



**HAL**  
open science

# Etude des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire ciblant l'axe PD-1/PD-L1 à l'aide de modèles précliniques

Morgane Denis

► **To cite this version:**

Morgane Denis. Etude des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire ciblant l'axe PD-1/PD-L1 à l'aide de modèles précliniques. Immunologie. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1275 . tel-04544727

**HAL Id: tel-04544727**

**<https://theses.hal.science/tel-04544727>**

Submitted on 13 Apr 2024

**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.



N°d'ordre NNT : 2021LYSE1275

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

Opérée au sein de  
**L'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N°340**  
**Biologie Moléculaire Intégrative Et Cellulaire**

**Spécialité de doctorat** - Biologie  
**Discipline** - Cancérologie et immunologie

Soutenue publiquement le 08/12/2021, par :  
**Morgane DENIS**

---

# **Etude des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire ciblant l'axe PD-1/PD-L1 à l'aide de modèles précliniques**

---

Devant le jury composé de :

Dalle, Stéphane PU-PH Université de Lyon Président

Bezombes, Christine Dr Université de Toulouse III – Paul Sabatier Rapporteur

Marabelle, Aurélien Dr Université Paris-Saclay Rapporteur

Labarrière, Nathalie Dr Université de Nantes-Angers Examinatrice

Dumontet, Charles PU-PH Université de Lyon Directeur de thèse

## Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLAND

### COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

### COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : M. Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice Provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'évaluer ce travail. Le Dr Christine Bezombes et le Dr Aurélien Marabelle qui ont accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Un grand merci à eux pour leurs relectures attentives et minutieuses. Le Pr Stéphane Dalle qui a présidé ce jury. Le Dr Nathalie Labarrière qui a évalué ce travail en tant qu'examinatrice.

« La vérité scientifique sera toujours plus belle que les créations de notre imagination et que les illusions de notre ignorance » (Claude Bernard). La science se vit comme une passion qui nous entraîne toujours plus loin dans notre imaginaire afin de repousser les limites que notre esprit nous impose.

Cette passion, je la cultive depuis maintenant près de 5 ans auprès de mon directeur de thèse le Pr Charles Dumontet. Un premier stage en Master 2 au sein de l'équipe Onco-Pharmacologie, suivi d'une expérience d'une année en tant que chargée d'études au sein de l'unité de recherche du service hématologie de l'hôpital Lyon sud puis cette proposition que tu m'as faite de poursuivre en thèse sous ta direction qui a fini par me décider à sauter le pas. Alors, merci à toi Charles, de m'avoir communiquée cette passion, de m'avoir fait confiance durant toutes ces années, de m'avoir tant appris, de m'avoir soutenue et encouragée aussi bien sur le plan professionnel que personnel. Ce fut un réel privilège pour moi d'avoir pu évoluer à tes côtés. Toutes nos discussions scientifiques ont permis l'aboutissement de ce travail de longue haleine. Ce fut un réel plaisir de travailler avec une personne si humaine, talentueuse et inspirante.

Je tiens également à remercier le Dr Lars Peter Jordheim, co-directeur de l'équipe Onco-Pharmacologie pour ses nombreux conseils avisés tout au long de ma thèse ainsi que le Dr Charles De Taisne directeur d'Antinéo pour sa confiance.

Le parcours d'une thèse CIFRE implique nécessairement de jongler entre deux environnements professionnels privé et public. Ceci peut paraître compliqué mais cela a été finalement très facile pour moi grâce aux personnes qui composent ces deux équipes qui sont à l'image de leurs directeurs, bienveillantes, positives et encourageantes. Alors bien évidemment, merci à vous tous.

Premièrement, je tiens à remercier l'équipe d'Antinéo, en particulier Doriane et Pierre-Antoine merci pour votre soutien quotidien, sans vous cette thèse n'aurait pas été la même, c'est évident ! Vous avez su me calmer pendant mes « rares » moments de stress, me faire rire, relativiser, merci pour tout ça mais surtout merci pour votre aide indéfectible qui m'a permis de mener ce travail. Je tiens également à remercier Elsa ; tu m'as permis de développer des compétences différentes en me confiant le développement d'expériences de projets clients. Ceci, j'en suis sûre, sera un atout dans ma future carrière alors merci pour ta confiance. Merci également à Anne, Daphné et Léa, qui ont été ou le sont encore membres d'Antinéo, pour leur présence et soutien. Je tiens à remercier Chloé qui m'a formée à mon arrivée en stage de master 2 et avec qui je suis co-auteur d'un article.

Deuxièmement, j'adresse un remerciement chaleureux à toute l'équipe d'Onco-Pharmacologie. Kamel, Eva vous avez été mes plus proches soutiens depuis le début. Kamel mon voisin de bureau merci pour tout ! Tes nombreux conseils m'ont permis d'avancer sereinement dans mes travaux de thèse, cela a été un privilège de t'avoir juste à côté pour t'embêter sans arrêt sur mes interrogations parfois un peu loufoques. Un grand merci à Eva qui a été d'un énorme soutien dans la réalisation de nombreuses manip, qui n'ont pas toujours fonctionnées comme prévu mais qui nous auront valu beaucoup de fous rires. Un grand merci à tous les autres membres en particulier Emeline, Sabine et Zineb qui m'ont suivi depuis le début de mon arrivée en master 2, toujours disponible pour m'aider si besoin. Votre bienveillance a été d'un grand soutien. Je remercie également les personnes qui se sont intégrées à notre équipe au fur et à mesure et nous ont apporté de nouvelles compétences au sein du laboratoire ; merci donc à Éric, Capucine, Patrick, Clarisse, Marine, Meigge, et en particulier Anne Wierinckx qui m'a énormément aidé pour les analyses bioinformatiques.

Cette aventure n'aurait pas pu être complète sans les autres thésards du laboratoire. David, tu as été mon voisin de bureau. Ton positivisme, ton flegme à toute épreuve et ton rire ! m'ont aidé à relativiser beaucoup de situations alors merci pour ta présence. Octavia, tu es partie trop tôt du laboratoire ! merci de me faire sentir plus intelligente que je ne le suis ;) merci pour être toi, des personnalités comme la tienne il n'y en a pas deux ! Louise, ma co-thésarde, merci d'avoir été un soutien immuable, intime et sincère. On en aura eu des fous rires agrémentés d'hypothèses scientifiques... ou pas.

Je tiens aussi à remercier en particulier Jilian, Manon et Suzanne. J'ai eu la chance de vous encadrer, cela n'a pas toujours été simple pour moi. Alors merci à vous 3 de votre patience, de votre persévérance et de votre aide.

Ces trois années ont été également riches en rencontres professionnelles ; je tiens donc à remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu échanger sur mon projet de thèse et qui m'ont aidé à avancer. En particulier, merci aux personnes des plateformes de cytométrie du CRCL, du CIQLE, de Profilexepert et du SCAR.

Enfin je remercie mes amis qui m'ont tous apporté, à leurs façons, un soutien impérissable depuis toutes ces années, pour certains bien avant la thèse.

Pour terminer, une pensée particulière à mes parents, ma sœur et mon mari, merci d'être vous.

*À mes grands-parents,  
À mon oncle*

## Résumé

Suite à la découverte des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICI) de type PD-1/PD-L1 (Programmed Cell Death 1/ Programmed Cell Death Ligand 1), l'essor de nouvelles thérapies ciblant ces liaisons a complètement changé le paradigme existant : la thérapie ne détruit plus la cellule tumorale directement, elle est également capable de réactiver les cellules immunitaires pour leur permettre de détruire la cellule tumorale. Ces anticorps monoclonaux ont révolutionné la prise en charge des patients atteints de cancer. Cependant, tous les patients ne répondent pas à ces thérapies. Deux types de résistance émergent, innée et acquise, et les mécanismes impliqués sont peu connus. Si l'étude des mécanismes liés à la résistance innée est plus simple grâce à l'existence de modèles tumoraux *in vivo* mimant cette réponse, l'étude des mécanismes liés à la résistance acquise reste un *challenge*. De ce constat, nous avons développé une stratégie pour créer des modèles tumoraux *in vivo* contractant une résistance acquise aux ICIs de type anti-PD-1 ou/et anti-PD-L1. Nous avons étudié en profondeur, à l'aide d'un panel d'immunophénotypage et d'un séquençage de l'ARN, cinq modèles différents : MC38 (cancer colorectal), MB49 et MBT2 (cancer de la vessie), TyrNras (mélanome) et RENCA (cancer rénal). Nos résultats nous ont permis d'identifier des populations immunitaires immunosuppressives prenant place dans le microenvironnement de manière modèle-dépendant. La combinaison de thérapies ciblant ces cellules spécifiquement avec l'anti-PD-1 ou l'anti-PD-L1 a permis un retour à un phénotype sensible. Également, à l'aide de ces modèles nous avons identifié un gène la *SERPINF1* fonctionnellement impliqué dans le soutien de la résistance à l'anti-PD-1 dans le modèle MC38. Le mécanisme sous-jacent semble être lié à la production excessive d'acides gras libres dans le microenvironnement tumoral. Les premiers résultats indiquent un basculement des lymphocytes T CD8+, préalablement activés par la thérapie anti-PD-1, vers un état inactif. Combiner une thérapie ciblant la production d'acides gras avec l'anti-PD-1 permet de contrer la résistance. Toutes ces données apportent de nouvelles pistes thérapeutiques pour les patients souffrant d'un cancer résistant aux ICIs. Elles identifient également un potentiel biomarqueur de la résistance acquise chez l'Homme et une voie pour comprendre l'un des

mécanismes que les cellules tumorales mettent en place pour se développer malgré la thérapie.

Mots clés : Inhibiteurs de points de contrôle, PD-1/PD-L1, Résistance, Modèles syngéniques

## Abstract

Since, the discovery of immune checkpoint inhibitors (ICI) like PD-1 /PD-L1 (Programmed Cell Death 1 / Programmed Cell Death Ligand 1), the development of new therapies targeting these bonds has completely changed the existing paradigm: the therapy does not destroy directly tumor cells, rather it reactivates the immune cells to allow them to target tumor cells. These monoclonal antibodies have revolutionized the management of patients. However, large parts of patients present tumors that resist to these therapies. Two types of resistance exist: innate and acquired. The mechanisms involved are largely unknown. Study of the mechanisms linked to innate resistance is less complex thanks to the existence of *in vivo* tumor models that mimics this response while the study of the mechanisms linked to acquire resistance remains a challenge. From this observation, we have developed a strategy to create *in vivo* tumor models with acquired resistance to anti-PD-1 or / and anti-PD-L1 therapies. Using immunophenotyping panel and RNA sequencing, we have characterized five models: MC38 (colorectal cancer), MB49 and MBT2 (bladder cancer), TyrNras (melanoma) and RENCA (kidney cancer). Our results allowed us to identify immunosuppressive immune cells occurring in the microenvironment in a model-dependent manner. Therapeutic combination targeting these cells with anti-PD-1 or anti-PD-L1 successfully gave rise to a sensitive phenotype. In addition, we identified a gene - *SERPINF1*- functionally involved in the resistance of anti-PD-1 in the MC38 model. The underlying mechanism appears to be link with the excessive production of free fatty acids in the tumor microenvironment. First results indicate a switch of CD8 + T lymphocytes, previously activated by anti-PD-1 therapy, to an inactivated state. Combining therapy that targets fatty acid production with anti-PD-1 allowed to counter the resistance. This set of data provide new therapeutic approach and a potential biomarker for patients with acquired resistant to ICIs.

Keywords: Checkpoint inhibitors, PD-1/PD-L1, Resistance, Syngeneic models

## Table des matières

<b>Listes des abréviations</b> .....	13
<b>Figures</b> .....	17
Chapitre I. Introduction générale.....	19
1. Physiopathologie du cancer .....	19
2. Traitements .....	22
A. Chirurgie .....	22
B. Radiothérapies .....	22
C. Chimiothérapies .....	22
D. Hormonothérapies .....	23
E. Thérapies ciblées .....	24
a. Petites molécules inhibitrices.....	25
b. Anticorps monoclonaux .....	25
F. Immunothérapies .....	27
i. Les biomolécules .....	27
ii. Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire .....	28
iii. Les anticorps bispécifiques.....	29
iv. Transfert adoptif de cellules.....	30
3. Cancer et système immunitaire .....	31
A. Microenvironnement tumoral et immunité innée.....	36
a. Cellules dendritiques anti <i>versus</i> pro-tumorales.....	37
b. Macrophages <i>versus</i> TAM .....	39
c. Neutrophiles <i>versus</i> TAN .....	42
d. Eosinophiles/Basophiles.....	44
e. M-MDSC <i>versus</i> PMN-MDSC .....	45
f. Cellules lymphoïdes Innées .....	47
g. Cellules NK.....	49
h. Cellules NKT.....	52
i. Trained immunity.....	53
B. Microenvironnement tumoral et immunité acquise.....	55
a. Th1. L'immunité à médiation cellulaire.....	57
i. Lymphocytes T cytotoxiques .....	57

ii.	Lymphocytes mémoires – fort potentiel anti-tumoral.....	59
b.	Th2. L'immunité à médiation humorale.....	60
i.	Lymphocytes B effecteurs – anti-tumoraux .....	61
ii.	Lymphocytes B régulateurs – pro-tumoraux.....	62
c.	Th9 .....	63
d.	Th17 .....	65
e.	Th22 .....	67
f.	Treg .....	68
4.	Mécanismes de maintien d'un environnement propice à la prolifération du cancer .....	71
A.	Charge mutationnelle.....	71
B.	Dérégulation épigénétique .....	72
C.	Dérégulation du métabolisme.....	73
D.	Tumeurs chaudes <i>versus</i> froides .....	79
E.	Défaut de reconnaissance des néo-antigènes.....	81
F.	Mimétisme de mécanismes immunosuppresseurs par les cellules tumorales .....	81
a.	Sécrétion de molécules immunosuppressives .....	81
i.	TGFβ .....	82
ii.	VEGF .....	83
iii.	PGE <sub>2</sub> .....	84
b.	Points de contrôle immunitaire .....	85
i.	CTLA-4 / CD80-86 .....	88
ii.	PD-1/PD-L1 .....	88
5.	Blocage de l'axe PD-1/PD-L1 .....	92
A.	Bénéfice.....	92
B.	Biomarqueurs.....	95
a.	Expression de PD-L1 .....	95
b.	Système de réparation des mésappariements.....	96
c.	Charge mutationnelle.....	96
d.	Oncogènes.....	96
e.	Microbiote.....	97
f.	Immunoscore .....	98
g.	Sang périphérique .....	98
C.	Les Résistances cliniques.....	100

a.	Hyperprogression .....	100
b.	Résistance primaire .....	101
i.	Mécanismes de résistance extrinsèque à la cellule tumorale .....	102
ii.	Mécanismes de résistance intrinsèque à la cellule tumorale .....	103
c.	Résistance Secondaire .....	105
i.	Le concept d' <i>immunoediting</i> .....	107
ii.	Signalisation inhibitrice supplémentaire .....	108
iii.	Epuisement secondaire des lymphocytes T .....	108
D.	Contourner les résistances .....	109
Chapitre II. Résultats .....		111
Caractérisation de modèles tumoraux syngéniques de souris détenant une résistance acquise aux anti-PD-1/PD-L1. ....		111
1.	Introduction .....	111
2.	Article .....	114
3.	Conclusion .....	174
Chapitre III. Résultats .....		177
Identification d'un gène <i>SERPINF1</i> impliqué dans la résistance à l'anti-PD-1 .....		177
1.	Introduction .....	177
2.	Article .....	183
3.	Conclusion .....	213
Chapitre IV. Résultats .....		218
Comparaison du microenvironnement immunitaire tumoral du modèle MC38 colorectal implanté en sous-cutané <i>versus</i> orthotopique .....		218
1.	Introduction .....	218
2.	Résultats .....	219
3.	Conclusion .....	226
Chapitre V. Résultats .....		228
L'hyperprogression induite par anti-PD-1/PD-L1, réalité ou mythe ? .....		228
Chapitre VI. Discussion .....		238
Conclusion .....		250
Bibliographie .....		251
Annexe 1 .....		298
Annexe 2 .....		306

## Listes des abréviations

### A:

ADCC: Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity  
ADN: Acide Désoxyribonucléique  
ADNct: ADN tumoral circulant  
ADO: Adenosine  
ALK: Anaplastic Lymphoma Kinase  
AMPK: 5' AMP-activated protein Kinase  
ARG 1: Arginase 1  
ATP: Adénosine Triphosphate

### B:

BAF: BRG1-Associated Factor  
BcR: B-Cell Receptor

### C:

CAF: Cancer-Associated Fibroblast  
CCL: C-C motif Chemokine Ligand  
CCR: C-C motif Chemokine Receptor  
CDK: Cyclin Dependent Kinase  
CDP: Common Dendritic cell Progenitor  
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
COX: Cyclooxygénase  
g-CSF: granulocyte Colony-Stimulating Factor  
m-CSF: macrophage Colony-Stimulating Factor  
CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène  
CTLA-4: Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen-4  
CTL: Cytotoxic T Lymphocytes  
CTLR: C-Type Lectine Receptor  
CXCL: Chemokine CXC motif Ligand

### D:

DAMPs: Damage-Associated Molecular Pattern  
DC: Dendritic Cell  
cDC: conventional Dendritic Cell  
mo-DC: monocyte-derived Dendritic Cell  
pDC: plasmacytoid Dendritic Cell

### E:

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor  
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinases

**F:**

FAO: Fatty Acid Oxidation  
FaB : Fragment antigen Binding  
Fc : crystallizable Fragment  
FoxP3: Forkhead box P3

**H:**

HER2: Human Epidermal growth factor Receptor 2  
HIFa: Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha

**I:**

ICI: Inhibiteur de points de Contrôle Immunitaire  
ICOSL: Inducible T-cell Costimulator Ligand  
IDO: Indoleamine-2,3-Dioxygénase  
IFN $\gamma$ : Interferon gamma  
Ig: Immunoglobulines  
IHC: Immunohistochimie  
IL-2: Interleukin-2  
ILC: Innate Lymphoid Cell  
ITIM: Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitor Motif  
ITSM: Immunoreceptor Tyrosine Switch Motif

