor regression was analyzed by immunostaining of tumor cells (anti-cytokeratin Ab, red), one day after the first (day 15) and the fourth injection (day 22) of LipA or physiological solution (scale bars = 50  $\mu$ m). Micrographs are representative of at least 3 independent experiments, 4 animals per group.

demonstrated in a mouse model of colon cancer. Indeed, coculture of TAN induces apoptosis of CT26 tumor cells in response to treatment with LipA, as attested by the increase of Annexin V positive cells (Figure 5C). This cytotoxicity is correlated with the increase of the level of GZMB in co-culture supernatants (Figure 5D). In order to decipher how GZMB was induced in neutrophils treated by LipA, we first tested the effect of some MAPKs known to modulate GZMB expression. We showed that the p38 MAPK inhibitor (SB203580) significantly affected LipA-mediated GZMB increase and cell death (Figure 5C and 5D).

## Tumor microenvironment induces GZMB expression in neutrophils

Tumor-associated neutrophils from rats or mice could express GZMB, independently of LipA treatment (Figure 4A and Supplementary Figure 1B). However, spleen neutrophils from rats or mice only express GZMB after LipA treatment (Figure 6A and 6B). The tumor microenvironment could therefore stimulate the production of GZMB by TAN. Cytokines like IL-2, IL-12, IL-21 and IFN- $\gamma$  were known to play a key role in GZMB production in lymphocytes or NK cells [25–27]. Different expression



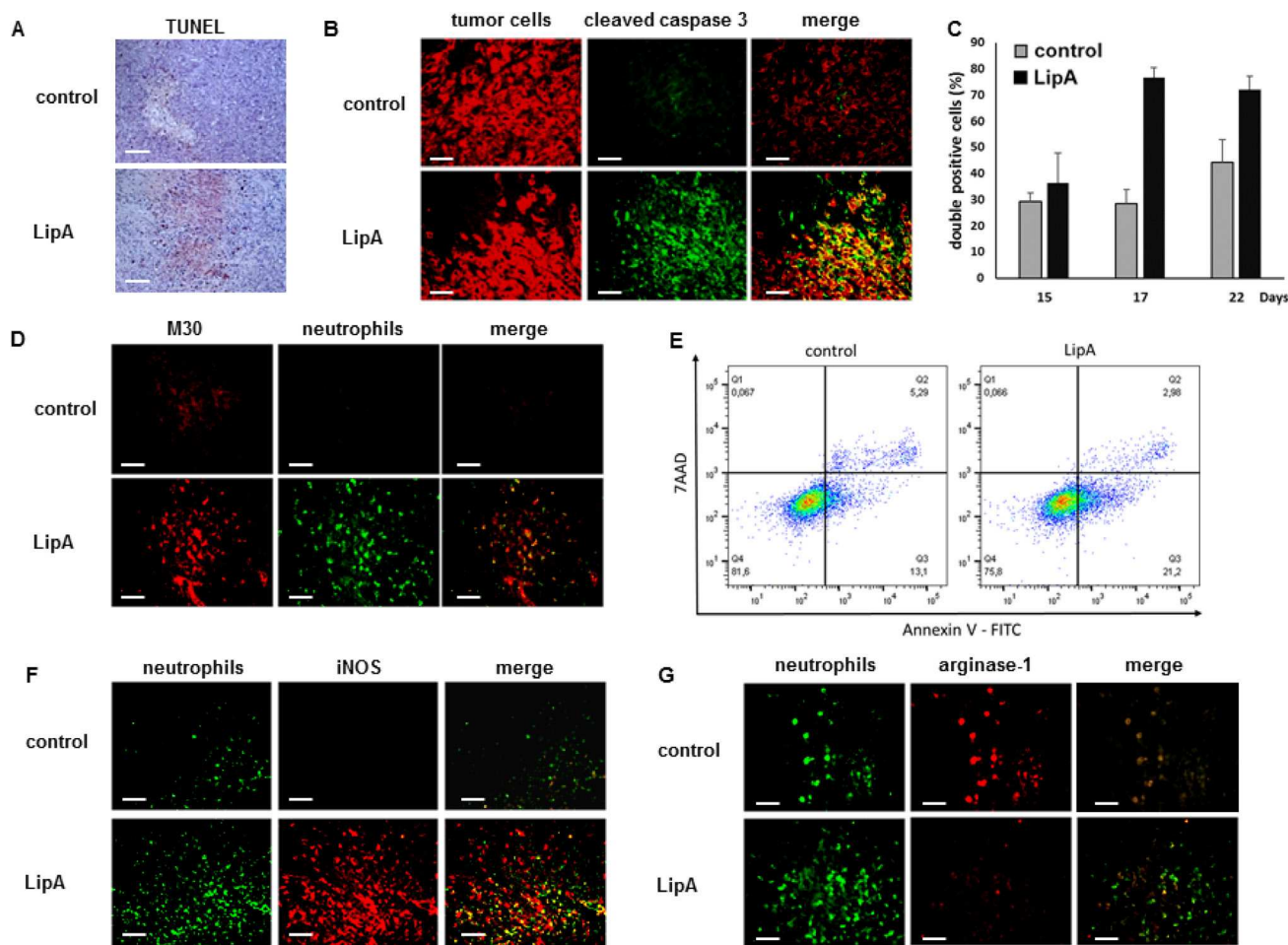
**Figure 2: Anti-tumor effect of LipA was correlated with neutrophil infiltration.** (A) The modulation of cytokine and chemokine contents of tumors one day after the first, second and fourth injections (respectively d15, d17 and d22) of LipA or physiological solution was analyzed using antibody arrays and Image J software. (B) The relative abundance of CXCL1 and CXCL2 proteins twenty-four hours after the second injection of LipA, (d17) was expressed as a percentage compared to an internal control (100%). (C) Six hours after the first injection (d15) of LipA or physiological solution (control), expression levels of cxcl1 and cxcl2 mRNA in tumors were evaluated relative to housekeeping gene gapdh by RT-PCR. (D) Tumors were collected at day 17 from LipA treated or control rats. After fixation, 5- $\mu$ m sections were cut and stained for tumor cells (anti-cytokeratin Ab, red) and neutrophils (anti-HIS48 Ab, green) (scale bars = 50  $\mu$ m). The yellow staining in the merge panels represents tumor cells very close to neutrophils. Micrographs are representative of at least 3 independent experiments, 4 animals per group. (E) The levels of neutrophils present in tumors were determined by counting of these cells in 3 independent slides per animals, 4 animals per group. Shown are the mean % of neutrophils  $\pm$  SEM. (F) At day 17, expression levels of ncf1 and ncf2 mRNA were evaluated relative to housekeeping gene gapdh by RT-PCR. (G) CT26-bearing mice were treated with physiological solution (control) or LipA with or without the GZMB inhibitor SB225002. Three days after cell injection, LipA was administrated i.v. every 5 days for 5 times. SB225002 was injected i.p. 24 h before and at the same time than LipA. Results are representative of at least 2 independent experiments with 10 animals per group. (B, C, E–G) Significant difference in Mann–Whitney *U* test, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.005.

patterns of these cytokines were observed *in vivo* between tumors and spleens in control rats (Figure 6C). IL-21 was expressed at similar levels in tumors and spleens, IL-12 mRNA levels were lower whereas IL-2 and IFN- $\gamma$  mRNA levels were higher in tumors than in spleens (Figure 6C). Treatment of spleen neutrophils from control rats with an interleukin mix (ILs, IL-2 + IL-12 + IL-21), IFN- $\gamma$  or ILs plus IFN- $\gamma$  induced the production of GZMB in these cells (Figure 6D, white bars). This effect was enhanced by the combination of LipA with ILs alone, ILs+IFN- $\gamma$  but not IFN- $\gamma$  alone (Figure 6D, grey bars). These results indicate that GZMB expression in neutrophils could be triggered by different cytokines including IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 and IL-21 but also by LipA.