**J:**

JAK: Janus Kinase

**K:**

KIR: Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor  
KLRG1: Killer Cell Lectin Like Receptor G1  
KRAS: V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

**L:**

LAG-3: Lymphocyte-Activation Gene 3  
LAIR: Leukocyte-Associated Immunoglobulin-like Receptor-1  
LAK: Lymphokine-Activated Killer  
LFA-1: Lymphocyte Function-associated Antigen 1  
LPS: Lipopolysaccharide

**M:**

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase  
m-MDSC: monocyte Myeloid Derived Suppressor Cells  
pmn-MDSC: polymorphonuclear Myeloid Derived Suppressor Cells  
MMR: Mismatch Repair  
MSI: Microsatellite Instability

**N:**

NCR: Natural Cytotoxicity Receptor  
NET: Neutrophil Extracellular Traps  
NFAT: Nuclear Factor of Activated T cells  
NFkB: Nuclear Factor-kappa B  
NK: Natural Killer  
NKG2: NK cell Group 2  
NKT: Natural Killer T  
NLR: Nucleotide binding oligomerization domain – Like-Receptor  
NO: Oxyde Nitrique  
NOS: Oxyde Nitrique synthétase

**O:**

OXPPOS: mitochondrial Oxidative Phosphorylation System

**P:**

PAMPs: Pathogen-Associated Microbial Pattern  
PBAF: Polybromo-associated BAF  
PBRM1: Polybromo-1  
PD-1: Programmed cell Death protein 1  
PD-L1: Programmed cell Death Ligand 1  
PGE<sub>2</sub>: Prostaglandin E<sub>2</sub>  
PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase  
PRR: Pattern Recognition Receptor  
PTEN: Phosphatase and Tensin Homolog

**S:**

SCF: Stem Cell Factor  
STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3

**T:**

TAM: Tumor-Associated Macrophage  
TAN: Tumor-Associated Neutrophil  
TCR: T-Cell Receptor  
TDO: Tryptophane-2,3-Dioxygénase  
Tem: effector memory T cell  
Tex: exhausted T cell  
Tcm: central memory T cell  
TGFβ: Transforming Growth Factor beta  
Th: T helper  
TIGIT: T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains  
TIL: Tumor-Infiltrating Lymphocytes  
TIM-3: T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3  
TLR: Toll-Like-Receptor

TLS: Tertiary Lymphoid Structures  
TNF: Tumor Necrosis Factor  
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin  
TOX: Thymocyte selection-associated high mobility group box gene  
TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand  
Treg: T regulator lymphocyte  
Trm: resident memory T cell

**V:**

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule 1  
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

## Figures

Figure 1. Incidence des éléments de l'environnement dans l'apparition de cancers. ....	20
Figure 2. <i>Hallmarks</i> du cancer.....	21
Figure 3. Stratégies thérapeutiques ciblant les différentes voies dérégulées .....	25
Figure 4. Evolution de la conception des anticorps. ....	26
Figure 5. <i>Timeline</i> de l'acceptation des traitements anti-PD-1 et anti-PD-L1 en fonction du type de cancers. ....	29
Figure 6. Les différents composants intrinsèques et extrinsèques qui induisent une hétérogénéité tumorale.....	32
Figure 7. Différences entre le système immunitaire inné et adaptatif. ....	34
Figure 8. Marqueurs discriminants les sous-populations immunitaires chez l'homme et la souris. ....	35
Figure 9. Les fonctions des DCs dans le microenvironnement tumoral par rapport à leur état d'activation .....	39
Figure 10. Les fonctions du macrophage dans le microenvironnement tumoral en fonction de sa polarisation .....	42
Figure 11. Les fonctions du neutrophile dans le microenvironnement tumoral en fonction de sa polarisation .....	44
Figure 12. Fonctions des M-MDSCs et PMN-MDSCs dans le microenvironnement tumoral.....	47
Figure 13. Fonctions des ILC dans le microenvironnement tumoral en fonction de sa polarisation ...	49
Figure 14. Fonction de la cellule NK dans le microenvironnement tumoral .....	52
Figure 15. Différence entre la mémoire immunitaire du système adaptatif et du système inné. ....	54
Figure 16. Les fonctions des T helpers en lien avec leur différenciation. ....	56
Figure 17. Évasion immunitaire de la tumeur par l'altération des cellules T effectrices .....	59
Figure 18. Les fonctions du lymphocyte B dans le microenvironnement tumoral en fonction de sa polarisation et de sa localisation.....	63
Figure 19. Les fonctions du lymphocyte Th9 dans le microenvironnement tumoral.....	65
Figure 20. Les fonctions du lymphocyte Th17 dans le microenvironnement tumoral.....	67
Figure 21. Les diverses fonctions immunosuppressives de Treg dans le microenvironnement tumoral .....	70
Figure 22. Représentation schématique de la dérégulation épigénétique au sein des cellules cancéreuses.....	73
Figure 23. Représentation schématique de la dérégulation des voies métaboliques dans le microenvironnement tumoral. ....	79
Figure 24. Les trois catégories phénotypiques immunitaires du cancer.....	80
Figure 25. Les fonctions du TGFβ au sein du microenvironnement tumoral .....	83
Figure 26. Modulation du système immunitaire par le VEGF dans le microenvironnement tumoral ..	83
Figure 27. Impact du PGE <sub>2</sub> sur les cellules immunitaires dans le contexte du cancer .....	85
Figure 28. Liste des points de contrôle immunitaire non exhaustive .....	87
Figure 29. Environnement immunosuppresseur médié par l'axe PD-1/PD-L1 .....	91
Figure 30. Mécanisme d'action de l'immunothérapie ciblant l'axe PD-1/PD-L1 .....	92
Figure 31. Fréquence des effets secondaires liés aux inhibiteurs de points de contrôle ciblant l'axe PD-1/PD-L1.....	94
Figure 32. Récapitulatif des bactéries présentes dans le microbiote et leurs impacts sur la tumeur. .	98

Figure 33. Les différents biomarqueurs prédictifs de l'efficacité des ICIs .....	99
Figure 34. Représentation graphique des différents types de résistances pouvant survenir suite aux traitements ciblant l'axe PD-1/PD-L1.....	100
Figure 35. Nombre de cas cliniques par mécanismes de résistance acquise .....	106
Figure 36. Nombre d'essais cliniques associés avec les 38 plus prometteuses cibles aux anti-PD-1 ou anti-PD-L1.....	110
Figure 37. Identification des gènes altérés <i>SERPINF1</i> et <i>FCNA</i> dans les modèles aPD-1-R et aPD-L1-R par analyse du RNAseq .....	179
Figure 38. Profil de sensibilité à l'anti-PD-1 et l'anti-PD-L1 observé lors de la modulation de l'expression du gène <i>FCNA</i> .....	180
Figure 39. Hypothèse mécanistique d'un effet compensatoire de résistance acquise permettant une inhibition de novo des lymphocytes T CD8+ .....	215
Figure 40. Image représentative du marquage PEDF sur des échantillons de tumeurs patients .....	217
Figure 41. Sensibilité au traitement anti-PD-1 sur le modèle MC38 implantation sous-cutanée <i>versus</i> orthotopique.....	220
Figure 42. Induction de la résistance acquise au traitement anti-PD-1 dans le modèle MC38 implanté en sous-cutanée <i>versus</i> orthotopique. ....	223
Figure 43. Microenvironnement immunitaire des tumeurs MC38 implantées en orthotopique.....	226
Figure 44. Imagerie représentative de 3 cas différents d'évolution en rapport avec la détection de la bioluminescence de LL-2-Luc. ....	229
Figure 45. Evolution tumorale de L1210 et de E0771 suite aux traitements avec anti-PD-1 ou anti-PD-L1.....	231
Figure 46. Cellules immunitaires infiltrant les ascites L1210. ....	235
Figure 47. Cellules immunitaires infiltrant les tumeurs E0771. ....	237
Figure 48. Différences sommaires entre les modèles tumoraux syngéniques WT utilisés. ....	241
Figure 49. Stratégie de fenêtrage représentatif d'un échantillon de tumeur MB49 WT.....	243
Figure 50. Image représentative de l'infiltration de neutrophiles et de NETs, dans des tumeurs MC38 WT et des tumeurs MC38 résistantes à l'anti-PD-1. ....	245

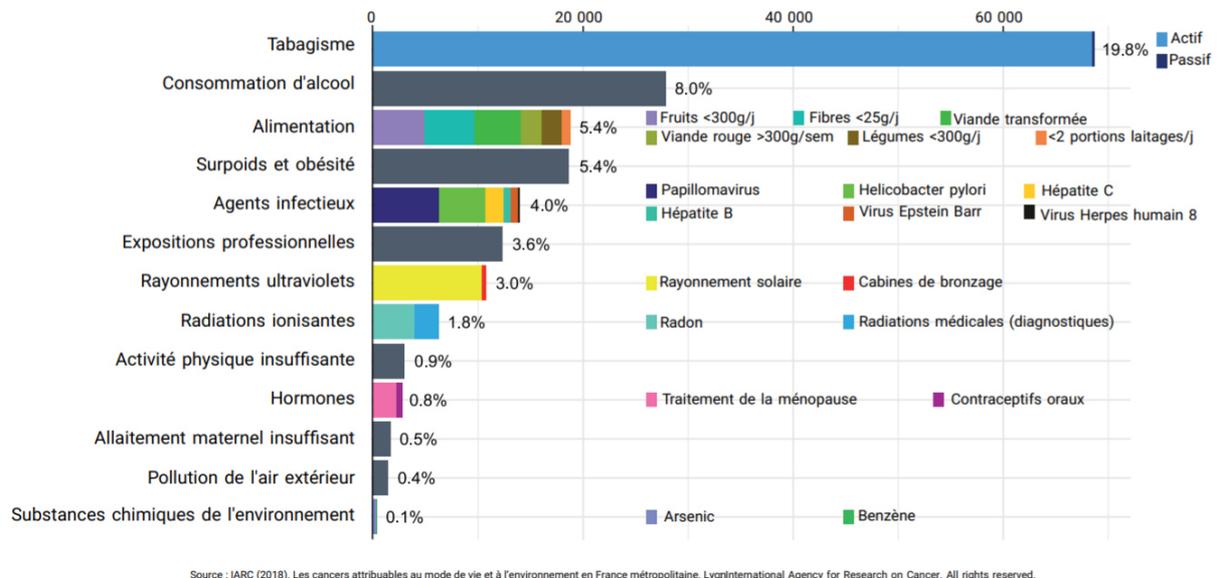
## Chapitre I. Introduction générale

Le cancer est devenu depuis 2004 la première cause de mortalité en France, suivie de près par les maladies cardiovasculaires<sup>1</sup>. L'augmentation de l'incidence des cancers s'explique notamment par l'accroissement et le vieillissement de la population mais aussi par un meilleur dépistage<sup>2</sup>. Tous les progrès en matière de dépistage, prévention et traitement, ont permis entre 2010 et 2018 de faire baisser le taux de mortalité de 0,7% et 2% par an, chez la femme et chez l'homme, respectivement<sup>3</sup>. Le terme « cancer » regroupe un type de maladies causées par des mutations génétiques qui permettent à la cellule d'échapper aux divers systèmes de surveillance, dont le système immunitaire. Toutes les cellules présentes dans le corps humain peuvent développer des mutations responsables de la production d'une tumeur. Ceci en fait une maladie extrêmement complexe, avec non moins de 200 types de cancers différents. En fonction du type cellulaire qui se transformera en cellules malignes, de sa détection, des traitements recommandés ou de manière générale de la prise en charge associée, les conséquences seront différentes. En effet, un patient atteint d'un cancer du pancréas n'a à ce jour malheureusement pas la même probabilité de survie qu'un patient atteint d'un cancer de la prostate ; bien que tous deux soient dénommés « cancer », leur devenir associé sera très différent.

### 1. Physiopathologie du cancer

Classiquement, on distingue trois étapes dans le processus de cancérogénèse : l'initiation, la promotion et la progression. Ceci implique des changements histologiques, morphologiques et génétiques des cellules qui permettront également une classification plus précise de la tumeur et donc une meilleure prise en charge. On distinguera ainsi quatre types de cancers : les carcinomes provenant d'une cellule épithéliale ; les sarcomes dérivant d'une cellule stromale ; les cancers hématopoïétiques issues des cellules souches sanguines ; les cancers neuro-ectodermiques dérivant des cellules nerveuses.

Plusieurs facteurs sont à l'origine de la transformation de cellules saines en cellules cancéreuses. Il est en outre estimé que 41% des cancers pourraient être évités car leur survenu est attribué à notre mode de vie et à l'environnement (Figure 1)<sup>3</sup>.

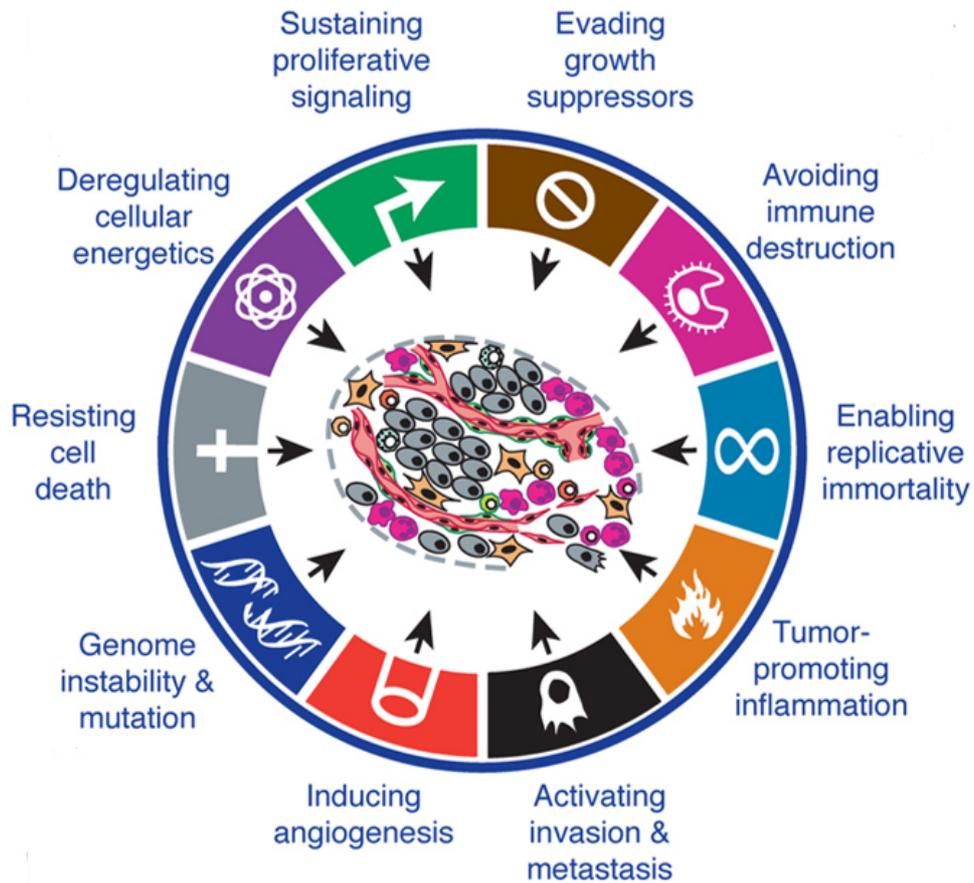


**Figure 1. Incidence des éléments de l'environnement dans l'apparition de cancers.** (Source INCa 2019). Histogramme empilé représentant le pourcentage et le nombre de personnes atteintes d'un cancer, par catégories et en fonction des facteurs environnementaux.

La progression tumorale est un processus long et complexe qui peut être classé en différents stades, de 0 à 4, pour les cancers solides tels que les carcinomes, qui représentent 80% du nombre total de cancers : d'un tissu normal, il deviendra hyperplasique puis dysplasique, se transformera en carcinome *in situ*, pour ensuite devenir une tumeur invasive et finalement métastatique.

Dans ce processus de développement, Hanahan et Weinberg ont décrit dix caractéristiques principales (Figure 2), à savoir: le maintien de la signalisation proliférative, l'inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs, l'immortalité cellulaire, la possibilité de réplication infinie, l'induction de l'angiogenèse, la possibilité de migration cellulaire, la reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement aux systèmes immunitaires qui, *in fine*, confèrent

à chaque cellule cancéreuse une instabilité génomique et un microenvironnement inflammatoire propices à leur développement<sup>4,5</sup>.



**Figure 2. Hallmarks du cancer** (Hanahan & Weinberg, Cell, 2011)<sup>5</sup>. Représentation des dix processus permettant aux cellules tumorales de proliférer de manière incontrôlée. Résistance aux signaux d'anti-croissance, échappement au contrôle du système immunitaire, potentiel réplcatif illimité, promotion d'un environnement inflammatoire, capacité à envahir les tissus et métastaser, induction de l'angiogénèse, accumulation de mutations, immortalité, reprogrammation de leur métabolisme, autosuffisance vis-à-vis des signaux de croissance.

## 2. Traitements

### A. Chirurgie

La chirurgie est aujourd'hui l'un des moyens les plus efficaces pour soigner les cancers. Le but est de faire l'exérèse de tout ou partie de la masse tumorale. On parle d'une résection complète lorsque les marges opératoires autour de la tumeur sont saines. La chirurgie est également de mise pour réduire une masse tumorale afin que la suite des traitements puisse être la plus efficace possible.

### B. Radiothérapies

Basée sur l'irradiation des cellules cancéreuses qui permet leur destruction, la radiothérapie est un traitement dit locorégional, c'est-à-dire qui agit directement sur la tumeur. Utilisée en situation néo-adjuvante ou adjuvante, elle peut également être efficace sur les tumeurs primitives ou les métastases. Les rayons utilisés proviennent, soit d'un faisceau de rayonnement externe (dans ce cas il s'agit de radiothérapie externe), soit d'une source implantée dans l'organisme, on parle alors de curiethérapie. Ce type de thérapie est utilisé dans un grand nombre de cancers différents. Nous pouvons citer les cancers du sein, de la prostate ou encore cérébraux<sup>6</sup>. Il est estimé que 60% des patients atteints de cancer en France bénéficieront de ce type de traitement<sup>7</sup>.