### Colon tumor of patients contains granzyme B-expressing neutrophils

Tumor-infiltrating neutrophils were evaluated in a cohort of 35 patients with colon cancer (all patients for which a tumor sample was available had given its written consent). Using hematoxylin-eosin-saffron (HES) staining, we showed that all tumors were infiltrated by neutrophils at variable rates (Table 1). The low number of patients did not allow us to see any significant correlation between the rate of tumor-infiltrating neutrophils and patient's survival.

We also determined cytokines and chemokines levels in tumor and normal tissues from 25 patients. We showed no significant differences in IL-2, IL-6, and IL-12b



**Figure 3: LipA treatment induced tumor cell death in the vicinity of infiltrated anti-tumorigenic neutrophils.** Tumors from LipA treated or control rats were removed at day 17 (A, B, D, F, G), fixed and cut into 5- $\mu$ m cryosections. (A) Apoptotic cells were present in the core of tumors from LipA treated rats but not in tumors from control rats (TUNEL, red). (B) Immunostaining of tumor cells (anti-cytokeratin Ab, red) and cleaved caspase 3 (anti-cleaved caspase 3 Ab, green). (C) The levels of tumor cells containing cleaved caspase 3 were determined at days 15, 17 and 22 by counting of these cells in 3 independent slides per animals, 4 animals per group. Shown are the mean % of double positive cells  $\pm$  SEM. (D) Immunostaining of apoptotic tumor cells (M30 Ab, red) and neutrophils (anti-HIS48 antibody, green). (E) The levels of apoptotic tumor cells (AnnV+ cells) was determined using an Annexin V-7AAD staining, after LipA treatment of co-culture of CT26 cells and tumor associated-neutrophils. (F, G) Staining for neutrophils (anti-HIS48 Ab, green) and (F) iNOS (anti-iNOS Ab, red) or (E) arginase-1 (anti-arginase-1 Ab, red). Micrographs are representative of at least 3 independent experiments, 4 animals per group (scale bars = 50  $\mu$ m).

mRNA levels between tumor and normal tissues (data not shown). However, the neutrophil CXC chemokine IL-8 mRNA expression was significantly higher ( $p < 0.0001$ ) in tumors as compared to normal tissues (Figure 7A). Furthermore, four other chemokines, CXCL1, 2, 3 and 5, known to attract neutrophils, were strongly expressed in tumors by comparison to the normal tissues (Figure 7B). We also showed that most of tumor-infiltrated neutrophils (CD66b+ cells) expressed GZMB (Figure 7C).

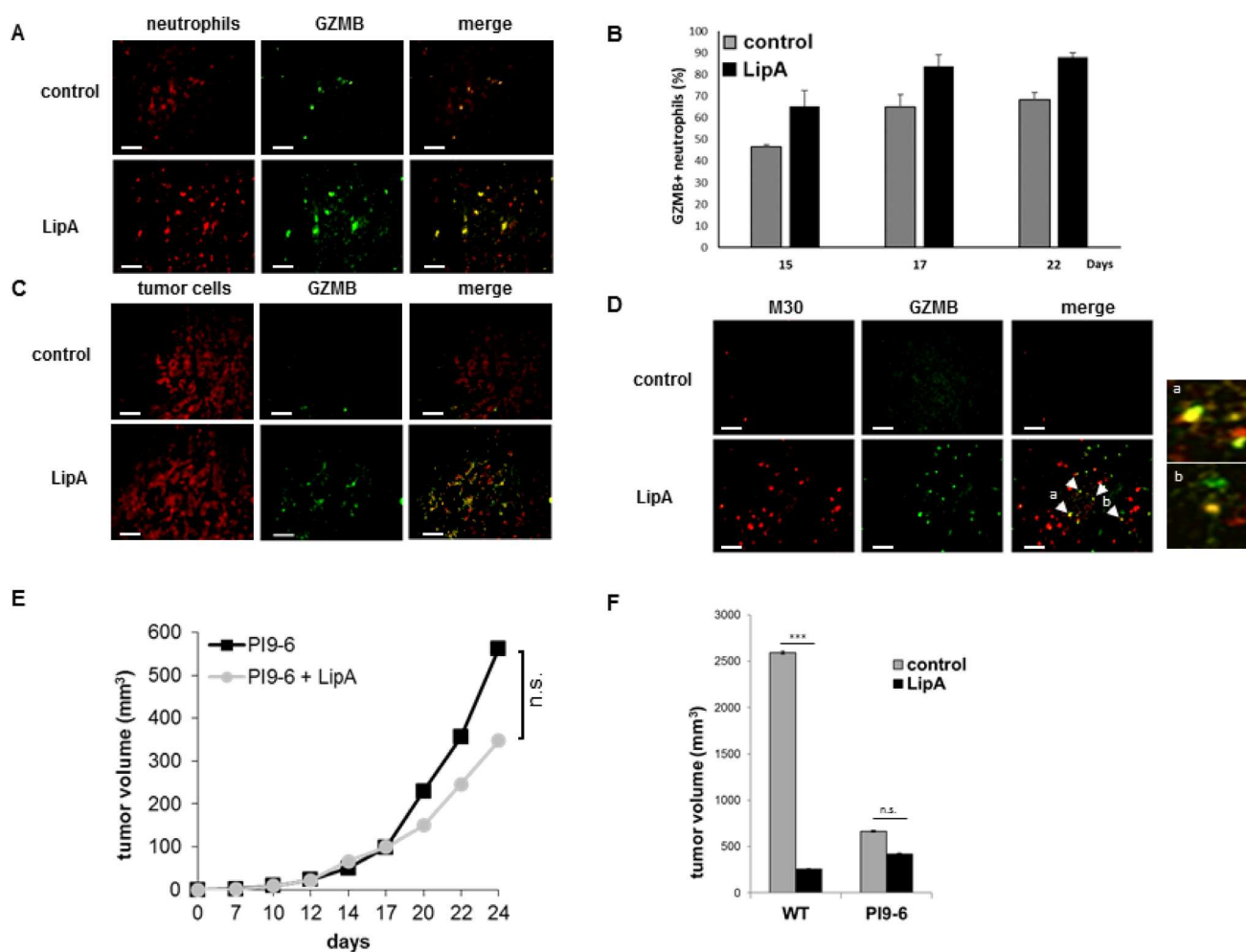
Taken together, these results indicate that animal but also human colon tumors are infiltrated by neutrophils which are characterized by the expression of the GZMB. Such infiltration is correlated with the expression of some chemokines known to attract neutrophils. Stimulation of these cells with a TLR4 agonist triggers the release of

GZMB and cancer cell demise, probably at the origin of *in vivo* tumor regression. The involvement of this neutrophil subpopulation in colon tumor outcome needs more investigation.

## DISCUSSION

Here we have identified a subpopulation of colon tumor-infiltrating neutrophils, in rat and mouse models but also in human, which expressed GZMB. When stimulated with a Lipid A analog, this cell type of neutrophils was more recruited into tumors and participated in a GZMB-dependent manner to the antitumor activity of LipA.

Neutrophils are more and more the subject of research on tumor development or tumor therapies. These

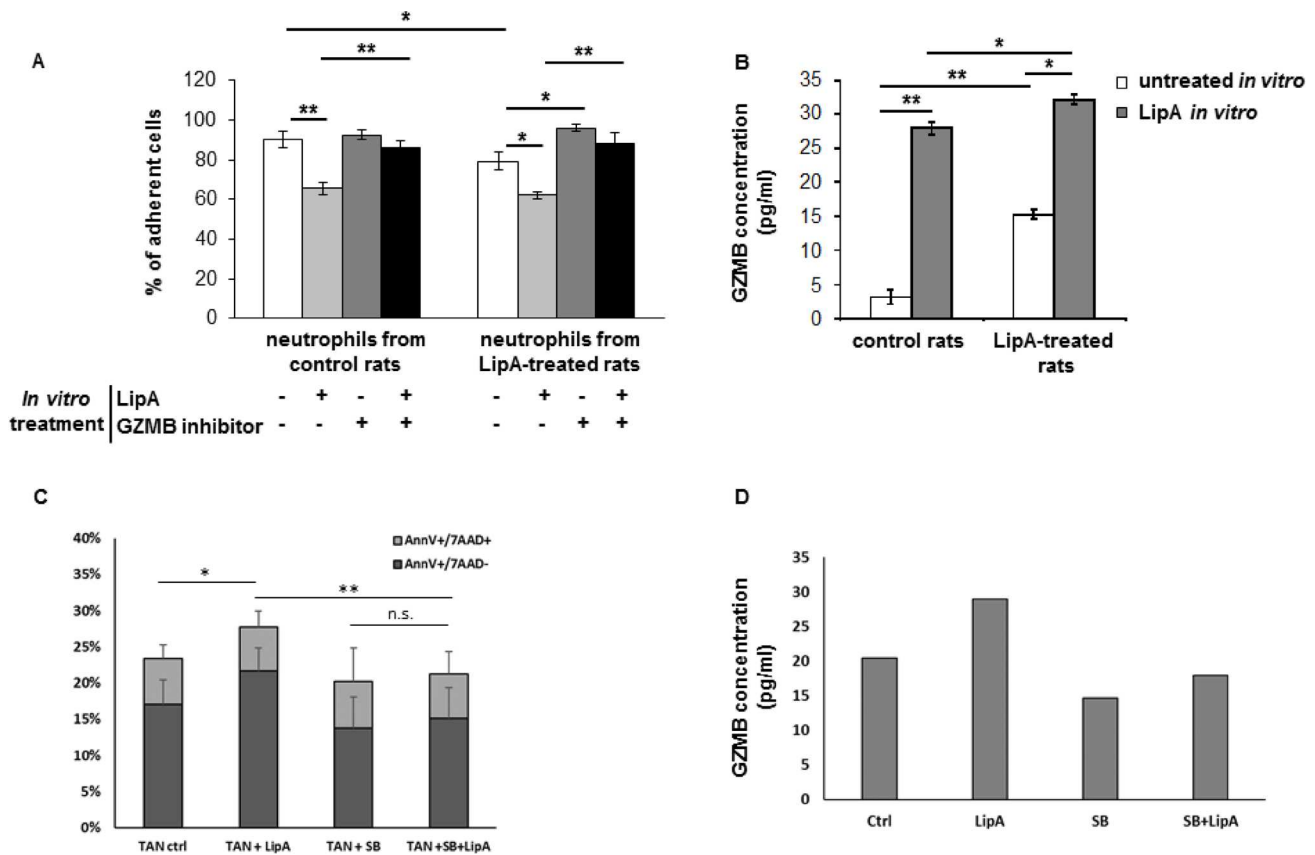


**Figure 4: Granzyme B was present in neutrophils and apoptotic tumor cells in LipA treated rats.** Tumors from rats were removed at day 17, fixed, cut into 5- $\mu$ m cryosections and stained. (A) Tumor associated-neutrophils containing GZMB were double stained (Neutrophils in red, GZMB in green). (B) The levels of neutrophils containing GZMB were determined at days 15, 17 and 22 by counting of these cells in 3 independent slides per animals, 4 animals per group. Shown are the mean % of double positive cells  $\pm$  SEM. (C, D) Tumor sections were stained for tumor cells (red (C)), or apoptotic tumor cells (anti-M30 Ab, red (D)) and GZMB (anti-GZMB Ab, green (C, D)). Enlargement of regions a and b in figure (D) Micrographs are representative of at least 3 independent experiments, 4 animals per group (scale bars = 50  $\mu$ m). (E, F) Three days after s.c. injection of PI9-6 cells (E, F) or CT26 wild type cells (WT, F), mice were treated i.v. with LipA or physiological solution (control) every 5 days for 5 times. Results are representative of at least 2 independent experiments with 10 animals per group. Significant difference in Mann-Whitney *U* test, \*\*\* $p < 0.005$ , n.s. not significant.

cells express CXCR1 and CXCR2 at their surface and are recruited by their ligands including CXCL1 and CXCL2 [28] which can be produced by tumor, endothelial cells or fibroblasts [29]. CXCL1 and CXCL2 contribute to mobilizing neutrophils from bone marrow and sustain neutrophil recruitment at sites of inflammation [30–32]. It was conceivable that neutrophils can be attracted to tumors if these later express these ligands. We have demonstrated here that colon tumors from rats showed a rise of CXCL1, CXCL2 after LipA treatment. We also showed that these two chemokines but also CXCL3 and CXCL5 were more expressed in tumors of patients with colon cancer as compared to healthy tissue [33, 34]. The expression of CXCL1 and CXCL2 in human colon tumors has been described [35, 36] and there is a report that CXCL1 is highly expressed in poor invasive tumors [37]. However, description of neutrophils in human colon cancer are limited [38] without significant correlation with prognosis. As far as we know there has been no correlation made

between CXCL1, CXCL2 or neutrophils with the effects of therapy on colon cancer in human. It has been shown that CpG oligodeoxynucleotides and a vascular disrupting agent induced the regression of colon tumors in mice, and this correlates with an increase in CXCL1 and neutrophil infiltration in tumors [39, 40]. Furthermore, colon tumor bearing mice receiving cyclophosphamide plus IL-12 gene therapy are more likely to reject tumors when infiltrated by neutrophils [41]. A recent study showed that in early-stage lung cancer, TAN were able to stimulate T-cell response and tumor growth inhibition [42].

One of the most important aspects of this study is that a large proportion of TAN expressed GZMB and was localized into colon tumors from rats, mice and from patients. Further, in lipid A-treated tumors, some neutrophils moved to reside in the vicinity of apoptotic tumor cells. Noteworthy, the apoptotic tumor cells, contiguous to neutrophils, contain GZMB, suggesting that lipid A induces neutrophil GZMB release that contributes to cancer cell