### C. Chimiothérapies

Les chimiothérapies cytotoxiques pénètrent dans les cellules cancéreuses et ont pour caractéristique d'avoir des cibles variées. Ces traitements se sont basés sur la capacité hyperproliférative des cellules tumorales. De ce fait, toutes les cellules ayant cette même capacité peuvent également être atteintes par le traitement et être détruites, donnant lieu à des effets secondaires parfois complexes à prendre en charge.

Les chimiothérapies sont de différents types :

Agents alkylants (cyclophosphamide, ifosfamide, cisplatine, carboplatine, oxaliplatine...) s'accrochent par liaisons covalentes sur l'ADN (Acide Désoxyribonucléique) et altèrent ainsi la réplication de la cellule.

Agents intercalants (doxorubicine, epirubicine, idarubicine, mitoxantrone...) comme leurs noms l'indiquent, ils vont s'intercaler entre les deux brins de l'ADN, provoquant le plus souvent une distorsion qui empêchera la réplication ou la transcription de l'ADN.

Anti-métabolites (5FU, cytarabine, gemcitabine, fludarabine, mercaptopurine, methotrexate...) vont permettre un arrêt de la synthèse des nucléotides et, *de facto*, altérer la réplication de l'ADN.

Agents du fuseau mitotique (vincristine, vindésine, vinblastine, vinorelbine, paclitaxel, docetaxel...) vont se lier à la tubuline et permettre le blocage de la mitose.

Inhibiteurs de topoisomérases (irinotecan, topotecan, etoposide...) empêchent l'action des enzymes topoisomérases I et II et interfèrent donc avec la transcription de l'ADN.

Ceci étant, l'hétérogénéité tumorale qui se crée lors de la multiplication des cellules, provoque chez certaines d'entre elles une résistance aux traitements et donc un échappement provoquant le plus souvent une rechute. Aussi, la chimiothérapie qui se distingue des traitements loco-régionaux par le fait qu'elle se diffuse dans l'ensemble de l'organisme, ne permet pas de guérir la plupart des patients au stade métastatique.

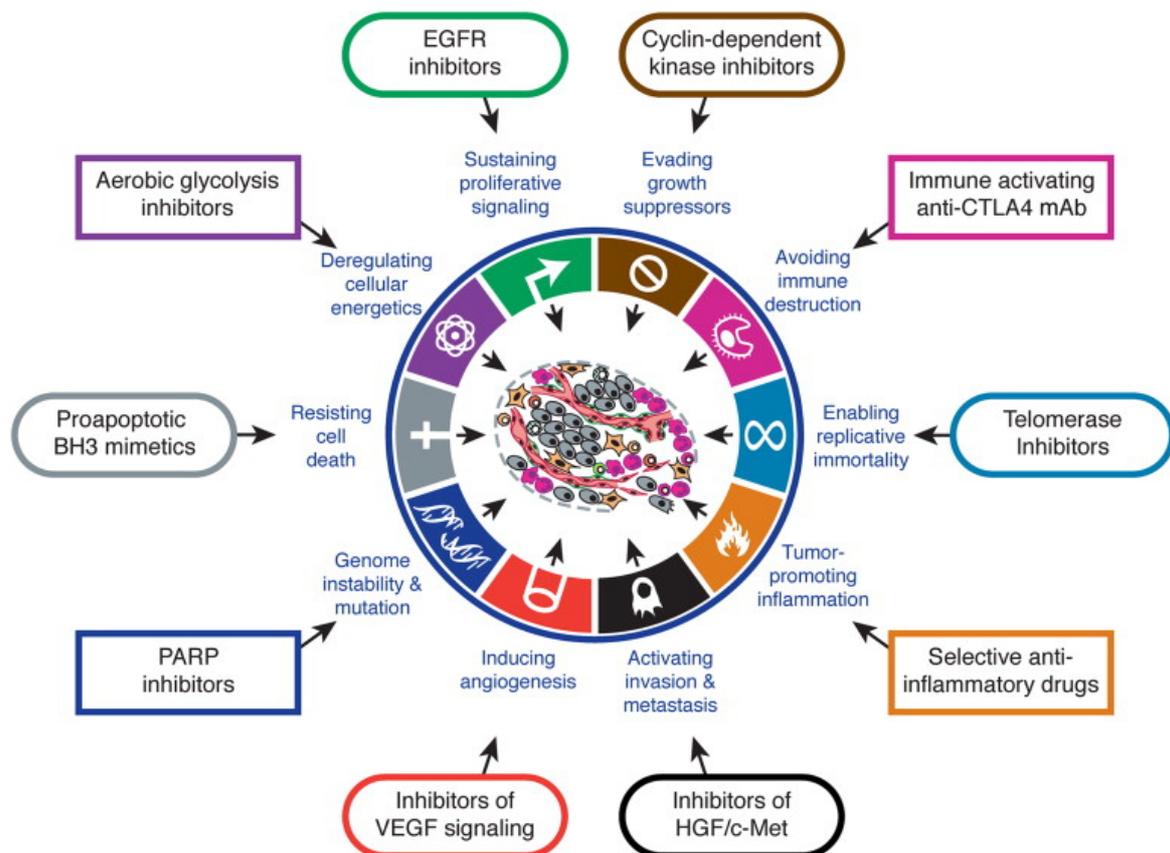
## D. Hormonothérapies

Certaines hormones circulant naturellement dans le corps, comme les œstrogènes ou la testostérone, peuvent être détournées de leur rôle premier et être amenées à stimuler le développement des cellules cancéreuses. Les cancers les plus fortement hormono-dépendants sont certains cancers du sein chez la femme et les cancers de la prostate chez l'homme. Les hormonothérapies sont de deux types : soit elles bloquent la production des hormones (anti-aromatases tel que l'anastrozole), soit elles bloquent l'action des hormones en se liant sur les récepteurs présents sur les cellules tumorales (anti-œstrogènes tel que le

tamoxifène). Généralement, les hormonothérapies seront administrées aux patients sur une durée de 5 ans après le traitement curatif initial, ce qui permet de réduire significativement le risque de récurrence<sup>8</sup>.

### E. Thérapies ciblées

A la fin des années 1990, la première thérapie ciblée approuvée, à savoir l'imatinib, a été le départ d'une longue liste de nouveaux traitements avec un profil de tolérance amélioré. Aujourd'hui, un quart des anticancéreux appartiennent à la catégorie des thérapies ciblées<sup>9</sup>. Ces traitements se basent sur l'identification d'anomalies biomoléculaires qui promeuvent le déséquilibre instauré par la cellule cancéreuse en faveur des facteurs pro-tumoraux et en défaveur des suppresseurs de tumeur. Les thérapies vont donc cibler spécifiquement l'anomalie potentiellement à l'origine de la tumorigénèse (Figure 3). Les thérapies ciblées peuvent être divisées en deux catégories : les petites molécules chimiques (« nib ») ; et les anticorps monoclonaux (« mab »).



**Figure 3. Stratégies thérapeutiques ciblant les différentes voies dérégulées** (Hanahan & Weinberg, Cell, 2011)<sup>5</sup>. Liste, non exhaustive, des médicaments qui interfèrent avec chacune des capacités acquises nécessaires à la croissance et à la progression tumorale ; en cours de développement ou déjà approuvés pour traiter les patients atteints de cancers.

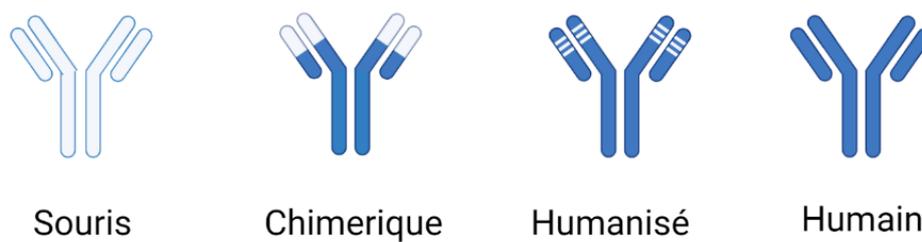
#### a. Petites molécules inhibitrices

Ce type de traitements permet d'atteindre des cibles variées, comme des récepteurs, des kinases ou encore des métabolites, afin de bloquer la voie de signalisation intracellulaire normalement activée suite à la liaison du ligand à son récepteur. Dans cette catégorie, nous pourrions citer les inhibiteurs de tyrosine kinase comme le lapatinib, un anti-HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) administré chez des patientes atteintes de cancer du sein<sup>10</sup>, ou encore l'afatinib un anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) efficace chez des patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules<sup>11</sup>. Ces molécules de petite taille vont pouvoir passer au travers de la membrane cytoplasmique pour inhiber la phosphorylation de tyrosine et donc empêcher l'activation du récepteur. D'autres molécules vont cibler des voies de signalisation spécifiques comme les inhibiteurs de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) : un contrôleur essentiel de la régulation de la prolifération, de la croissance ou de la mobilité cellulaire<sup>12</sup>, ou encore des inhibiteurs du cycle cellulaire anti-CDK4/6 (Cyclin Dependent Kinase)<sup>13</sup>.

#### b. Anticorps monoclonaux

Les traitements par anticorps monoclonaux s'appuient sur la surexpression de certains antigènes par la cellule tumorale. Les anticorps reconnaîtront de manière spécifique leur cible thérapeutique<sup>14</sup>. Ces anticorps sont composés d'une partie supérieure « Fab » (Fragment antigen binding) qui se lie à l'antigène et d'une partie inférieure « Fc » (crystallizable Fragment). La partie Fab des anticorps neutralise les antigènes et bloque les fonctions biologiques qui leur sont associées. La partie Fc permettra l'activation de différentes fonctions effectrices du système immunitaire (l'opsonisation, l'activation du complément ou encore la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps)<sup>14</sup>. L'enjeu, ces dernières années,

a été de créer des anticorps totalement humanisés pour augmenter leur efficacité et diminuer les effets secondaires liés aux différences d'espèces (Figure 4)<sup>15</sup>. En effet, les premiers anticorps développés ont été 100% murins « momab ». Ceux-ci ont donc provoqué une forte immunogénicité chez les patients rendant le traitement peu efficace avec une sévère toxicité<sup>16</sup>. C'est pourquoi la conception des anticorps thérapeutiques s'est dirigée vers le développement d'anticorps chimériques « ximab », humanisés « zumab » et humains « mumab ».



**Figure 4. Evolution de la conception des anticorps** (Adapté de Catapano et Papadopoulos, *Atherosclerosis*, 2013)<sup>17</sup>. La couleur bleu clair symbolise les parties produites à partir de cellules de rongeurs, la couleur bleu foncé symbolise les parties d'immunoglobuline humaine.

L'un des premiers anticorps chimériques, le rituximab, à avoir été autorisé pour le traitement des hémopathies lymphoïdes B, a montré une bonne efficacité et meilleure survie globale<sup>18</sup>. Ont suivi, les anticorps humanisés comme le trastuzumab, qui a permis de traiter 20% des cancers du sein (jusqu'à alors incurables) faisant partie d'une catégorie bien particulière et jusqu'alors de mauvais pronostic : les HER2<sup>+</sup><sup>14</sup>. L'avantage supplémentaire de ces anticorps est la possibilité d'améliorer leur efficacité en rajoutant un agent cytotoxique lié de façon covalente via un *linker*, tel que le mertansine, pour donner des anticorps dit combinés (Antibody-Drug Conjugates, ADC) comme le trastuzumab-mertansine administré chez les patientes atteintes de cancer du sein HER2<sup>+</sup><sup>19</sup>. Ce type d'approche permet notamment de limiter le relargage des agents cytotoxiques dans les tissus sains<sup>20</sup>. Finalement, est apparu le développement d'anticorps monoclonaux entièrement humains. Le panitumumab est le premier approuvé pour le traitement du cancer colorectal métastatique<sup>21</sup>.

Ces anticorps monoclonaux peuvent également cibler les néo-vaisseaux tumoraux. La tumeur a besoin pour se développer d'oxygène et de nutriments qui lui parviendront grâce à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Par exemple, les anti-VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ciblent l'angiogenèse, ce qui empêchera la formation de nouveaux vaisseaux et donc un environnement moins propice à la prolifération des cellules tumorales. Ce type de traitement est indiqué dans le cancer colorectal métastatique ou encore le cancer du rein métastatique<sup>22</sup>.

## F. Immunothérapies

Depuis maintenant 10 ans, l'immunothérapie est devenue un traitement incontournable qui a bouleversé la prise en charge des patients atteints de cancers. Le développement de l'immunothérapie a permis l'obtention de rémissions complètes durables chez les patients porteurs de formes avancées de mélanome autrefois incurables<sup>23</sup>. Actuellement de nombreux types tumoraux peuvent être traités par immunothérapie. Ce traitement agit sur le système immunitaire. Avec cette thérapie, le paradigme change : le traitement n'a plus pour but de détruire directement les cellules tumorales mais s'appuie sur la réactivation du système immunitaire afin que celui-ci puisse être en capacité de les détruire. L'immunothérapie permet d'augmenter l'action anti-tumorales des cellules immunitaires.

### i. Les biomolécules

Les premières immunothérapies développées visaient à stimuler la réponse immunitaire dans sa globalité. L'interleukin-2 (IL-2) et l'interféron- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) sont des cytokines naturellement présentes dans notre organisme. Elles ont pour but de stimuler les réponses cytotoxiques émanant des lymphocytes T. Si l'efficacité de l'IL-2 utilisé dans le cancer du rein ou l'IFN $\alpha$ 2b préconisé dans des leucémies ou myélomes, a été démontrée, elle s'est accompagnée d'une toxicité sévère limitant ainsi leur utilisation<sup>24</sup>. D'autres immunostimulants comme le  $\beta$ -Glucan ou le lipopolysaccharide (LPS) qui activent la réponse immunitaire innée pourraient être de futures thérapies prometteuses mais leur manque de spécificité est à l'origine d'effets secondaires importants<sup>25</sup>.

## ii. Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire

Ces inhibiteurs sont, sous forme d'anticorps, dirigés contre des récepteurs ou ligands impliqués dans le contrôle immunitaire. Le premier anticorps monoclonal à recevoir une autorisation de mise sur le marché fut l'ipilimumab, dirigé contre CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen-4, en 2011)<sup>26-28</sup>, suivi de près par les ICI ciblant PD-1 (Programmed cell Death Protein 1, en 2014) et PD-L1 (Programmed cell Death Ligand 1, en 2016)<sup>29</sup>. Ces dernières années, ce type de traitement s'est vu autorisé à être administré dans un nombre croissant de types tumoraux différents (Figure 5).

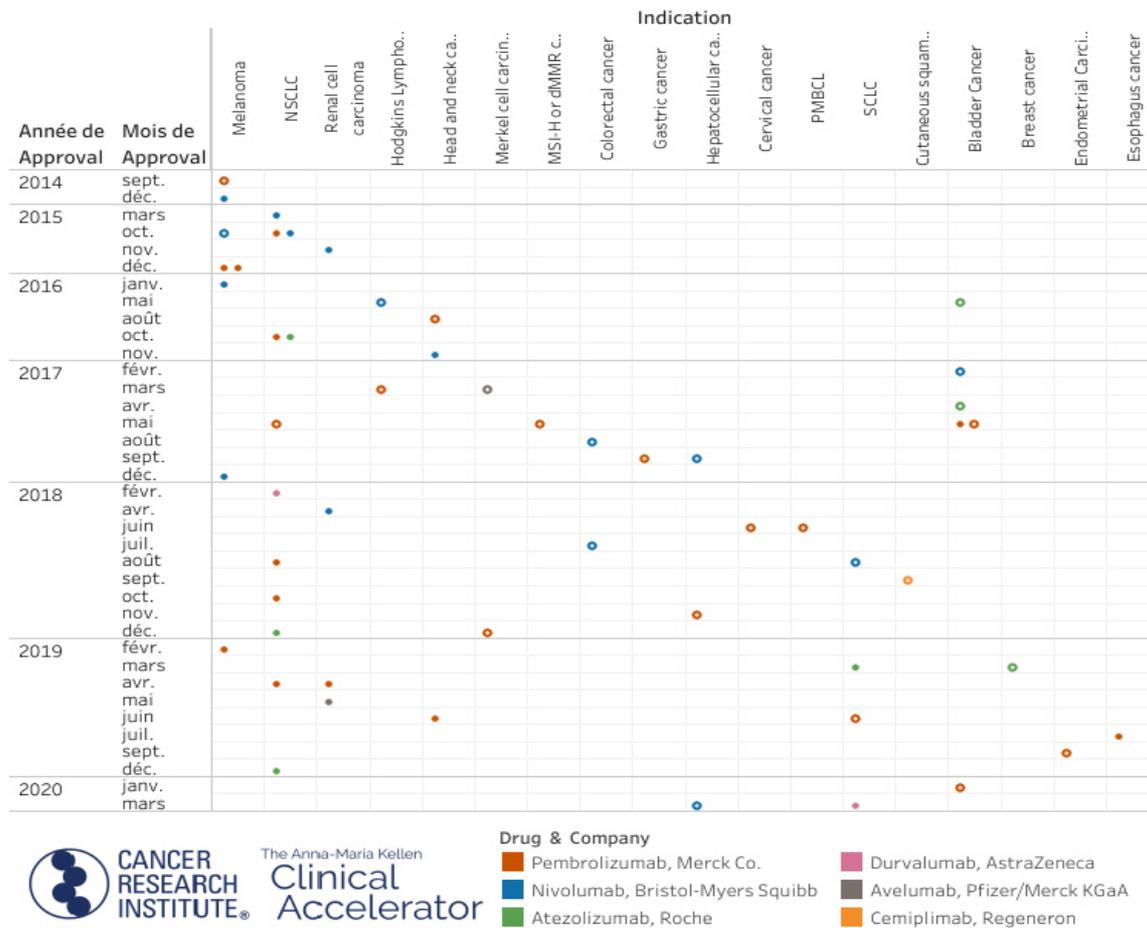
D'autres anticorps ciblant des points de contrôle immunitaire tels que TIM-3 (T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3), LAG-3 (Lymphocyte-Activation Gene 3) ou encore TIGIT (T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains) ou CD40 sont aujourd'hui testés en phases préclinique et clinique et pourraient venir enrichir l'arsenal thérapeutique<sup>30-</sup>

33 .

## Timeline of Anti-PD-1/L1 Antibody Approvals by the FDA

Updated on March 31, 2020, by Samik Upadhaya

Sources: CRI, CRI Analytics, and FDA



**Figure 5. Timeline de l'acceptation des traitements anti-PD-1 et anti-PD-L1 en fonction du type de cancers** (Cancer Research Institute). Année et mois de l'acceptation des différents anticorps à savoir : pembrolizumab, nivolumab et cemiplimab ciblant PD-1 ou atezolizumab, durvalumab et avelumab ciblant PD-L1 en fonction du type de cancer. (NSCLC - Non-Small Cell Lung Cancer, PMBCL - Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma, SCLC - Small Cell Lung Cancer).

### iii. Les anticorps bispécifiques

Ce type de traitement innovant se base ici sur le rapprochement mécanique des cellules tumorales avec des cellules effectrices du système immunitaire, créant une « synapse immunologique ». L'anticorps a la possibilité de s'accrocher aux deux cellules car doté de la capacité de reconnaissance de deux épitopes : un épitope spécifique d'un antigène présent en quantité sur les cellules tumorales et un autre présent sur les cellules immunitaires visées<sup>34</sup>.

Le premier anticorps bispécifique à avoir été autorisé fut le catumaxomab pour les ascites malignes (anti-EpCAM x anti-CD3)<sup>35</sup> suivi du dublinatumomab pour les leucémies aiguës lymphoblastiques de type B (anti-CD19 x anti-CD3)<sup>36,37</sup>.

#### iv. Transfert adoptif de cellules

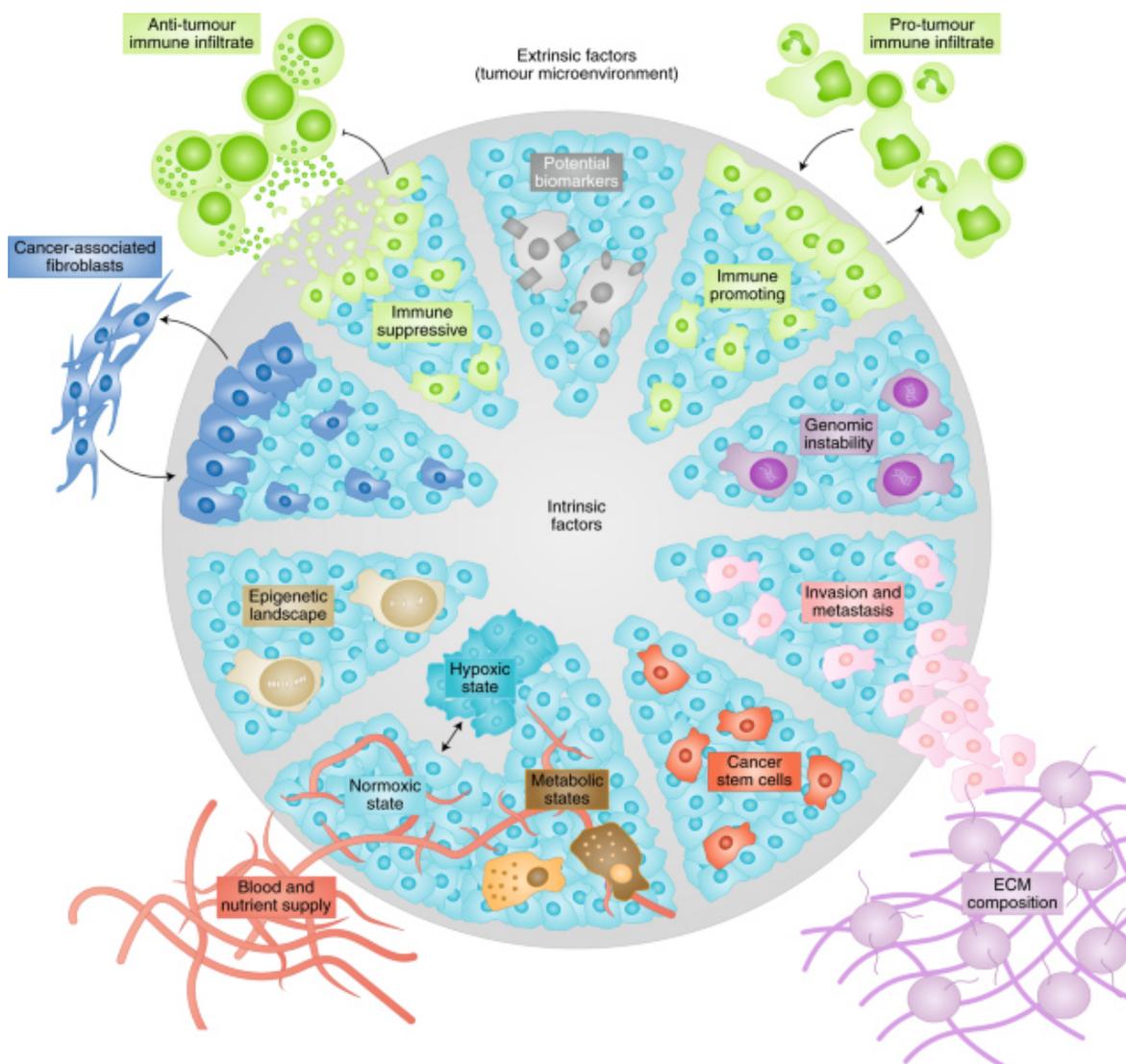
Dans les années 80, Rosenberg et Spiess découvrent le potentiel anti-tumoral des lymphocytes infiltrant les tumeurs (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, TIL). Ils démontrent, après stimulation avec l'IL-2, que les TILs sont plus efficaces pour détruire les cellules cancéreuses que les lymphocytes provenant du sang périphérique (Lymphokine-Activated Killer, LAK)<sup>38,39</sup>. Cette découverte a donné lieu à de nombreuses études cliniques en cours ; l'une d'entre elle (NCT02278887) devrait fournir des preuves concluantes sur le potentiel thérapeutique des TILs chez des patients atteints de mélanomes. Ce type de cancer est en effet un bon candidat à ce traitement car il possède un taux élevé et constant de charge mutationnelle et de néo-antigènes<sup>40</sup>. A l'inverse, d'autres types tumoraux qui possèdent des charges mutationnelles et néo-antigéniques très hétérogènes ne bénéficieront pas d'une réponse efficace suite à cette thérapie<sup>41</sup>.

Parallèlement à l'étude des TILs, les recherches se sont également orientées sur la possibilité de modifier génétiquement les lymphocytes. En 2017, deux médicaments ont reçu aux Etats-Unis une autorisation de mise sur le marché, pour les LAL B et lymphome. Il s'agit de la dernière innovation thérapeutique en oncologie. Cette thérapie s'appuie sur les lymphocytes T autologues prélevés chez le patient. Ceux-ci sont modifiés génétiquement *in vitro* pour exprimer à leur surface le récepteur chimérique choisi « chimeric antigen receptor » ou CAR-T. Les principales cibles actuellement testées en clinique sont CD19, mésothéline, EGFR, CD30 et BCMA. Ces lymphocytes T modifiés sont réinjectés aux patients; ils ont alors la capacité non seulement de reconnaître les cellules cancéreuses mais également de se diviser chez l'hôte<sup>42-44</sup>. Pour les lymphomes à grandes cellules B très agressifs, les patients qui rechutaient à la suite d'une greffe de moelle osseuse ou chimiorésistants ne pouvaient bénéficier d'aucune thérapie alternative efficace. Grâce aux CAR-T cells, on observe une réponse durable chez certains patients, hier encore impossible à soigner<sup>45</sup>.

### 3. Cancer et système immunitaire

Au-delà de leur aptitude hyper-proliférative, les cellules cancéreuses mettent en place un réseau leur permettant de créer leur propre microenvironnement. Cet environnement leur permet d'être auto-suffisantes et donc, de pouvoir assouvir leur besoin de prolifération excessive. Elles vont alors collaborer avec les cellules adjacentes du tissu sain, tels que les fibroblastes (permettant le remodelage de la matrice extracellulaire), les cellules endothéliales (permettant la fabrication de vaisseaux sanguins) et les cellules immunitaires (assurant leur protection).

Pour que ceci puisse se mettre en place, les cellules tumorales vont muter génétiquement et épigénétiquement, créant ainsi une variabilité importante d'altérations génétiques. Ceci permet une hétérogénéité tumorale extrêmement importante qui lui confère un potentiel prolifératif. Cette hétérogénéité se complexifie au gré de la croissance tumorale impliquant alors les différentes composantes extrinsèques et intrinsèques, spatiales et temporelles (Figure 6).



**Figure 6. Les différents composants intrinsèques et extrinsèques qui induisent une hétérogénéité tumorale** (Lawson et al, Nature cell biology, 2018)<sup>46</sup>. Facteurs intrinsèques : biomarqueurs, épigénétique, statut hypoxique, métabolisme, instabilité génomique. Facteurs extrinsèques : densité de la matrice extra-cellulaire, vascularisation, microenvironnement immunitaire.

Se rendre invisible auprès du système immunitaire est peut-être l'un des premiers mécanismes que les cellules tumorales doivent mettre en place pour pouvoir proliférer. Le système immunitaire regroupe des effecteurs biologiques permettant à un organisme le maintien et la cohérence des cellules et des tissus qui le constituent ; il en assure ainsi son intégrité en éliminant tout ce qui peut entraver son équilibre. Il permet d'assurer 3 rôles vitaux à savoir la définition du « soi », la reconnaissance du « non soi » et l'organisation de la défense

du « soi ». Ces trois fonctions peuvent expliquer, en partie, pourquoi le système immunitaire est passif face au développement tumoral. Les cellules cancéreuses créent un microenvironnement qui leur est favorable en s'appuyant notamment sur les mécanismes de contrôle qui évitent l'emballement du système immunitaire, normalement présent, pour empêcher le développement de maladies auto-immunes. Les immunothérapies précédemment citées s'attèlent à lever ces freins.

Dans cette sous-partie, nous décrivons le lien entre les cellules immunitaires et leurs fonctions intégrées dans un environnement classique ou tumoral, décrivant ainsi les différentes possibilités de combat du système immunitaire.

---

*La théorie des trois E illustre les mécanismes par lesquels les cellules tumorales tirent profit de la situation :*

*La première phase d'**Elimination** correspond à l'initiation de la réponse immunitaire anti-tumorale qui induit une réaction inflammatoire - précédemment citée - recrutant donc les cellules du système immunitaire inné. Celles-ci induisent la mort des cellules tumorales provoquant le relargage des débris tumoraux. Ceux-ci seront alors phagocytés afin que les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs), après migration dans les ganglions lymphatiques, puissent activer les lymphocytes T. Les lymphocytes T détruiront alors les cellules tumorales encore présentes. Une seconde phase d'**Equilibre** se met en place. Les cellules immunitaires contrôlent la croissance tumorale mais ne parviennent pas pour autant à toutes les éradiquer. C'est pendant cette phase que les cellules tumorales, non détruites, vont acquérir une résistance et pouvoir rentrer dans la troisième phase, l'**Echappement**. Ce processus d'échappement est permis par l'immunosélection, c'est-à-dire que les cellules tumorales ne sont plus reconnues par le système immunitaire. Également, les cellules tumorales acquièrent la capacité de supprimer la réponse immunitaire, il s'agit de l'immunosuppression.*

---

Dans le domaine de la cancérologie, afin de différencier les cellules immunitaires impliquées dans le microenvironnement tumoral, il a été défini les cellules dites anti-tumorales et pro-tumorales.

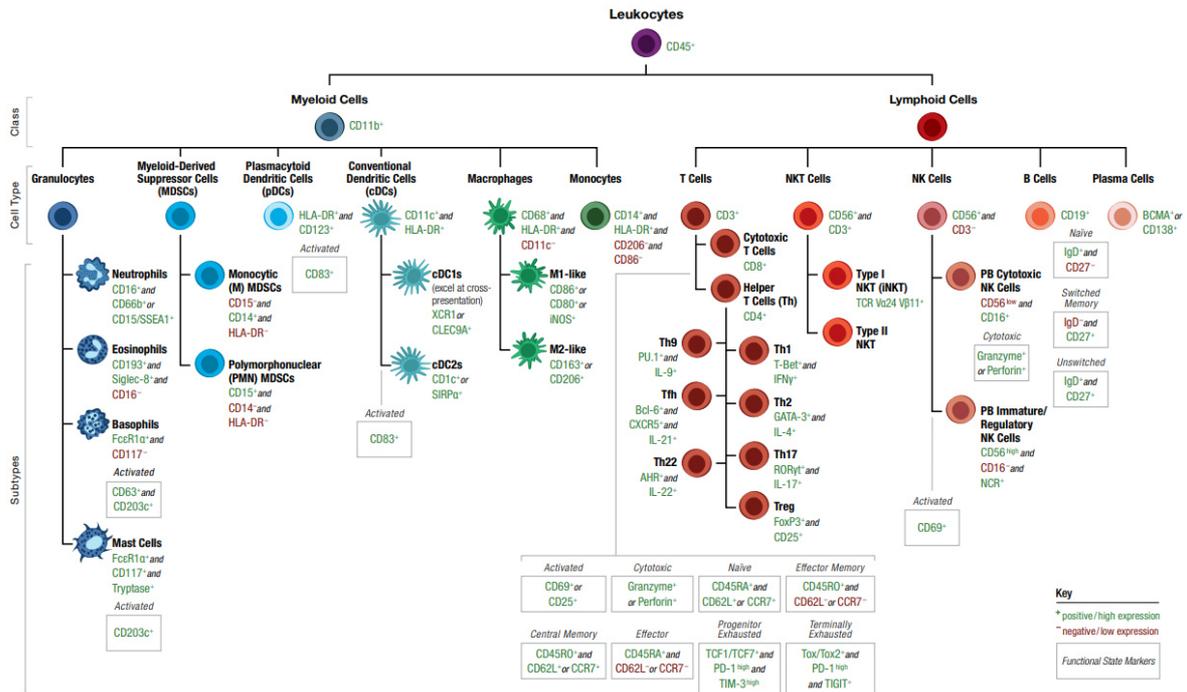
Pour plus de simplicité, cette partie est divisée entre les deux grands systèmes immunitaires inné et adaptatif (Figure 7).

<b>Phases des réponses immunitaires</b>			
<b>Réponses</b>		<b>Temps nécessaire pour que la réponse immunitaire s'enclenche</b>	<b>Durée de la réponse</b>
<b>Réponse immunitaire innée</b>	Inflammation, activation du complément, phagocytose, destruction du pathogène	Minutes	Jours
<b>Réponse immunitaire adaptative</b>	Interaction entre les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T: reconnaissance, adhésion, co-stimulation, prolifération et différenciation	Heures	Jours
	Activation des lymphocytes B spécifiques à l'antigène	Heures	Jours
	Développement des lymphocytes T effecteurs et mémoires	Jours	Semaines
	Interaction entre les lymphocytes T et B afin de former un centre germinal. Développement des lymphocytes B effecteurs, des cellules plasmiques et des lymphocytes B mémoires. Sécrétion d'anticorps	Jours	Semaines
	Migration des lymphocytes effecteurs des organes lymphoïdes vers le site d'infection	Quelques jours	Semaines
	Élimination par les cellules effectrices et les anticorps du pathogène	Quelques jours	Semaines
<b>Mémoire immunologique</b>	Maintien d'une mémoire immunitaire par les lymphocytes B et T, protection contre une réinfection	Jours à semaines	Peut durer toute la vie

**Figure 7. Différences entre le système immunitaire inné et adaptatif** (Adaptation de Janeway's Immunobiology, 8 Edition, 2020)<sup>47</sup>.

Également, le détail des marqueurs classiquement utilisés pour identifier les sous-populations immunitaires humaines et souris est disponible en figure 8.

## Human immune cell markers



## Mouse immune cell markers

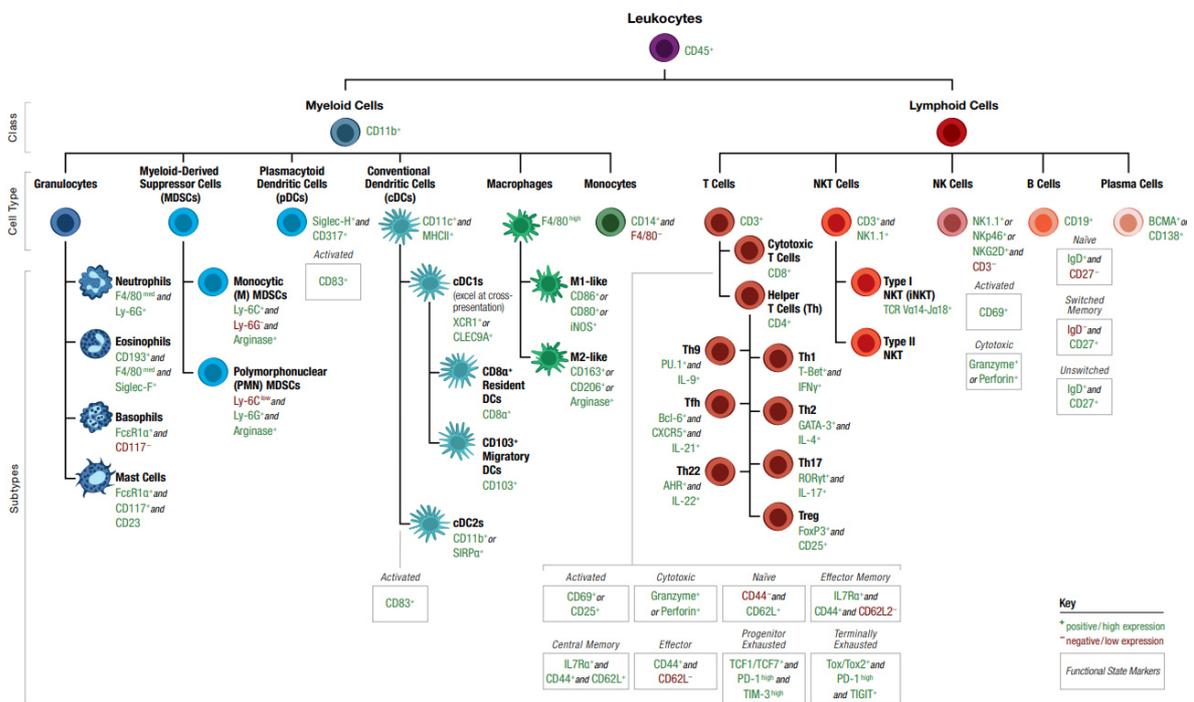


Figure 8. Marqueurs discriminants les sous-populations immunitaires chez l'Homme et la souris (Cell signalling resources). Les cellules immunitaires sont discriminées grâce au CD45.