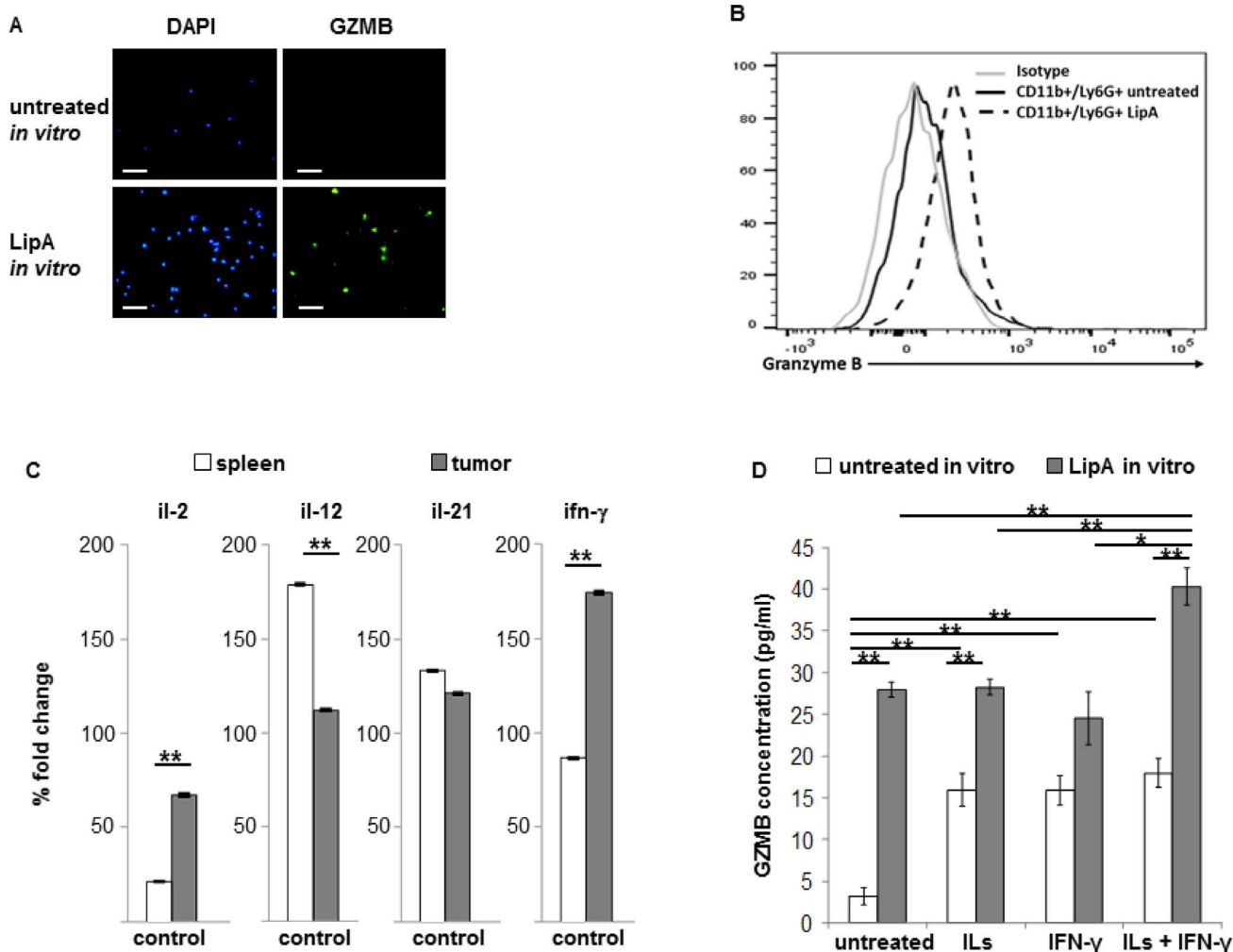


**Figure 5: LipA induced neutrophil-mediated cytotoxicity via granzyme B production.** (A, B) Spleen neutrophils from LipA treated or control rats were purified and treated *in vitro* with or without 10 µg/ml LipA for 24 h. (A) The toxic effect of conditioned media on tumor target cells cultured in the presence or in the absence of GZMB inhibitor was evaluated using a methylene blue assay. The mean numbers of adherent cells are shown as percentages of the untreated cells (100%). (B) The concentration of GZMB in conditioned media was measured by ELISA. Shown are means ± SEM. (C) Neutrophils were incubated or not with LipA (24 h) and stained for granzyme B (green) or DAPI (blue). 3 independent experiments. (C, D) Tumor associated-neutrophils were purified from mice, co-cultures with CT26 cells during 24 h in presence or not of LipA and SB203580. (C) The level of apoptotic tumor cells was determined by Annexin V/7AAD staining. (D) The level of GZMB secreted in co-culture of CT26 and TAN treated or not with LipA and SB203580 was determined using an ELISA assay. The results are obtained from one mouse and are representative of those obtained with at least 6 animals. (A–C) Significant difference in Mann–Whitney *U* test, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, n.s. not significant.

demise. In our knowledge, this is the first time that we describe a subpopulation of neutrophil expressing GZMB with an anti-tumor ability. This is all the more important as this type of cells is also present in patients with colon cancer. It would be interesting to know if the prognosis and disease outcome are different in patients in whom tumors are rich or poor in neutrophil expressing GZMB. It has been observed that colorectal cancer infiltration with CD16+ high myeloperoxidase positive myeloid cells correlates with favorable outcome [43, 44]. In another study, tumor-associated neutrophils stimulate T-cell proliferation and interferon gamma releases [42]. Other contradictory results showed that high tumor infiltration by CD66b+, a classical neutrophil marker, cells was associated to severe prognosis

in patients with colorectal cancer [45, 46]. A recent study comes to contradict the last ones previously quoted. Indeed, Governa *et al.* reported that CD66b+ cell infiltration in colorectal cancer is associated with increased survival [47].

Our data also showed that GZMB<sup>+</sup>-neutrophils have anti-tumor activity when activated by a TLR4 agonist unlike those devoid of GZMB, and their infiltration into tumor probably contributed to the LipA-mediated tumor cell death. Our conclusions are supported by results showing that the inhibition of GZMB activity in tumor cells affected the anti-tumor activity of LipA. We noted that colon tumor cells expressing the physiologically inhibitor of GZMB, the serpin B9, grew more slowly in mice as compared to wild type cells (80% reduction



**Figure 6: Tumor cytokines and LipA together induced strong expression of granzyme B in spleen and tumor neutrophils.** (A) Spleen neutrophils from rats were purified and incubated or not with LipA (24 h) before staining for granzyme B. The GZMB expression was determined by microscopy. (B) Spleen neutrophils from untreated or LipA-treated mice (24 h) were purified before analysis of GZMB by flow cytometry analysis. (A, B) 3 independent experiments. (C, D) Spleens and tumors from control rats were removed at day 17. (C) Expression levels of *il-2*, *il-12*, *il-21* and *ifn- $\gamma$*  mRNA were evaluated by RT-PCR and expressed as the mean of percentage of change compared to the level of *gapdh* expression. (D) Neutrophils from spleen were purified as in (A) and incubated for 24 h *in vitro* without or with a cytokine mix (ILs, IL-2 + IL-12 + IL-21) alone, IFN- $\gamma$  alone or a combination of both (ILs + IFN- $\gamma$ ), with or without of 10  $\mu$ g/ml LipA for 6 h. Concentration of granzyme B (GZMB) in conditioned media was measured by ELISA. Significant difference in Mann-Whitney *U* test, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01.