Le pan myéloïde et lymphoïde sont dissociés à l'aide du CD11b, puis chaque sous-population exprimera un ou plusieurs marqueurs qui lui est propre.

## A. Microenvironnement tumoral et immunité innée

La première ligne de défense est une réponse immunitaire innée non spécifique pouvant se mettre en place rapidement, sans mémoire immunitaire. Ce dernier dogme commence à être largement remis en cause par le concept de cellules dites entraînées ou de « trained immunity », ce que nous détaillerons à la fin de cette sous-partie<sup>48,49</sup>. Les cellules immunitaires qui sont actives durant cette réponse sont les cellules myéloïdes, les lymphocytes  $\gamma\delta$  et les cellules NK (Natural Killer).

La détection des signaux de danger est permise par les PAMPs (Pathogen-Associated Microbial Pattern), les DAMPs (Damage-Associated Molecular Pattern) et le « missing self » c'est-à-dire la non-détection de molécules normalement exprimées par la cellule. A la suite de la détection du danger, les PRR (Pattern Recognition Receptor) présents sur les cellules immunitaires vont être activés et induire la réponse appropriée. Nous pouvons citer dans les PRR : les TLR (Toll-Like-Receptor), CTLR (C-Type Lectin Receptor) ou encore les NLR (Nucleotide binding oligomerization domain – Like-Receptor). L'environnement créé est inflammatoire. Si les TLRs sont activés, la voie intracellulaire MyD88 ou TRIF est induite, entraînant alors la production de cytokines inflammatoires comme l'IL-12 qui pourra activer les cellules NK. Les macrophages pourront également être activés à la suite de la sécrétion de l'IFN $\gamma$  par les cellules NK<sup>47</sup>. Une fois activés, les macrophages secrètent de l'IL-8 ce qui induit le recrutement des neutrophiles par chimiotactisme. Si les NLRs sont stimulés, la formation de l'inflammasome s'effectuera permettant l'activation de la caspase 1 qui déclenchera la sécrétion par les macrophages de l'IL-1 $\beta$  et IL-18 cytokines pro-inflammatoires<sup>50</sup>.

Au-delà de la création d'un environnement inflammatoire et de la phagocytose, les cellules du système immunitaire inné peuvent également s'appuyer sur d'autres processus comme le complément. Le système du complément se met en place grâce à une activation en cascade de protéines. Trois voies peuvent activer ce système: la voie classique, la voie des lectines ou

la voie alterne, induisant toute la formation du complexe d'attaque membranaire, entraînant la lyse et la phagocytose des pathogènes<sup>47</sup>.

Lors de cette réponse, chaque cellule qui compose ce système immunitaire inné aura un rôle particulier. Nous verrons en détail dans les parties suivantes comment leur rôle physiologique sera détourné par les cellules tumorales.

#### a. Cellules dendritiques anti *versus* pro-tumorales

Ces cellules, longtemps considérées comme des macrophages, sont les chefs d'orchestre de l'immunité. Les cellules dendritiques (DC) ont de multiples fonctions qui leur confèrent un rôle essentiel dans la défense du soi. Elles proviennent des cellules progénitrices CDP (Common Dendritic cell Progenitor)<sup>51</sup>. Leur caractéristique essentielle est d'être une cellule présentatrice d'antigène (CPA). Elles font le lien entre systèmes inné et adaptatif. En effet, en fonction de l'élément étranger détecté, elles orientent la réponse immunitaire adaptative.

L'étude des DCs identifie aujourd'hui plusieurs sous-populations : on distingue les DC conventionnelles (cDC), les DC plasmacytoïdes (pDC) présentes dans les organes lymphoïdes secondaires, le sang mais aussi les tissus périphériques et au sein des tumeurs. Cette classification s'est notamment faite par la présence des TLRs. Les pDCs ont à leur surface les TLR7 et 9 qui induisent une réponse immunitaire humorale tandis que les cDCs possèdent les TLR1, 2, 3, 5, 6 et 8 qui influencent une réponse immunitaire à médiation cellulaire<sup>52</sup>. Chaque TLRs reconnaît un type moléculaire particulier qui permettra l'engagement de la réponse immunitaire appropriée<sup>53</sup>. Deux sous-populations, les DCs inflammatoires dérivées des monocytes (mo-DC) et les cellules de Langerhans, sont quant à elles, essentiellement localisées dans les tissus.

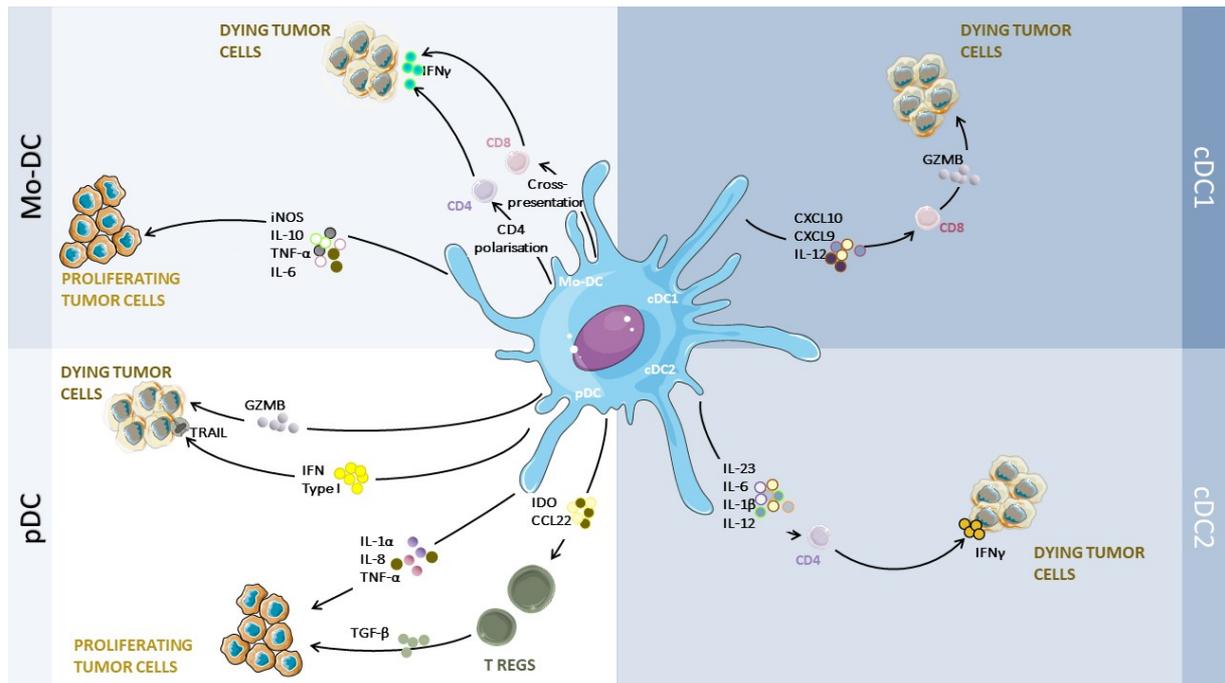
Bien que les DCs soient peu présentes dans les tumeurs, elles n'en restent pas moins essentielles à l'initiation de l'immunité anti-tumorale. Dans le microenvironnement tumoral, le degré de suppression immunitaire causée par la tumeur va influencer le changement phénotypique des DCs, directement corrélé avec l'activation des cellules T effectrices<sup>54</sup>.

Les cDCs sont divisées en deux sous-types cDC1 (CD8+, CD103+) et cDC2 (Sirpα+, CD1c). Les cDCs1 ont une forte capacité intrinsèque de cross-présentation qui permet l'activation des CD8+ cytotoxiques et promeut la réponse Th1 (T helper). Elles sont également capables comme pour les cDCs2 d'activer les cellules T CD4+, comme l'a récemment démontré Ferris et al.<sup>55</sup>, orientant ainsi le système immunitaire vers une activation de type Th2. La restauration des fonctions des cDCs est essentielle pour améliorer l'immunogénicité tumorale et, par la suite, permettre aux immunothérapies d'être efficaces<sup>56</sup>.

Les pDCs, quant à elles, vont être reconnues phénotypiquement chez la souris grâce à l'expression de Siglec H, B220 ou CD11c<sup>low</sup> et vont produire de l'IFN de type 1, de l'IL-12, de l'IL-6 ou encore du TNFα (Tumor Necrosis Factor). Le rôle des pDCs dans un contexte tumoral reste à déterminer. Leur rôle anti-tumoral a été décrit dans une étude utilisant la lignée cellulaire de mélanome B16. Suite à la stimulation des pDCs avec des agonistes de TLRs, ceux-ci vont médié la destruction de la tumeur par plusieurs moyens: l'expression du ligand inducteur de l'apoptose liée au TNF (TRAIL), la sécrétion des granzymes B et C et la production de l'IFN de type 1 permettant l'activation des cellules cytotoxiques T et NK<sup>52,57</sup>. A l'inverse dans les tumeurs du sein et de l'ovaire, il a été démontré un état hypo-fonctionnel des pDCs. Cet état induit une mauvaise production de l'IFN de type I et une capacité accrue d'induire la prolifération des Tregs (lymphocyte T régulateurs)<sup>58-60</sup>. La reprogrammation moléculaire des pDCs dans le microenvironnement tumoral doit être explorée pour mieux comprendre quels facteurs sont responsables de leur rôle sous-jacent. Ceci pourrait permettre le développement de nouvelles thérapies.

Concernant les mo-DCs, leurs origines et rôles précis restent à définir. Selon une analyse transcriptomique, ils semblent être à l'interface entre les DCs et les monocytes/macrophages<sup>61</sup>. Certaines fonctions effectrices comme la production de cytokines telles que TNFα, IL-10 et IL-12 ou la production de NO (Oxyde Nitrique), leur confère un rôle dual qui leur permet d'enclencher une réponse immunitaire de type Th1 anti-tumorale ou pro-tumorale favorisant un environnement immunosuppresseur<sup>62,63</sup>.

Les différentes fonctions de ces populations dendritiques sont schématisées en figure 9.



**Figure 9. Les fonctions des DCs dans le microenvironnement tumoral par rapport à leur état d'activation** (Adapté de Lucarini et al, *Cancers*, 2021)<sup>64</sup>. L'activité anti-tumorale sera principalement médiée par les cDC1s et cDC2s. Les cDC1 recrutent et activent les lymphocytes T CD8+ *via* la production de cytokines et la présentation d'antigènes tumoraux. Les cDC2 activent les lymphocytes T CD4+. Les moDC stimulent les cDC1 et les cDC2, permettant ainsi l'activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+. Les pDC sont, quant à elles, capables de détruire les cellules tumorales par l'expression d'IFN- $\alpha/\beta$ , de TRAIL et de Granzyme B (GZMB). Les moDC et les pDC peuvent également avoir une action pro-tumorale. Les moDC produisent des molécules immunosuppressives telles que iNOS, TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-10. Les pDC sécrètent des chimiokines capables de recruter des Tregs *via* CCL22 et IDO, ainsi que des cytokines pro-angiogéniques TNF $\alpha$ , IL-8 et IL-1 $\alpha$ .

## b. Macrophages *versus* TAM

L'expression élevée de CD14 caractérise les monocytes classiques produits à la suite de la différenciation des progéniteurs ayant reçu comme signal M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), IL-3 et IL-6. Lorsqu'ils sont stimulés, on parle alors de monocytes pro-inflammatoires avec une co-expression de CD16. Ils contribuent à un environnement inflammatoire avec notamment la sécrétion d'IL-12. Les monocytes sont des cellules circulantes capables de diapédèse. Une fois dans leurs tissus résidents, elles se transforment en phagocytes : microgliocytes (système nerveux central), ostéoclastes (tissu osseux) ou

encore macrophages (tissu conjonctif). Ces derniers sont à l'interface des systèmes immunitaires dit inné et adaptatif.

Les macrophages ont pour fonction principale la phagocytose ce qui en fait une arme redoutable pour la défense du soi. Ils ont également la particularité d'exprimer le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2 (CMH II) qui permet la présentation des antigènes aux cellules du système immunitaire dit adaptatif, déclenchant son activation<sup>65</sup>.

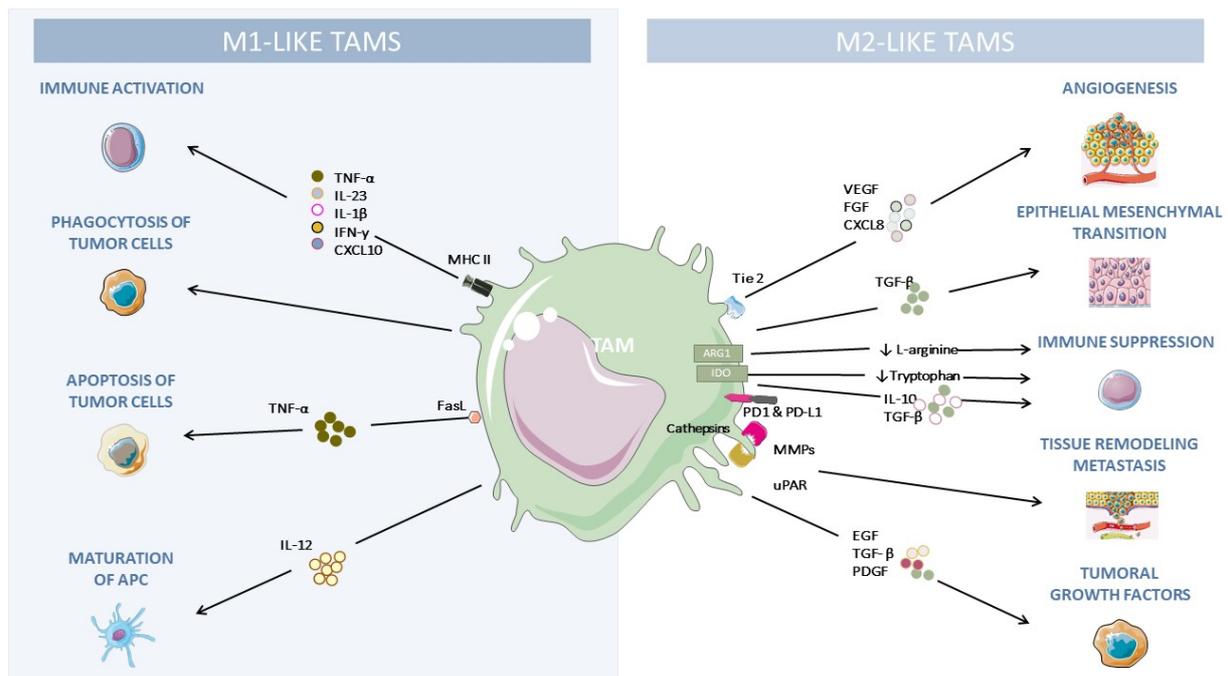
Les macrophages sont déterminants dans la progression tumorale. C'est l'une des populations immunitaires majoritaires présentes dans le microenvironnement tumoral. Cependant, l'étude de leur implication est complexe, notamment due à la nomenclature des TAMs (Tumor Associated Macrophages) qui reste controversée : aucune des propositions de classification ne fait encore consensus dans la communauté scientifique.

En effet, depuis la découverte de leurs caractères modulables en fonction de la présence d'IL-4/IL-13 ou IFN $\gamma$ /LPS<sup>66</sup>, la complexification des caractères phénotypiques des macrophages n'a fait qu'augmenter. Mills a d'abord théorisé une polarisation binaire M1/M2, anti-tumorale *versus* pro-tumorale qui s'est vite avérée trop minimaliste ; celle-ci a été étoffée ensuite par la subdivision des M2 en trois populations. La première population, les M2a font référence à un macrophage activé alternatif, les M2b sont, quant à eux, décrits comme des macrophages pro-tumoraux et enfin les M2c sont décrits comme inactifs<sup>67,68</sup>.

Cependant, la dernière découverte sur l'ontogenèse des macrophages a mis en lumière un nouveau paradigme. A ce jour, nous savons que les macrophages ne proviennent pas exclusivement des monocytes circulants dérivant de la moelle osseuse. Les macrophages résidant dans les tissus émanent aussi de précurseurs embryonnaires qui y résident avant la naissance et s'y maintiennent localement tout au long de l'âge adulte<sup>69-71</sup>. La dynamique varie entre les organes, l'âge et les sous-ensembles de macrophages. Dans certains organes tels que le cerveau, les poumons et le foie, certains macrophages dérivés d'embryons se maintiennent par auto-renouvellement chez l'adulte alors que dans l'intestin, la peau, le cœur et le pancréas la plupart des sous-ensembles sont progressivement remplacés par la différenciation des précurseurs des monocytes de l'hématopoïèse adulte en macrophages dérivés des monocytes

circulants. On pourrait s'attendre à ce que l'ontogenèse des macrophages et leur localisation anatomique définissent des niches spécifiques dictant leur polarisation vers un phénotype et une fonction spécifique. Toutefois, comprendre le lien entre l'ontogenèse des TAMs et leurs diverses fonctions dans la croissance tumorale et l'interaction avec le système immunitaire reste un défi, du fait notamment de l'absence de marqueurs phénotypiques définissant le TAM en fonction de son origine<sup>72</sup>. Déterminer les sous-ensembles des TAMs permettrait également de caractériser de nouvelles cibles thérapeutiques et de mieux comprendre les effets de traitements actuels comme l'anti-CSF1R<sup>73</sup>. En effet, cibler l'axe CSF1/CSF1R semble permettre de reprogrammer les TAM M2-like en M1-like<sup>74</sup>. Cependant, au-delà du fait que la définition des sous-populations des TAMs est encore aujourd'hui un défi, il n'en reste pas moins une certitude : ces cellules jouent un rôle majeur dans la progression tumorale.