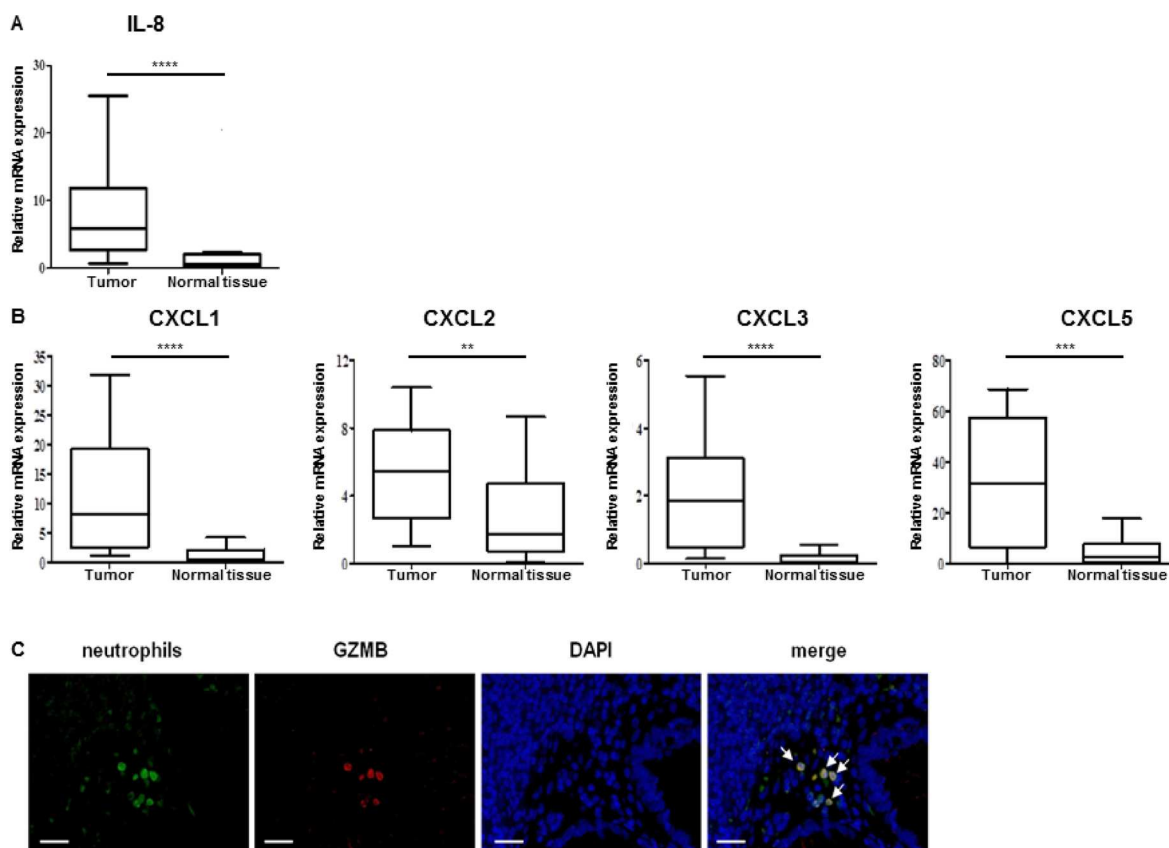
**Table 1: Estimation of neutrophil infiltration into colon tumors**

Neutrophil score	Patient proportion (%)
0	0 (0)
1+	14 (40%)
2+	10 (29%)
3+	11 (31%)

Score of tumor infiltration in polymorphonuclear neutrophils (PMN) was determined as: 0; absence of PMN in tumor zones outside ulceration zones, after careful analysis of the entire cut, 1+; presence of PMN isolated or in small clusters of 2–3 elements in the tumor zones outside ulceration zones. These PMN are difficult to find after careful analysis of the entire cut, 2+; presence of PMN isolated or in small clusters in the tumor zones outside ulceration zones. These neutrophils are easy to find after careful analysis of the entire cut and are of interest to more than one area, 3+: Obvious presence of PMN isolated or clustered in several tumor zones outside ulceration zones.

in tumor volume). This observation underlines the importance of GZMB in the eradication of tumors, at least in our model. The activation of TLR4 of immune cells and their impact on cancer cell death has been well documented. Apetoh *et al*, reported that activation of TLR4 expressed on dendritic cells by the high mobility

group box 1 protein (HMGB1) released by dying tumor cells can trigger protective antitumor immunity [48]. Neutrophil activation by BCG, a well-known activator of TLR2 and 4, induced the release of the tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and may play a potential role in initiating antitumor



**Figure 7: Colon tumor from patients contained neutrophil chemoattractants and granzyme B expressing neutrophils.** (A, B) Relative expression level of IL-8 cytokine (A) or CXCL-1, CXCL-2, CXCL-3 and CXCL-5 mRNA neutrophil chemoattractant (B) into tumor from 25 patients with colon cancer were evaluated by qRT-PCR.  $\beta$ -actin was used as the internal control. Significant difference in Mann–Whitney *U* test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.0005$ . (C) Human colon cancer samples were collected and stained for neutrophils (anti-CD66b, green), GZMB (anti-GZMB Ab, red) and for nuclei (DAPI, blue). GZMB was present in neutrophils (yellow signal shown by white arrows in merged panel). Micrographs are representative of at least 20 different samples (scale bar = 50  $\mu$ m).



response [22]. A recent report showed that priming of tumor induced macrophages with TLR4 agonist (LPS) alone or in combination with IFN- $\gamma$  induced a strong anti-tumor immune reaction [49].

In our effort to characterize the signaling pathways involved in the expression of GZMB in neutrophils, we also showed that GZMB was expressed in tumor-infiltrating neutrophils but not in neutrophils from spleen. This could be explained by the cytokines profile in tumor microenvironment which exhibited differences as compared to spleen. Indeed, GZMB could be induced in immune cells as NK when stimulated with IL-2 and IL-12 in humans, plus IL-21 in mice [25–27]. We showed that some of these cytokines triggered GZMB expression in neutrophils, an effect that was enhanced by the LipA analog. It is well-known that cytokines stimulate host immune response against tumors [50]. The host-derived cytokines exert double function; it can promote proliferation as well as inhibit tumor progression [51]. For instance, the pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF- $\alpha$  promote tumor growth. In contrast, IFN- $\gamma$  contributes to prevention of carcinogen-induced sarcomas [52] and its loss enhances tumor formation [51]. Although the pro- or anti-tumor response mechanisms of cytokines are not well understood, several reports indicated the expression of certain chemokines in tumor microenvironment promote immunosuppressive or anti-tumor immune cell recruitment. In our study, the increase of CXCL1 and CXCL2 both in rat model and patients with colon cancer correlates with neutrophil recruitment within tumors.

We also found that the LipA analog converts neutrophils from the protumorigenic N2 to the anti-tumor N1 phenotype as attested by the induction of iNOS in LipA-treated neutrophils. This seems to be important for the anti-tumor function of neutrophils mediated by the GZMB. However, the relationship between the expression of iNOS, a hallmark of N1 phenotype, and GZMB expression and release remains to be determined. Furthermore, in search of signaling pathways involved in GZMB expression of neutrophils, we showed that p38 MAPKinase was required for LipA-induced GZMB release from neutrophil and subsequently for neutrophil mediated cytotoxicity.

Overall, we provide strong evidence for the involvement of GZMB produced by neutrophils in immuno-induced tumor regression, widening the field of tumor immunotherapy mechanisms.

## MATERIALS AND METHODS

### Animal tumor models and cell culture

BD-IX rats and Balb/C mice, respectively 2–3 month-old males and 7–8 weeks-old females, were purchased from Charles River Laboratory. Carcinomatosis in BD-IX rats was initiated by i.p. injection of colon

cancer cells PROb [53, 54], a cell line obtained from a colon carcinoma induced in BD-IX rat (Martin *et al*, 1983) and maintained at 37° C in HAM's F10 (Lonza) supplemented with 10% FBS (Lonza). As previously described [8], the treatment began at day 14, when the size of tumor nodules were around 2 to 5 mm in diameter, and consisted of 15 i.v. injections of LipA at 1 mg/kg or of physiological solution (in control rats), at the rate of 3 injections per week. Tumors in Balb/C mice were initiated by s.c. injection of CT26 cells, a mouse colon cancer cell line obtained from the American Type Culture Collection and maintained at 37° C in RPMI (Lonza) supplemented with 10% FBS (Lonza). The treatment began at day 3 and consisted of 5 i.v. injections of LipA at 8 mg/kg or physiological solution (in control mice) every 5 day. The inhibitor of neutrophils (SB225002, Tocris Bioscience) was injected i.p. at 4 mg/kg the day before and at the same time that LipA injections. The studies were reviewed and approved by the Burgundy University ethics committee for animal experimentation. CT26 cells were stably transfected by calcium phosphate method [55] with the pCMV6-Kan:Neo expression plasmid containing the full-length serpin B9 cDNA (OriGene). Clonal populations of CT26 overexpressing serpinB9 were selected by isolation of a single cell into a well of a 96-well plate and were cultured with medium supplemented with neomycin at 1 mg/ml.

### Lipid A analog

OM-174 (OM-Pharma, Meyrin, Switzerland), is a 2-deoxy-6-O-[2-deoxy-2- [(R)-3-dodecanoyloxytetradecanoylamino] -4-O-phospho- $\beta$ -D-glucopyranosyl] -2-[(R)-3-hydroxytetradecanoylamino] - $\alpha$ -D-glycopyranosyl dihydrogenphosphate.

### Antibodies and reagents

Mouse antibody (mAb) anti-granulocytes (Santa Cruz, clone HIS48) was used to characterize tumor-infiltrating and purified neutrophils. Mouse anti-TCR  $\alpha/\beta$  Ab (AbD Serotec, clone R73), goat polyclonal antibody (pAb) anti-NKp46 Ab (R&D Systems) and mAb anti-TCR  $\gamma/\delta$  Ab (AbD Serotec, clone V65) were used to detect T lymphocytes, NK cells and  $\gamma/\delta$  T lymphocytes respectively in tumors. Tumor cells were characterized using an anti-cytokeratin mAb (DakoCytomation, clone MNF116). The following Abs were also used: a mouse anti-arginase 1 mAb (clone 19) and a rabbit anti-iNOS pAb (BD Transduction Laboratories), a rabbit anti-cleaved caspase-3 pAb (Cell Signaling), a mouse Anti-Cytokeratin 18 M30 CytoDEATH mAb (Roche, clone M30), a mouse anti CD66b mAb (Biolegend, clone G10F5) and a rabbit anti-granzyme B pAb (Thermo Scientific). Secondary Abs used were anti-mouse or anti-rabbit Alexa Fluor 568 or 488 conjugates from Molecular Probes (Invitrogen).

GZMB inhibitor 1 (z-AAD-CMK) was purchased from Merck. Anti-CD11b-Alexa700 mAb (clone M1/70) and Ly6G-Fitc mAb (clone 1A8) (BD Pharmingen), a rat anti-granzyme-B-eFluor450 pAb (eBioscience) and anti-CD45-APC/Cy7 mAb (Biolegend, clone 30-F11) were used for cytometry analysis. The following cytokines and inhibitors were added to neutrophil cultures: recombinant rat IL-2 (Biolegend), recombinant mouse IL-21 (eBioscience), IL-12 and IFN- $\gamma$  (R&D Systems) and p38 MAP Kinase Inhibitor (SB203580, Invivogen).

### Detection of cytokines and chemokines by Ab array

Tumors were harvested, lysed in lysis buffer [56] and an equal amounts of proteins (Dc Protein Assay kit (BioRad) were incubated with rat cytokine array membranes (R&D Systems). The revelation was performed according to the manufacturer's protocol and optical density was measured with ImageJ software.

### RT-PCR

Total RNA from rat samples was extracted from tumors using the RNeasy kit (Qiagen). RT-PCR were performed with the Qiagen OneStep RT-PCR kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The primer list was in Table 2. The PCR products were analyzed by gel electrophoresis (1.5% agarose) and stained with ethidium bromide (Invitrogen). The amplified cDNA length was evaluated using the 100-bp DNA ladder (Promega). All densitometric analyses were performed with ImageJ software. Total RNA from human samples was extracted from tumors with Trizol (Ambion), qRT-PCR were performed and analyzed with the Sybr Green method (Thermofisher) according to the manufacturer's instructions. Expression was normalized to the expression of human beta-actin using the  $2^{-\Delta CT}$  method previously described [57].

### ELISA

Granzyme B concentrations in spleen neutrophil supernatants from rats or tumor associated-neutrophils from mice were detected by ELISA (Uscn Life Science Inc and R&D Systems) according to the manufacturer's protocol. Absorbance was read on a spectrophotometer (Asys UVM 340) at 450 nm wavelength (wavelength correction at 540 nm for mice ELISA).

### Histopathology

Paraffin-embedded samples were cut into 5  $\mu$ m thick. Sections were deparaffined, rehydrated and stained with hematoxylin-eosinY (HE) or May-Grünwald Giemsa (MGG) for rat samples and Hematoxylin-eosin-saffron (HES) for human samples. Apoptotic cells were detected

by TUNEL kit (Millipore) according to the manufacturer's protocol.

### Immunohistofluorescence (IHF) and immunofluorescence (IF)

For IHF, fixed tumors were embedded in OCT (Labonord) after impregnation with 20% sucrose/PBS. Sections were cut into 5  $\mu$ m thick and fixed for 10 min in cold acetone. Antigen retrieval was performed (citrate buffer pH 7.3, 96° C, 20 min) before the blocking of nonspecific sites with 3% BSA. For IF, neutrophils ( $1 \times 10^4$ ) were plated in Lab-Tek II (Nalge Nunc), fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized in 0.2% Triton X-100 and incubated with 3% BSA. Slides for IHF and IF were incubated with primary antibodies in 1% BSA/PBS/0.1% Tween, then with appropriate secondary antibodies in 1% BSA/PBS/0.1% Tween. Slides were mounted using Prolong Gold (Invitrogen). Images from rat colon cancer were captured on a Nikon Eclipse E400 epifluorescent microscope at 40x magnification, images from human colon cancer were captured on a Axio Imager 2 microscope with Axiovision software.

### Apoptotic cell detection *in vitro*

Apoptotic cells was determined by Annexin V/7 AAD kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol.

### Neutrophil isolation and culture

Neutrophils from rats were purified from spleens removing of red blood cells by osmotic lysis and purification with Ab-anti HIS48 coupled to magnetic beads (Miltenyi Biotec). Neutrophils (98% purity) were cultivated in Ham's F-10 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin/amphotericin B (Lonza). Neutrophils were pretreated for 18 h with 1 ng/mL recombinant IL-2, 1 ng/mL IL-12, 100 ng/mL IL-21 and 250 U/mL IFN- $\gamma$  before treatment for 6 h with or without 10  $\mu$ g/mL OM-174. Neutrophils from mice were purified from tumors after mechanic and enzymatic dissociation in solution of RPMI (Dutscher), FBS 2% (Dutscher), Collagenase 1 mg/mL (Sigma-aldrich), DNase 0.1mg/mL (Sigma-aldrich), Hepes 25 mM (Gibco) for one hour at 37° C. After removing red blood cells by osmotic lysis and purification with anti-Ly-6G Microbead Kit (Miltenyi), TAN were co-cultivated with CT26 cells (5:1 ratio) in RPMI medium supplemented with 10 FBS and 1% penicillin/streptomycin/amphotericin B (Dutscher) and treated (18 h) or not with LipA at 500 ng/mL and/or SB203580 at 2,5  $\mu$ M.