Les TAMs sont impliqués dans l'angiogenèse, l'inactivation des lymphocytes T, l'induction des lymphocytes T régulateurs, le remodelage tissulaire ou encore le développement de métastases<sup>75</sup>. Dans les modèles murins, il est possible de déterminer une tendance phénotypique des macrophages dérivant des monocytes grâce aux marqueurs F4-80, Ly6C, CD206 et CMH II<sup>76,77</sup>, permettant ainsi de déterminer si les TAM présents dans le microenvironnement tumoral ont un profil anti-ou pro-tumoral. Les TAM de type M1-like auront la capacité de sécréter des cytokines pro-inflammatoires de type IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  ou IL-6 et exprimeront des marqueurs tel que CD80/86 ou CMH II, tandis que les TAM de type M2-like secrèteront du TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) ou encore de l'IL-10 et exprimeront le CD206 ou le CD204 (Figure 10)<sup>78,79</sup>.



**Figure 10. Les fonctions du macrophage dans le microenvironnement tumoral en fonction de sa polarisation** (Adapté d'Anfray et al, Cells, 2020)<sup>80</sup>. Panel de gauche : les TAM de type M1-like produisent des cytokines et interleukines qui permettront le recrutement des cellules immunitaires de type anti-tumoral, ainsi que la maturation des CPA. Ils auront également un rôle direct anti-tumoral grâce à leur capacité de phagocytose et le relargage de TNF $\alpha$ . Panel de droite : les TAM de type M2-like auront, eux, la capacité de créer un microenvironnement immunosuppresseur par la production de facteur pro-angiogénique, du TGF $\beta$  ou encore d'IL-10, induisant l'activation des Tregs et l'inactivation des CTLs.

### c. Neutrophiles *versus* TAN

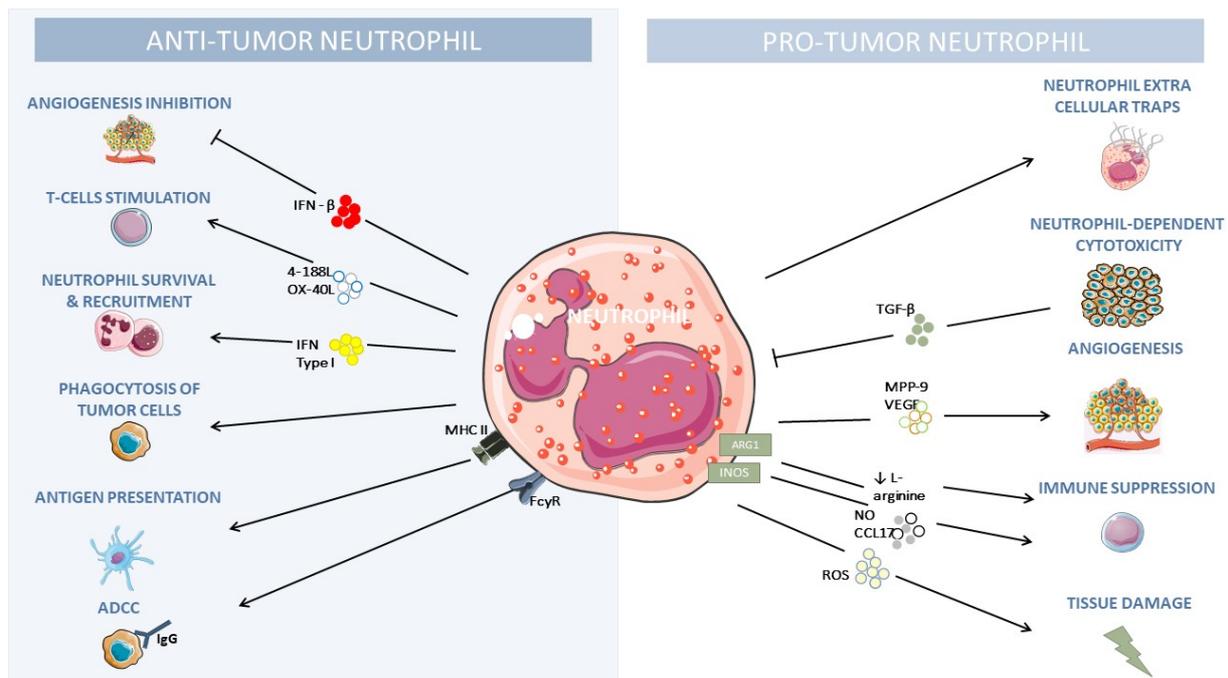
Lors du processus de différenciation hématopoïétique myéloïde, trois types cellulaires sont produits en présence de G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) et de l'IL-3 : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles.

Les neutrophiles représentent environ 60% des globules blancs dans le sang périphérique. Ils sont recrutés grâce au gradient chimiotactique médié par l'IL-8. Ceci leur permet d'être guidés vers le lieu de l'inflammation. Ils peuvent alors exercer leur fonction principale, à savoir la phagocytose. La phagocytose est mise en jeu à la suite de la reconnaissance de leurs cibles. Les neutrophiles peuvent, soit reconnaître directement les bactéries, soit être aidés par leur

opsonisation, c'est-à-dire que la paroi bactérienne sera recouverte par des anticorps, ce qui permettra aux neutrophiles de les détecter plus facilement grâce à la partie Fc des anticorps<sup>81</sup>.

Les neutrophiles infiltrant les tumeurs (Tumor-Associated Neutrophils, TAN) sont ainsi définis comme type N1 anti-tumoral et comme type N2 pro-tumoral (Figure 11). Les cellules tumorales vont donc tirer parti de cette dualité pour favoriser la prolifération des N2 plutôt que des N1<sup>82</sup>.

La présence de TANs est directement corrélée à un mauvais pronostic dans les cancers du rein, colorectal, mélanome, pancréatique ou encore du foie<sup>83</sup>. Notamment la production de MMP9 par les TANs contribue à l'angiogenèse, la progression tumorale et la formation de métastases<sup>84</sup>. Cependant, le rôle des neutrophiles reste controversé et semble être directement lié au contexte et au stade de développement du cancer. Dans le stade précoce de développement du cancer de poumon, les TANs expriment OX40L et 41BBL, molécules co-stimulants des lymphocytes T CD4 et CD8<sup>85</sup>. Il a également été décrit que les TANs pourraient être des CPA et donc permettre l'activation des lymphocytes T<sup>86</sup>. A l'inverse, les TANs détectés dans des stades tardifs III et IV chez des patients atteints de cancer du poumon présenteraient un profil immunosuppresseur plus fort que ceux retrouvés chez les patients atteints d'un cancer de stade I et II, avec notamment une augmentation d'expression de PD-L1 et d'Arginase 1 (ARG 1)<sup>87,88</sup>. Une nouvelle fonction pro-tumorale a récemment été décrite, à savoir les pièges extracellulaires à neutrophiles (Neutrophil Extracellular Traps, NET). Ces fibres sont des structures de chromatine fibreuse décondensées associées à des histones, de la myéloperoxydase, de l'élastase, de la cathepsine G et de la lactoferrine, libérées par les neutrophiles<sup>89</sup>. Dans un contexte tumoral, les NETs permettent à priori de favoriser la progression tumorale et la dissémination métastatique<sup>90-92</sup>. Cependant, ce rôle pro-tumoral apparent nécessite de futures investigations afin de déterminer les fonctions précises des NETs.



**Figure 11. Les fonctions du neutrophile dans le microenvironnement tumoral en fonction de sa polarisation** (Adapté de Kalafati et al, *Frontiers in Oncology*, 2020)<sup>93</sup>. Panel de gauche : les fonctions anti-tumorales des neutrophiles sont induites par leur capacité à inhiber l'angiogenèse, à activer et stimuler les CTLs et à phagocyter les cellules tumorales. Panel de droite : les neutrophiles auront également la capacité d'inhiber l'activation des cellules immunitaires anti-tumorales et d'induire un environnement immunosuppresseur.

#### d. Eosinophiles/Basophiles

Les éosinophiles et basophiles sont, quant à eux, présents en plus faible nombre dans le sang. Les éosinophiles ont pour fonction principale l'exocytose de protéines volumineuses pour permettre la destruction d'organismes comme les parasites. Les basophiles sont associés aux manifestations allergiques immédiates médiées par les immunoglobulines (Igs) de types IgE.

La présence des éosinophiles dans le microenvironnement tumoral, est corrélée à un meilleur pronostic dans le cancer de la prostate, colorectal, œsophagien ou encore naso-pharyngé<sup>94-97</sup>. Leur rôle bénéfique proviendrait de leur dégranulation mais leurs fonctions ne sont pas bien connues<sup>98</sup>. Ils sont également fortement présents dans les zones nécrotiques<sup>99,100</sup>.

Les basophiles ont longtemps été considérés comme des cellules participant aux troubles allergiques uniquement. Ce n'est qu'à la suite de la découverte du potentiel sécrétoire d'IL de

type 3, 4 ou 13 que leur rôle immunomodulateur a été étudié<sup>101-103</sup>. Ils peuvent, entre autres, relarguer des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF-A<sup>104</sup>. Leur rôle dans le microenvironnement tumoral n'est pas encore bien défini, et semble dépendre du modèle expérimental utilisé ainsi que du stade tumoral étudié (localisé *versus* avancé). Cependant, il a été décrit qu'ils seraient capables d'induire la polarisation des macrophages en M2-like et auraient également la capacité de produire des équivalents de NETs, dénommés « Basophil-Extracellulaire-Traps », dont le rôle reste à définir dans le contexte du cancer<sup>105-107</sup>.

#### e. M-MDSC *versus* PMN-MDSC

Les cellules suppressives dérivées de cellules myéloïdes (Myeloid Derived Suppressor Cells - MDSC) sont une population cellulaire extrêmement étudiée dans le contexte du cancer. Deux sous-types sont aujourd'hui définis : les monocytes - M-MDSC et les neutrophiles - PMN-MDSC.

Cependant, l'origine et les caractéristiques de ces cellules sont peu connues. En effet, les connaissances disponibles ne permettent pas encore de les différencier des monocytes et des neutrophiles classiques, ainsi que des TAM et des TAN. Les discriminer est à ce jour encore un défi. Certaines études ont montré des spécificités génomiques, protéomiques et métaboliques qui suggèrent que les MDSC sont des neutrophiles ou monocytes pathologiquement activés<sup>108-110</sup>.

De ce fait, la frontière entre ces populations est mince, notamment chez la souris ; les marqueurs phénotypiques utilisés pour les MDSC se recoupent avec ceux utilisés pour les monocytes et neutrophiles, à savoir, Ly6G<sup>low</sup>-Ly6C<sup>hi</sup> et Ly6G<sup>hi</sup>-Ly6C<sup>med</sup> respectivement.

La population de PMN-MDSC a émergé comme un contingent régulateur négatif critique des réponses immunitaires dans de nombreuses conditions pathologiques et un partenaire majeur des cellules mésenchymateuses dans la promotion des métastases tumorales. La distinction entre PMN-MDSC et neutrophiles est débattue depuis de nombreuses années. Ces cellules sont phénotypiquement et morphologiquement similaires. La principale caractéristique des PMN-MDSC, qui les distingue des neutrophiles, est son activité

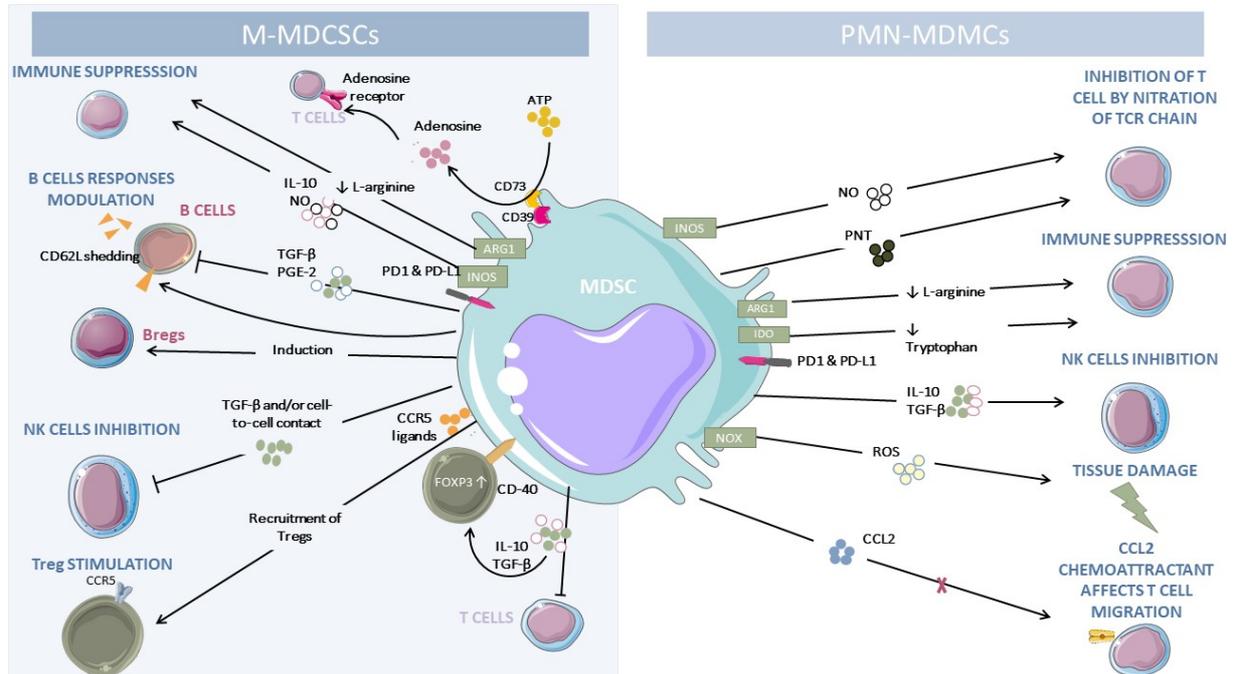
immunosuppressive. Récemment, davantage de données ont émergé indiquant que ces cellules pourraient être distinguées sur la base de caractéristiques génomiques, protéomiques et biochimiques. Les PMN-MDSC pourraient être considérés comme des neutrophiles activés de façon anormale. Il apparaît qu'à un moment donné, les patients atteints de cancer et de diverses infections chroniques ont une population de neutrophiles classiquement activés avec des fonctions protectrices et des PMN-MDSC qui favorisent la progression tumorale et la suppression immunitaire. Notamment, les N2 neutrophiles ont les mêmes fonctionnalités que les PMN-MDSCs, ce qui laisse penser que finalement il s'agit des mêmes cellules avec des noms différents<sup>110</sup>.

*A contrario*, les M-MDSCs peuvent être distingués des TAM grâce notamment au marqueur F4-80. Cependant dans le contexte du cancer, il apparaît que les M-MDSCs se différencient rapidement en TAM. Cette notion a été expérimentée à l'aide d'un test qui impliquait la différenciation des MDSC dans la tumeur *versus* la rate chez une même souris. Les auteurs ont transféré des MDSCs soit dans la tumeur par injection intraveineuse de souris porteuses de tumeur EL-4, soit dans la rate. Contrairement aux rates où les MDSC se sont différenciées lentement en macrophages et en DCs, dans les tumeurs, ces cellules se sont rapidement différenciées en TAM<sup>111</sup>.

Ces deux sous-types de MDSC, différent également par leurs propriétés immunosuppressives (Figure 12). Les facteurs les plus importants qui induisent l'activité suppressive des M-MDSC vont être le NO produit par Nos2 ou encore la sécrétion d'IL-10 tandis que pour les PMN-MDSC, l'ARG 1 ainsi que la production de prostaglandine E2 (PGE<sub>2</sub>) (en raison d'une expression accrue des gènes PGS2 et PTGES) vont induire un environnement propice au développement tumoral<sup>112</sup>.

Le ciblage thérapeutique des MDSCs est très prometteur. En effet, leurs fonctions sont essentiellement pro-tumorales contrairement aux autres sous-types immunitaires qui peuvent, en fonction du contexte, avoir un profil pro ou anti-tumoral. Cependant, ce succès dépendra du développement d'approches thérapeutiques hautement sélectives qui feraient

pencher la balance vers les monocytes/macrophages et les neutrophiles avec une fonction physiologique.



**Figure 12. Fonctions des M-MDSCs et PMN-MDSCs dans le microenvironnement tumoral** (Adapté de Yang et al, *Frontiers in Immunology*, 2020)<sup>113</sup>. Panel de gauche : les M-MDSCs produisent de l'IL-10, du TGFβ, du NO, du PGE2 et de l'adénosine qui induira un microenvironnement immunosuppresseur. Également, ils recrutent les Tregs par contact direct *via* le CD40 et de façon indirecte *via* les chimiokines (CCR5L). Panel de droite : les PMN-MDSCs produisent un niveau élevé de NO, de ROS, de peroxy-nitrite (PNT) et expriment PD-L1 à leur surface, qui inhibe la prolifération des CTLs. Ils diminuent le niveau de L-arginine et de tryptophane *via* l'arginase 1 (ARG1) et l'indoléamine 2, 3-dioxygénase (IDO), respectivement. Ils interfèrent avec le trafic des lymphocytes T vers le site tumoral.

#### f. Cellules lymphoïdes innées

Cette population principalement située dans les tissus, désignée sous le terme de « innate lymphoid cell » (ILC), découverte dans les années 2000, est très hétérogène et subdivisée en trois sous-populations (Figure 13).