### Methylene blue toxicity assays

After 24 h the supernatants from the above neutrophil cultures were collected and added to  $2 \times 10^4$  PROb cells that were then treated with or without 50  $\mu$ M

**Table 2: Primers used for RT-PCR**

Gene	Rat sequence	Human sequence
CXCL-1	GAGAAAGAAGATAGATTGCACCGATG TTCTTCCCCTCAACACCTTC	GAAAGCTTGCCTCAATCCTG CTTCTCCTCCCTTCTGGTC
CXCL-2	GTGACACTGAAGAGTTACGATGTCAG CCTGAGGCTCCATAAATGAAAGA	GCTCCTTGCCAGCTCTCCTCCT TGTGGCTATGACTTCGGTTTGGGC
CXCL-3		CGCCCAAACCGAAGTCATAGCCA TGGTAAGGGCAGGGACCACCC
CXCL-5		TGTTGAGAGAGCTGCGTTGCGTT GGAGGCTACCACTTCCACCTTGG
IL-2	AAGCAGGCCACAGAATTGAAAC CAGATGGCTATCCATCTCCTCAG	
IL-8		TGACTTCCAAGCTGGCCGTGG AAACTGCACCTTACACAGAGCTGC
IL-12	CACTCACATCTGCTGCTCCAC CTGGCACGCCACTGAGTACTTC	
IL-21	CAGCTCCACAAGATGTAAGGGGC CCATGTGCCTCTGTTTATTTCTGTCC	
IFN- $\gamma$	CTTTGGATATCTGGAGGAAGTGG CGACTCCTTTTCCGCTTCCT	
Ncf1	CACCGAGATCTACGAGTTCC TCCCATGAGGCTGTTGAAGTAC	
Ncf2	GAAAGCATGAAGGATGCCTGG ATAGCACCAAGATCACATCTCCTTCC	
GAPDH	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA	

GZMB inhibitor-1 in 96-well microplates for 24 h. The cytotoxicity of neutrophil conditioned media to PROb cells was evaluated using the methylene blue assay as previously described [7].

### Quantification of human tumor-infiltrated neutrophils

The quantification of this infiltration was carried out with the help of a pathologist from slides colored in a standard manner by the HES. The tumors were then classified into 4 groups according to the criteria defined in the Table 1 legend. The same analysis was then redone from the slides colored in MGG.

### Granzyme-B detection by flow cytometry

Spleen neutrophils from mice were incubated for 4 h at 37° C in RPMI medium supplemented with 10% FBS and Golgi Stop (BD Biosciences). Nonspecific sites were saturated in the FCSB solution (eBiosciences) and then incubated with the membrane antibodies (CD11b, CD45, Ly-6G) in the FCSB solution. After fixation and permeabilization (Fixation/Permeabilization solution, BD Biosciences), neutrophils are incubated with an anti-Granzyme-B. The cells were analyzed by flow cytometry on BD FACSCanto™ 10.

### Statistical analyses

Experimental data are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using StatView software. The Mann–Whitney *U* test was used to compare data between two treatment groups. Differences were considered statistically significant as follows: \**P*  $\leq$  0.05; \*\**P*  $\leq$  0.01; \*\*\**P*  $\leq$  0.005, and \*\*\*\**P*  $\leq$  0.0005.

### Author contributions

AM, CS, CR and NI conceived and carried out experiments and analysed data, AS, NM, carried out experiments, analysed data and discussed data, SR, LA analysed data, AB, JFJ conceived experiments, discussed data, prepared and edited the manuscript, CP conceived experiments, interpreted data, prepared and edited the manuscript, coordinated the experiment. All authors had final approval of manuscript.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Valérie Saint-Giorgio (zootechny center, UBFC) Amandine Bataille (Cellimap, UBFC), and Arlette Hammann (Inserm U1231, UBFC) for their expert technical assistances.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest.

## FUNDING SUPPORT

This work was partially supported by grants from Conseil Régional de Bourgogne (Bourgogne Technologies no. 61000251 and n° 2008 9201CPERO 002S00431) and from Ligue Contre le Cancer, comité Grand Est. AM was supported by a grant from EPHE, CS by a grant from Conseil Régional de Bourgogne and AS by a grant from INCA.

## REFERENCES

1. Sylvester RJ, van der MEIJDEN AP, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol.* 2002; 168:1964–70.
2. Heldwein KA, Liang MD, Andresen TK, Thomas KE, Marty AM, Cuesta N, Vogel SN, Fenton MJ. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against *Mycobacterium bovis* BCG. *J Leukoc Biol.* 2003; 74:277–86.
3. Wang RF, Miyahara Y, Wang HY. Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy. *Oncogene.* 2008; 27:181–9.
4. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 1999; 11:443–51.
5. Parr I, Wheeler E, Alexander P. Similarities of the anti-tumour actions of endotoxin, lipid A and double-stranded RNA. *Br J Cancer.* 1973; 27:370–89.
6. Isambert N, Fumoleau P, Paul C, Ferrand C, Zanetta S, Bauer J, Ragot K, Lizard G, Jeannin JF, Bardou M. Phase I study of OM-174, a lipid A analogue, with assessment of immunological response, in patients with refractory solid tumors. *BMC Cancer.* 2013; 13:172.
7. Gautier T, Paul C, Deckert V, Desrumaux C, Klein A, Labbé J, Le Guern N, Athias A, Monier S, Hammann A, Bettaieb A, Jeannin JF, Lagrost L. Innate immune response triggered by triacyl lipid A is dependent on phospholipid transfer protein (PLTP) gene expression. *FASEB J.* 2010; 24:3544–54.
8. Onier N, Hilpert S, Arnould L, Saint-Giorgio V, Davies JG, Jeannin JF. Cure of colon cancer metastasis in rats with the new lipid A OM 174. Apoptosis of tumor cells and immunization of rats. *Clin Exp Metastasis.* 1999; 17:299–306.
9. Onier N, Hilpert S, Reveneau S, Arnould L, Saint-Giorgio V, Exbrayat JM, Jeannin JF. Expression of inducible nitric oxide synthase in tumors in relation with their regression induced by lipid A in rats. *Int J Cancer.* 1999; 81:755–60.
10. Seignez C, Martin A, Rollet CE, Racœur C, Scagliarini A, Jeannin JF, Bettaieb A, Paul C. Senescence of tumor cells induced by oxaliplatin increases the efficiency of a lipid A immunotherapy via the recruitment of neutrophils. *Oncotarget.* 2014; 5:11442–51. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2556>.
11. Lamrani M, Sassi N, Paul C, Yousfi N, Boucher JL, Gauthier N, Labbé J, Seignez C, Racœur C, Athias A, Guerreiro R, Vergely C, Rochette L, et al. TLR4/IFN $\gamma$  pathways induce tumor regression via NOS II-dependent NO and ROS production in murine breast cancer models. *OncoImmunology.* 2015; 5:e1123369. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1123369>.
12. Afonina IS, Cullen SP, Martin SJ. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. *Immunol Rev.* 2010; 235:105–16.
13. Cullen SP, Martin SJ. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ.* 2008; 15:251–62.
14. Hocegger K, Eller P, Rosenkranz AR. Granzyme A: an additional weapon of human polymorphonuclear neutrophils (PMNs) in innate immunity? *Blood.* 2004; 103:1176.
15. Wagner C, Iking-Konert C, Deneffle B, Stegmaier S, Hug F, Hänsch GM. Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood.* 2004; 103:1099–104.
16. Wagner C, Stegmaier S, Hänsch GM. Expression of granzyme B in peripheral blood polymorphonuclear neutrophils (PMN), myeloid cell lines and in PMN derived from haematopoietic stem cells *in vitro*. *Mol Immunol.* 2008; 45:1761–6.
17. Grossman WJ, Ley TJ. Granzymes A and B are not expressed in human neutrophils. *Blood.* 2004; 104:906–7. author reply 7-8.
18. Metkar SS, Froelich CJ. Human neutrophils lack granzyme A, granzyme B, and perforin. *Blood.* 2004; 104:905–6. author reply 7-8.
19. Martin P, Wallich R, Pardo J, Müllbacher A, Munder M, Modolell M, Simon MM. Quiescent and activated mouse granulocytes do not express granzyme A and B or perforin: similarities or differences with human polymorphonuclear leukocytes? *Blood.* 2005; 106:2871–8.
20. Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103:12493–8.
21. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS, Albelda SM. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell.* 2009; 16:183–94.
22. Kemp TJ, Ludwig AT, Earel JK, Moore JM, Vanoosten RL, Moses B, Leidal K, Nauseef WM, Griffith TS. Neutrophil