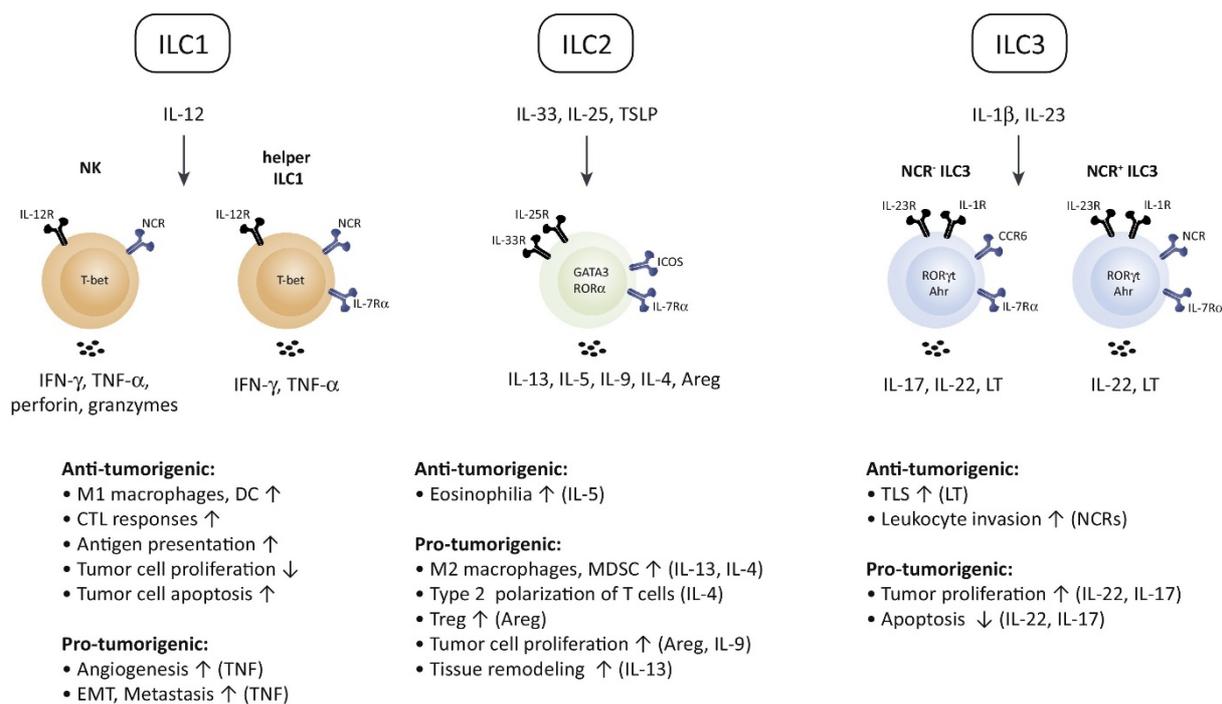
Les ILC1 comprennent les cellules NK (décrites dans la sous-partie suivante) et les variants lymphocytaires intra-épithéliaux CD103+ ILC1 et CD127+ ILC1. Elles produisent de l'IFNγ, TNFα, GM-CSF, granzyme/perforine et coopèrent avec les cellules CD4+ Th1. Les ILC2 se

comportent de manière similaire à Th2 et donc produisent de l'IL-4, IL-13. Elles sont essentielles contre les parasites et les allergènes ainsi que pour la réparation cellulaire du fait de la production de l'amphiréguline. Les ILC3 sont un parallèle avec Th17 et sécrètent donc de l'IL-17, IL-22 mais aussi du TNF $\alpha$ . Elles regroupent les LTI (cellules Inductrices de Tissu Lymphoïde), les NCR+ et NCR- (Natural Cytotoxicity Receptor). Elles sont impliquées dans la réponse microbienne<sup>114</sup>. Les ILCs représentent une version redondante des lymphocytes Th CD4+, avec une forte plasticité.

Les ILC1 sont les plus en capacité d'inhiber la progression tumorale par la production d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$ . Une étude récente a montré que les ILC1 lysaient les cellules tumorales grâce au système granzyme<sup>115</sup>. Néanmoins, l'effet direct des ILC1 sur la progression tumorale n'est en fait que très peu étudié et reste aujourd'hui spéculatif<sup>114</sup>. Le rôle des ILC1 intraépithéliales dans le cancer du côlon, par exemple, reste à déterminer. Les patients, atteints de la maladie de Crohn, qui encourent un risque accru de développer un cancer colorectal, ont un développement important d'ILC1 intraépithéliales. Dans un modèle murin, elles contribuent au développement de colite dans un modèle induit par CD40<sup>116,117</sup>.

Le nombre des ILC2 est augmenté dans le cancer du sein, de l'estomac ou de la prostate<sup>118-120</sup>. Elles sont considérées comme pro-tumorales du fait de leur sécrétion d'IL-4 et d'IL-13 qui participent à la progression tumorale et de l'amphiréguline qui participe au contrôle de l'inflammation et améliore les fonctions immunosuppressives des Tregs<sup>121,122</sup>.

Les ILC3 ont une contribution au sein du microenvironnement tumoral plus discutée. Dans le cancer du poumon, une corrélation positive a été montrée entre la présence de NCR+ILC3 et des structures lymphoïdes tertiaires (TLS)<sup>123,124</sup>. Malgré cela, le potentiel de ces cellules lié à leur pouvoir sécréteur d'IL-17 et d'IL-22 sous-tend une contribution dans la progression tumorale et ce, en particulier dans le cancer colorectal<sup>125-127</sup>.



**Figure 13. Fonctions des ILC dans le microenvironnement tumoral en fonction de sa polarisation** (Mattner et Wirtz, Trends in immunology, 2017)<sup>14</sup>. Les ILC1 sécrètent de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$  qui, en fonction du contexte, ont un rôle anti ou pro-tumoral. Les ILC2, *via* la sécrétion d'amphiréguline (Areg), d'IL-13, d'IL-4 et d'IL-9, contribueront à l'établissement d'un microenvironnement pro-tumorigène. Cependant, s'ils sécrètent l'IL-5, ils favoriseront le développement d'éosinophiles infiltrants attaquant les cellules tumorales. Les ILC3, quant à eux, favoriseraient le développement de TLS mais sécrèteraient de l'IL-17 et de l'IL-22, ce qui appuierait la croissance des tumeurs.

## g. Cellules NK

Les cellules tueuses naturelles (NK) expriment CD56 et CD16 chez l'Homme et NKp46 et CD49b ou NK1.1 (en fonction du fond génétique) chez la souris. Elles ont de nombreux récepteurs invariants, contrairement aux lymphocytes T et B, qui leur permettent de jouer un rôle dans le système immunitaire inné en reconnaissant les cellules anormales. Une récente revue a divisé ces récepteurs selon leur nature inhibitrice ou leur nature activatrice d'une part, et d'autre part, par le fait de se lier ou non aux molécules du CMH I. Pour les récepteurs inhibiteurs, on peut citer la sous-classe des récepteurs spécifiques du CMH I, à savoir les KIR (Killer cell Immunoglobulin-like Receptor) et pour la sous-classe des récepteurs non liés au

CMH I: les points de contrôle (PD-1, TIGIT (T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains)), KLRG1 (Killer Cell Lectin Like Receptor G1), 2B4 ou LAIR (Leukocyte-Associated Immunoglobulin-like Receptor-1)<sup>128</sup>. Quant aux récepteurs activateurs des fonctions NK, nous pouvons citer NKG2C/D/E (NK cell Group 2 isoform C, D or E) ou encore Ly49c/i spécifique du CMH I et les NCR (NKp30/46/44), DNAM1 (CD226) ou LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen 1) non lié au CMH I<sup>129</sup>.

Les NK sont un sous-type de lymphocytes. Cependant, ils se distinguent des lymphocytes B et T car ils ne nécessitent pas de pré-activation *via* les récepteurs BCR et TCR, en effet les cellules NK sont prêtes à « tuer »<sup>130</sup>. Leurs différents systèmes de combat comme le couple granzyme/perforine, l'induction de l'apoptose par TRAIL/FasL ou encore la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) leur permettent de lyser les cellules tumorales, comme par exemple celles qui n'expriment plus de CMH de type I.

Elles produisent également de nombreuses cytokines et chimiokines comme IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF ou encore les CCL1/3/4/5/22 (C-C motif Chemokine Ligand)<sup>131-133</sup>. Toutes ces fonctions font de ces cellules un partenaire essentiel dans la réponse anti-tumorale.

---

#### *Système perforine/granzyme*

*Lorsque les cellules immunitaires utilisant ce système reconnaissent leur cible, elles induisent une synapse immunologique qui orientera la sécrétion des granules cytotoxiques vers la cible. La première étape sera médiée par la perforine qui percera la membrane plasmique permettant ainsi l'entrée des granzymes qui induiront l'apoptose de la cellule grâce à l'activation de la cascade des caspases.*

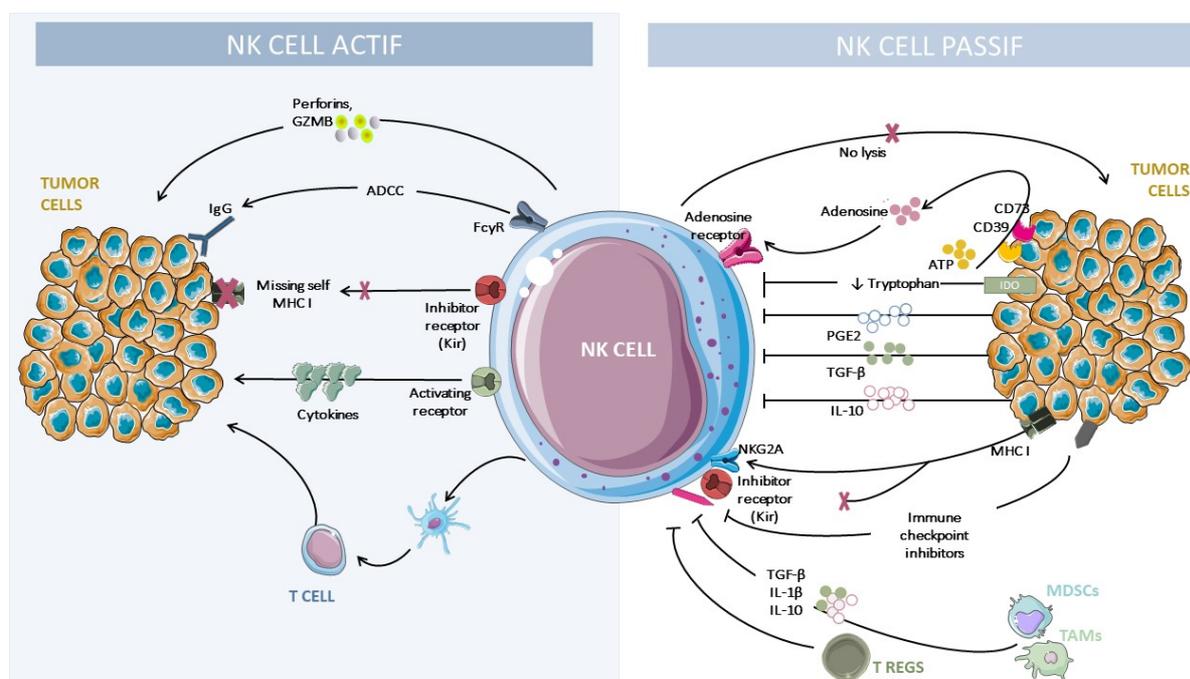
#### *Système TRAIL/FasL*

*L'interaction entre TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) ou FasL présent sur les cellules immunitaires et TNFR ou Fas présent sur les cellules cibles, active la cascade de caspases permettant l'induction de l'apoptose.*

## Système ADCC

Généralement les cellules immunitaires effectrices vont reconnaître la partie Fc des anticorps de type IgG présents sur les membranes cellulaires des cellules cibles reconnues par FcγRIII (CD16). Ceci permet alors à la cellule effectrice de lyser la cellule cible par dégranulation.

Cependant, les cellules tumorales mettent en place des stratégies pour échapper aux contrôles des cellules NK. Leur cytotoxicité est un équilibre de régulation entre les signaux d'activation et d'inhibition. Les cellules NK sont caractérisées par leur large éventail de récepteurs. De ce fait, les cellules tumorales vont tirer parti de cette diversité. Par exemple, il a été montré que l'exposition prolongée et répétée des cellules NK à des cellules tumorales exprimant le ligand du récepteur NKG2D, entraînait un phénotype dysfonctionnel empêchant, *in fine*, leur stimulation<sup>134</sup>. D'autres mécanismes d'échappement comme l'expression des ligands spécifiques des récepteurs inhibiteurs (par exemple PD-L1) ou la libération de facteurs comme le TGFβ, PGE<sub>2</sub>, IL-10 ou indoléamine-2,3-dioxygénase (IDO)<sup>135-137</sup> entraînent une diminution de l'activité anti-tumorale efficace des cellules NK (Figure 14).



**Figure 14. Fonction de la cellule NK dans le microenvironnement tumoral** (Adapté de Morvan et Lanier, Nature Review Cancer, 2016)<sup>138</sup>. Panel de gauche : la cellule NK détruit les cellules tumorales par différents mécanismes, à savoir, le couple Perforine/granzymeB, l'ADCC ou encore l'absence d'expression du CMH I par la cellule tumorale. Panel de droite : mécanismes par lesquels les cellules tumorales inactiveront les cellules NK, à savoir la production de PGE2, de TGF $\beta$ , d'IL-10 et d'adénosine, l'expression d'ICIs, l'épuisement de tryptophane dans le microenvironnement, ou l'élimination des ligands NKG2D.

#### h. Cellules NKT

Les cellules Natural killer T (NKT) co-expriment des molécules de cellules NK et de lymphocytes T. On distingue deux sous-types : invariant NKT (iNKT ou type 1) et type II (NKT II). Les cellules NKT I et II sont différenciées par leur capacité à reconnaître ou non, des glycolipides comme le glycosphingolipide  $\alpha$ -galactosylcéramide ( $\alpha$ -GalCer) ou non. De plus, ces glycolipides sont présentés par les molécules de la famille CD1 à CD1d<sup>139-141</sup>.

Après engagement du TCR (T-Cell Receptor) ils peuvent sécréter de grandes quantités d'IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF, IL-2, 4, 12 et 13. Ceci leur confère donc une double propriété: en fonction du contexte, elles stimulent ou inhibent l'immunité<sup>142</sup>. Ceci a permis d'identifier des NKTs de type I ayant cinq propriétés fonctionnelles distinctes. Les NKTs de type Th1 produisent de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$  permettant une cascade immunitaire inflammatoire efficace mais exerçant aussi une fonction cytolytique limitée. Les NKTs de type Th2 sécrètent quant à eux de l'IL-4 et de l'IL-13 et vont avoir des fonctions régulatrices. Les trois autres ensembles pour le moment peu étudiés sont : de type Th17 (production d'IL-17, IL-21 et IL-22), Treg (production d'IL-10) et Tfh (production d'IL-21)<sup>143-146</sup>.

Concernant les NKT de type II, deux sous-ensembles ont été identifiés avec les mêmes fonctions que les NKT de type I de type Th1 et Th2 (sécrétion d'IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  ou sécrétion d'IL-4/IL-13 respectivement)<sup>147</sup>. Ces sous-ensembles expriment à priori des facteurs transcriptionnels uniques comme les cellules Th ; cependant, le microenvironnement semble pouvoir moduler, à posteriori, leur orientation impliquant alors une plasticité cellulaire importante<sup>148,149</sup>.

Schématiquement, il est admis que les NKT I ont un rôle anti-tumoral et les NKT II un rôle pro-tumoral. Cependant, il existe des preuves contradictoires qui révèlent que finalement, il faut plutôt associer ces rôles aux sous-ensembles fonctionnels précédemment décrits, à savoir Th1 anti-tumoral et Th2 pro-tumoral.

L'activité anti-tumorale des NKT de type Th1 a été démontrée grâce à l'administration d'a-GalCer qui induisait une activation des NKT prévenant la formation de tumeurs primaires ou qui éradiquait les métastases hépatiques<sup>150,151</sup>. Elles sécrètent de l'IFN $\gamma$  qui active les lymphocytes T cytotoxiques (CTL)<sup>152</sup>. Toutefois, elles sont également capables de tuer directement la cellule cancéreuse comme les cellules NK, *via* l'activation de NKG2D<sup>153,154</sup>. Également, une colocalisation des NKT de type Th1 avec des TAM M2-like, va permettre au NKT de supprimer les TAM M2-like, ou d'induire leur polarisation vers un phénotype M1-like. En effet, elles auront reconnu, grâce à leur Cd1, les glycolipides dérivés des tumeurs présentées par les TAMs<sup>155,156</sup>. Cependant, il semblerait qu'une stimulation prolongée des NKTs les rend hyporéactives ou induise un changement phénotypique vers les sous-types Th2/Treg, permettant à la tumeur d'échapper une nouvelle fois au système immunitaire. Ces populations sécrètent alors des cytokines immunosuppressives (IL-13, IL-10) favorisant la différenciation des TAM M2-like, des MDSCs et des Tregs qui favorisera la progression tumorale<sup>157-160</sup>.