- stimulation with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L. *Blood*. 2005; 106:3474–82.
23. Rosevear HM, Lightfoot AJ, O'Donnell MA, Griffith TS. The role of neutrophils and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer Metastasis Rev*. 2009; 28:345–53.
  24. Suttman H, Riemensberger J, Bentien G, Schmaltz D, Stöckle M, Jocham D, Böhle A, Brandau S. Neutrophil granulocytes are required for effective Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses. *Cancer Res*. 2006; 66:8250–7.
  25. Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ, Nutt SL. IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J Immunol*. 2004; 172:2048–58.
  26. Fehniger TA, Cai SF, Cao X, Bredemeyer AJ, Presti RM, French AR, Ley TJ. Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. *Immunity*. 2007; 26:798–811.
  27. Zhang B, Zhang J, Tian Z. Comparison in the effects of IL-2, IL-12, IL-15 and IFN $\alpha$  on gene regulation of granzymes of human NK cell line NK-92. *Int Immunopharmacol*. 2008; 8:989–96.
  28. Mantovani A, Savino B, Locati M, Zammataro L, Allavena P, Bonecchi R. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010; 21:27–39.
  29. Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med*. 2010; 16:133–44.
  30. Armstrong DA, Major JA, Chudyk A, Hamilton TA. Neutrophil chemoattractant genes KC and MIP-2 are expressed in different cell populations at sites of surgical injury. *J Leukoc Biol*. 2004; 75:641–8.
  31. Rittner HL, Mousa SA, Labuz D, Beschmann K, Schäfer M, Stein C, Brack A. Selective local PMN recruitment by CXCL1 or CXCL2/3 injection does not cause inflammatory pain. *J Leukoc Biol*. 2006; 79:1022–32.
  32. Wengner AM, Pitchford SC, Furze RC, Rankin SM. The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood*. 2008; 111:42–9.
  33. Jamieson T, Clarke M, Steele CW, Samuel MS, Neumann J, Jung A, Huels D, Olson MF, Das S, Nibbs RJ, Sansom OJ. Inhibition of CXCR2 profoundly suppresses inflammation-driven and spontaneous tumorigenesis. *J Clin Invest*. 2012; 122:3127–44.
  34. Coffelt SB, Wellenstein MD, de Visser KE. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16:431–46.
  35. McLean MH, Murray GI, Stewart KN, Norrie G, Mayer C, Hold GL, Thomson J, Fyfe N, Hope M, Mowat NA, Drew JE, El-Omar EM. The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia. *PLoS One*. 2011; 6:e15366.
  36. Wen Y, Giardina SF, Hamming D, Greenman J, Zachariah E, Bacolod MD, Liu H, Shia J, Amenta PS, Barany F, Paty P, Gerald W, Notterman D. GRO $\alpha$  is highly expressed in adenocarcinoma of the colon and down-regulates fibulin-1. *Clin Cancer Res*. 2006; 12:5951–9.
  37. Chiu ST, Hsieh FJ, Chen SW, Chen CL, Shu HF, Li H. Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14:437–43.
  38. Roxburgh CS, Wallace AM, Guthrie GK, Horgan PG, McMillan DC. Comparison of the prognostic value of tumour- and patient-related factors in patients undergoing potentially curative surgery for colon cancer. *Colorectal Dis*. 2010; 12:987–94.
  39. Sharma S, Karakousis CP, Takita H, Shin K, Brooks SP. Cytokines and chemokines are expressed at different levels in small and large murine colon-26 tumors following intratumoral injections of CpG ODN. *Neoplasia*. 2004; 6:523–8.
  40. Wang LC, Thomsen L, Sutherland R, Reddy CB, Tijono SM, Chen CJ, Angel CE, Dunbar PR, Ching LM. Neutrophil influx and chemokine production during the early phases of the antitumor response to the vascular disrupting agent DMXAA (ASA404). *Neoplasia*. 2009; 11:793–803.
  41. Medina-Echeverez J, Fioravanti J, Zabala M, Ardaiz N, Prieto J, Berraondo P. Successful colon cancer eradication after chemoimmunotherapy is associated with profound phenotypic change of intratumoral myeloid cells. *J Immunol*. 2011; 186:807–15.
  42. Eruslanov EB, Bhojnagarwala PS, Quatromoni JG, Stephen TL, Ranganathan A, Deshpande C, Akimova T, Vachani A, Litzky L, Hancock WW, Conejo-Garcia JR, Feldman M, Albelda SM, Singhal S. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *J Clin Invest*. 2014; 124:5466–80.
  43. Sconocchia G, Zlobec I, Lugli A, Calabrese D, Iezzi G, Karamitopoulou E, Patsouris ES, Peros G, Horcic M, Tornillo L, Zuber M, Drosier R, Muraro MG, et al. Tumor infiltration by Fc $\gamma$ RIII (CD16)<sup>+</sup> myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma. *Int J Cancer*. 2011; 128:2663–72.
  44. Drosier RA, Hirt C, Eppenberger-Castori S, Zlobec I, Viehl CT, Frey DM, Nebiker CA, Rosso R, Zuber M, Amicarella F, Iezzi G, Sconocchia G, Heberer M, et al. High myeloperoxidase positive cell infiltration in colorectal cancer is an independent favorable prognostic factor. *PLoS One*. 2013; 8:e64814.
  45. Rao HL, Chen JW, Li M, Xiao YB, Fu J, Zeng YX, Cai MY, Xie D. Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PLoS One*. 2012; 7:e30806.
  46. Yamamoto T, Kawada K, Itatani Y, Inamoto S, Okamura R, Iwamoto M, Miyamoto E, Chen-Yoshikawa TF, Hirai

- H, Hasegawa S, Date H, Taketo MM, Sakai Y. Loss of SMAD4 Promotes Lung Metastasis of Colorectal Cancer by Accumulation of CCR1+ Tumor-Associated Neutrophils through CCL15-CCR1 Axis. *Clin Cancer Res.* 2017; 23:833–44.
47. Governa V, Trella E, Mele V, Tornillo L, Amicarella F, Cremonesi E, Muraro MG, Xu H, Droeser R, Däster SR, Bolli M, Rosso R, Oertli D, et al. The Interplay Between Neutrophils and CD8(+) T Cells Improves Survival in Human Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017; 23:3847–58.
48. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, Ortiz C, Lidereau R, Mariette C, Chaput N, Mira JP, Delaloge S, André F, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev.* 2007; 220:47–59.
49. Prakash H, Nadella V, Singh S, Schmitz-Winnenthal H. CD14/TLR4 priming potentially recalibrates and exerts anti-tumor efficacy in tumor associated macrophages in a mouse model of pancreatic carcinoma. *Sci Rep.* 2016; 6:31490.
50. Lee S, Margolin K. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2011; 3:3856–93.
51. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4:11–22.
52. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001; 410:1107–11.
53. Jeannin JF, Onier N, Lagadec P, von Jeney N, Stütz P, Liehl E. Antitumor effect of synthetic derivatives of lipid A in an experimental model of colon cancer in the rat. *Gastroenterology.* 1991; 101:726–33.
54. Martin F, Caignard A, Jeannin JF, Leclerc A, Martin M. Selection by trypsin of two sublines of rat colon cancer cells forming progressive or regressive tumors. *Int J Cancer.* 1983; 32:623–7.
55. Kingston RE, Chen CA, Okayama H. Calcium phosphate transfection. *Curr Protoc Immunol.* 2001; Chapter 10:Unit 10.3.
56. Leon-Bolotte L, Subramaniam S, Cauvard O, Plenchette-Colas S, Paul C, Godard C, Martinez-Ruiz A, Legembre P, Jeannin JF, Bettaieb A. S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells. *Gastroenterology.* 2011; 140:2009–18.
57. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25:402–8.