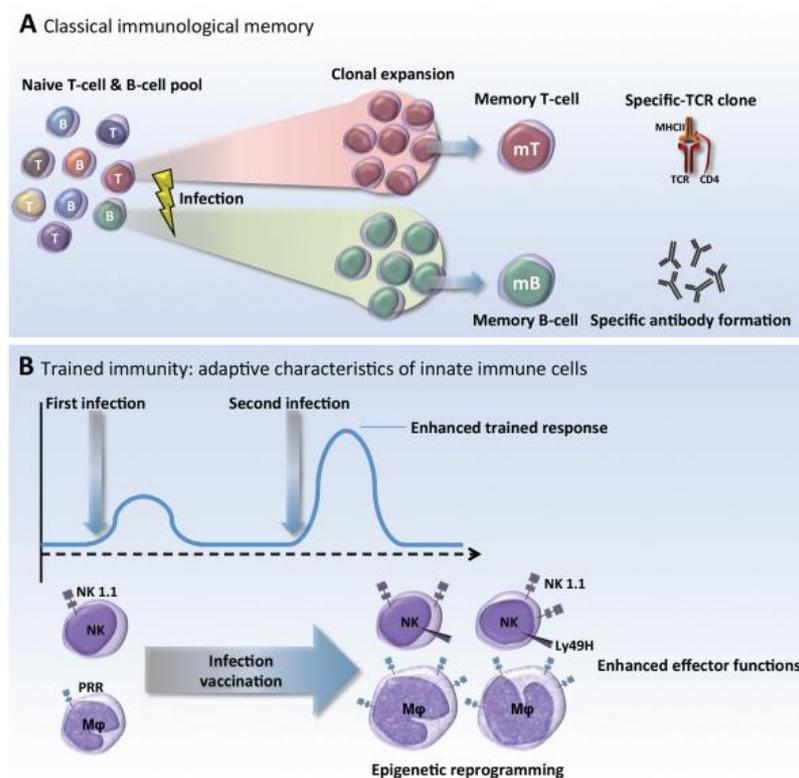
### i. Trained immunity

Ce nouveau paradigme a complètement changé le dogme originel de la séparation entre immunité innée et adaptative. En effet, l'une était incapable de générer une mémoire alors que pour l'autre la mémoire était presque sa fonction principale. Netea est l'un des premiers chercheurs à définir ce concept<sup>48,161</sup>, à savoir une mémoire immunitaire non spécifique aboutissant à une protection secondaire contre les infections. Ce constat provient de nombreuses preuves impliquant les vaccins contre le BCG, la rougeole ou encore la variole montrant qu'ils peuvent avoir des effets bénéfiques contre d'autres maladies<sup>162</sup>.

Cette mémoire « entraînée » présente plusieurs caractéristiques (Figure 15) :

- Elle implique les cellules myéloïdes et ILC (en particulier les cellules NKs) et leur capacité à produire des cytokines.
- Contrairement à la mémoire adaptative, qui dépend du réarrangement des gènes et du maintien des clones lymphocytaires spécifiques d'un antigène, cette mémoire n'est pas spécifique d'un pathogène mais est soutenue par une reprogrammation transcriptionnelle et épigénétique.
- Pour finir, elle repose sur un état fonctionnellement altéré des cellules qui ne persiste à priori que quelques mois après disparition du stimulus, contrairement à la mémoire adaptative qui reste effective des années.

Toutefois beaucoup de questions restent en suspens et de nombreuses recherches devraient s'atteler à y répondre dans les prochaines années.



**Figure 15. Différence entre la mémoire immunitaire du système adaptatif et du système inné (Netea et al, Science, 2016)<sup>48</sup>. (A) Mémoire immunitaire du système adaptatif. (B) Mémoire immunitaire du système inné.**

## B. Microenvironnement tumoral et immunité acquise

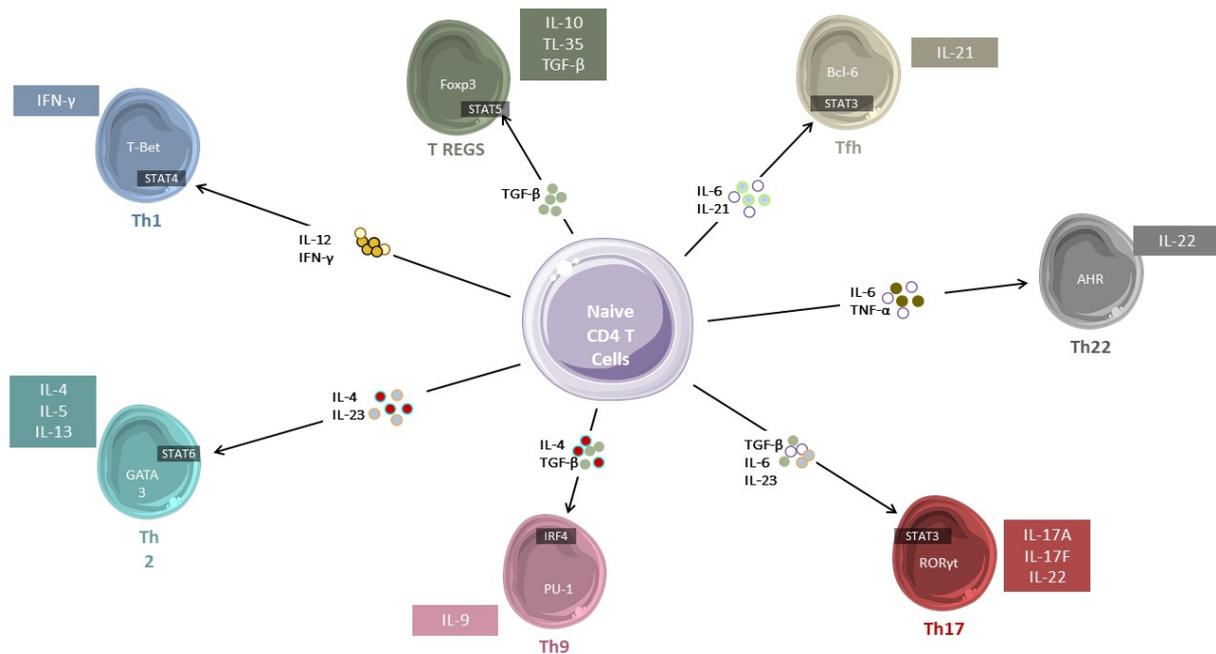
Cette deuxième catégorie d'immunité dite acquise/adaptative se caractérise, à l'inverse de l'immunité innée, par une grande spécificité, une mise en place plus lente de la réponse et une mémoire immunitaire. Elle est en lien direct avec la réponse immunitaire innée. En effet, les cellules immunitaires précédemment décrites sécréteront des chimiokines et des cytokines. Les DCs, jouant principalement le rôle de CPA, rejoindront les organes lymphoïdes secondaires pour présenter l'antigène, *via* leur CMH I et CMH II, aux cellules de cette immunité: les lymphocytes T et B se différencieront pour engager la réponse immunitaire adaptée<sup>47</sup>.

L'ajout d'IL-2 et d'IL-4 aux facteurs de croissance SCF (Stem Cell Factor) et IL-7 permet la différenciation des progéniteurs T. Leur maturation se déroulera dans le thymus contrairement aux autres cellules de l'immunité. Deux linéages de lymphocytes T existent qui se différencient par l'expression  $\gamma\delta$ CD3 et  $\alpha\beta$ CD3. Ce dernier, largement majoritaire à la suite du réarrangement du TCR, produira une population double positive CD4/CD8, puis deux populations exprimant soit le marqueur CD4, soit CD8, eux-mêmes divisés en sous-populations cellulaires. Dans la moelle osseuse, en réponse aux signaux SCF et IL-7, les cellules souches lymphoïdes vont pouvoir elles se différencier en progéniteurs B<sup>47</sup>.

Chacune de ces cellules différenciées a un rôle particulier dans la réponse immunitaire acquise<sup>163</sup>. Ce système s'enclenche à la suite du premier signal, à savoir la reconnaissance de l'antigène présenté par une CPA aux lymphocytes T grâce à l'interaction CMH/peptide/TCR. Ensuite, les récepteurs co-stimulateurs de type CD28 permettront un contrôle étroit de leur activation. Le dernier signal provenant des cytokines, produites par les CPA et les cellules du système immunitaire inné, orientera la différenciation des lymphocytes Th CD4+. Les Th se différencient, en fonction des signaux rencontrés, en sous-types spécialisés dans une réponse immunitaire spécifique, à savoir (Figure 16) :

- Th1 qui induira une réponse de type cellulaire.

- Th2 qui enclenchera une réponse de type humorale.
  - Th9 qui sera impliqué dans l'inflammation des tissus et les allergies.
  - Th17 soutenant lui une immunité dirigée contre les pathogènes extracellulaires.
  - Th22 spécialisé dans la défense des infections situées dans la peau.
  - Treg essentiel au maintien de l'auto-tolérance pour stopper une réaction immunitaire.
  - Tfh en soutien des Th2 en phase plus tardive de l'induction de la réponse humorale<sup>164</sup>.
- Une fois cette phase d'activation enclenchée, une phase d'amplification puis de différenciation suivra ayant pour objectif la destruction du pathogène ou des cellules anormales.



**Figure 16. Les fonctions des T helpers en lien avec leur différenciation** (Adapté de Lee, *Frontiers in immunology*, 2021)<sup>165</sup>. Les cellules T CD4+ naïves se différencieront en un sous-type Th en fonction des cytokines présentes dans le microenvironnement.

## a. Th1. L'immunité à médiation cellulaire

Cette immunité nécessite plusieurs types de signaux pour être effective et implique principalement 3 types cellulaires : les CPA, les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes T CD8+.

Les lymphocytes T CD4+ naïfs vont reconnaître grâce au CMH II présenté par les CPA, l'antigène et vont recevoir les signaux de type IL-12 induisant une différenciation des lymphocytes CD4+ naïfs en effecteurs Th1. Ils produiront, à leur tour, de l'IFN $\gamma$ , du TNF $\alpha$  et de l'IL-2.

Les lymphocytes CD8+ naïfs vont également avoir besoin, pour être activés, de reconnaître, par l'intermédiaire des CPA et du CMH I, l'antigène. Grace aux cytokines sécrétées par Th1, les lymphocytes T CD8+ termineront leur processus de maturation vers un phénotype dit cytotoxique – CTL. Les CTLs vont utiliser le système Granzyme/Perforine et l'induction de l'apoptose médiée par Fas-L pour détruire les cellules cibles<sup>166,167</sup>. Elles peuvent également relarguer de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$  après leur activation. Au cours de ce processus, les CTLs exprimeront, au fur et à mesure de la réponse, des points de contrôle comme PD-1 pour inhiber la réponse cytotoxique une fois l'infection contrôlée. Ceci empêche le développement de maladie auto-immune. Une partie de ces lymphocytes T CD4+ et CD8+ constituera un pool de cellules mémoires permettant, lors d'une seconde exposition, une réponse plus rapide.

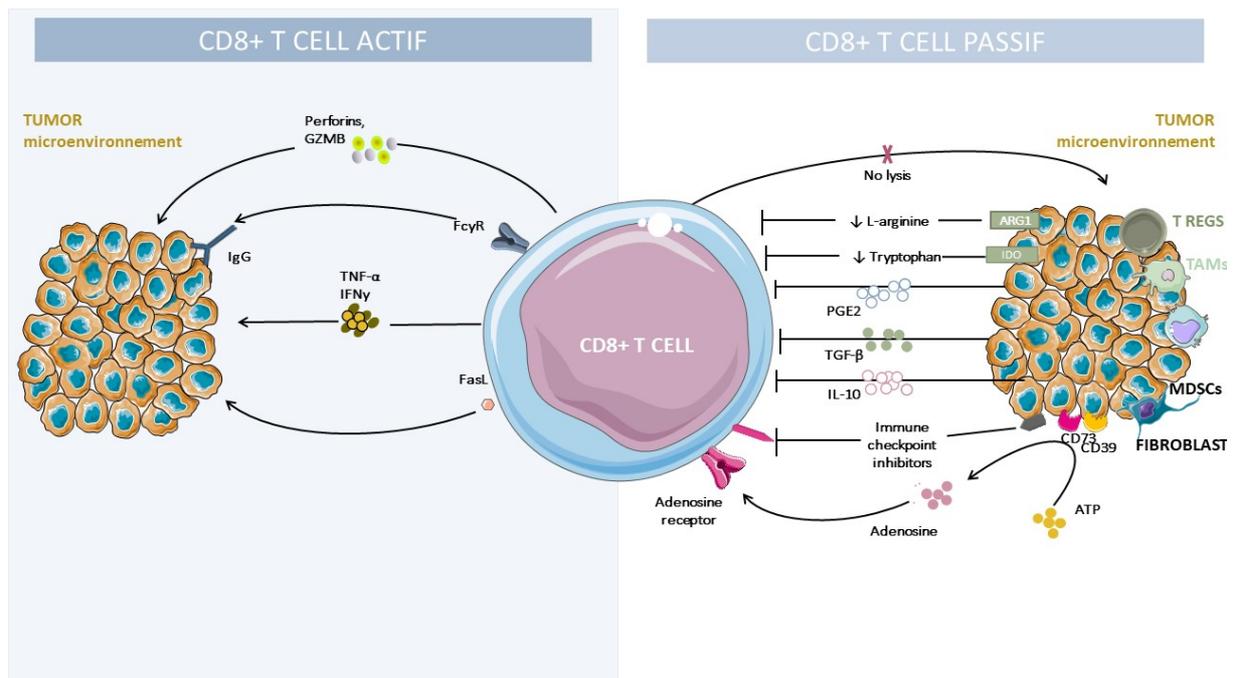
### i. Lymphocytes T cytotoxiques

Les CTLs font partie des cellules immunitaires les plus puissantes pour détruire les cellules cancéreuses. Une fois les CTLs activés dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS), ils migreront vers le site tumoral grâce aux gradients chimiotactiques CCL5, CXCL9 et CXCL10 (Chemokine CXC motif Ligand) produits par les cellules tumorales. Leur extravasation se fera préférentiellement par les veinules à endothélium épais<sup>168</sup>. Les lymphocytes, qui infiltreront alors les tumeurs, reconnaîtront les cellules à éliminer grâce au complexe CMH I/peptide. Les CTLs détruiront les cellules cancéreuses grâce aux différents systèmes précédemment décrits. Cette sous-population lymphocytaire est étudiée, dans le contexte du cancer, depuis des

décennies. Les premières études, datant des années 80, ont démontré que les TILs étaient hautement cytotoxiques. Un grand nombre de publications a ensuite montré une corrélation positive entre la fréquence des TILs CD8+ et la survie, chez les patients ayant contracté des cancers du sein, de la peau, colorectal ou encore du cerveau<sup>169-173</sup>. L'équipe de Jérôme Gallon a notamment établi un score immunitaire, ou Immunoscore, dans le cas du cancer colorectal, prenant en compte la présence ou non de marqueurs de polarisation de type Th1 et de CTL. Ce score montre une corrélation positive de la présence de ces cellules et une faible incidence de la récurrence tumorale<sup>169</sup>. Une analyse multicentrique a confirmé le potentiel prédictif de ce score et confirme, encore une fois, l'importance des CD8+ cytotoxiques dans la lutte contre la prolifération des cellules cancéreuses<sup>174</sup>.

Tout comme pour les cellules NK, les tumeurs vont mettre en place de nombreux mécanismes afin d'empêcher les TILs de les détruire. L'un des premiers mécanismes s'attèle à induire un phénotype d'épuisement. Cette sous-population lymphocytaire (*exhausted* T cells, Tex) est observée dans différents contextes pathologiques de type chronique, comme une infection virale incontrôlée ou le cancer. Elle se définit comme une population persistante avec une faible capacité de production d'IL-2 et d'IFN $\gamma$  ainsi qu'un potentiel prolifératif réduit. Notamment, les Tex expriment, à leur surface, un nombre conséquent de points de contrôle comme PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 ou encore TIGIT, directement utilisés par les cellules cancéreuses, détournant ainsi leurs fonctions primaires : éviter un emballement du système immunitaire et donc des maladies auto-immunes. Les tumeurs vont sécréter également TGF $\beta$  ou PGE<sub>2</sub> qui bloqueront les fonctions lymphocytaires et activeront les cellules immunosuppressives<sup>175,176</sup>.

Un autre défi auquel font face les lymphocytes T est une exposition chronique à l'antigène lié à l'absence de co-stimulation suffisante<sup>177</sup>. L'environnement hypotoxique, acide et appauvri en nutriments, avec la présence d'enzymes types ARG1 et IDO1 qui dégradent les acides aminés essentiels arginine et tryptophane, empêchent la prolifération des lymphocytes T et leur efficacité (Figure 17)<sup>178,179</sup>.



**Figure 17. Évasion immunitaire de la tumeur par l'altération des cellules T effectrices** (Adapté d'Aerts et al, Cancer Research, 2013)<sup>180</sup>. Panel de gauche : les lymphocytes T CD8+ détruiront les cellules tumorales à l'aide du couple Perforine/granzymeB, par les systèmes FAS-L et par la sécrétion de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$ . Panel de droite : mécanismes par lesquels les cellules tumorales inactiveront les cellules T CD8+, à savoir la production de PGE2, de TGF $\beta$ , d'IL-10 et d'adénosine, l'expression d'ICIs, l'épuisement d'arginine et de tryptophane dans le microenvironnement.

## ii. Lymphocytes mémoires – fort potentiel anti-tumoral

Les cellules mémoires sont divisées en lymphocytes T mémoires centraux (Tcm), effecteurs (Tem) et résidents (Trm), du fait de leur localisation, de leur différence phénotypique mais aussi de leur fonction. Les Tcm sont localisés préférentiellement dans les nœuds lymphatiques et les Tem dans les tissus périphériques. L'expression de CCR7 (C-C motif Chemokine Receptor) et CD62L est effective dans les Tcm, à l'inverse des Tem où l'expression de CCR7 est absente et CD62L hétérogène. Les Tcm ont une capacité proliférative importante et sécrètent de l'IL-2. Elles n'ont pas de fonctions effectrices inflammatoires et cytotoxiques, à l'inverse des Tem, qui peuvent sécréter de l'IFN $\gamma$  et qui ont un pouvoir cytotoxique important<sup>181</sup>. La différenciation des lymphocytes T suivrait un schéma linéaire où les lymphocytes Tnaifs se transformerait d'abord en Tcm puis en Tem.

De premier abord, ces cellules sont de types « mémoires » et doivent donc être réactivées pour pouvoir de nouveau exercer leurs fonctions effectrices. Ce qui implique qu'elles sont de bonnes cibles pour être réactivées par des immunothérapies et que leur présence est corrélée à un meilleur pronostic. Cependant, si aucune thérapie ne réactive ces cellules, elles n'auront pas d'effet anti-tumoral direct.

Les Trm ont été identifiés plus récemment, ils résident dans les tissus de manière persistante sans possibilité de recirculer. Ils sont hautement inflammatoires grâce à la sécrétion d'IFN $\gamma$ , d'TNF $\alpha$  et d'IL-2 et se distinguent phénotypiquement par l'expression de CD103. Spécifiquement les CD8+CD103+ Trm ont été corrélés à un pronostic favorable chez les patients atteints du cancer du poumon<sup>182</sup>. Ces cellules semblent également jouer un rôle important dans la bonne réponse aux traitements dans de nombreux cancers (seins, ovaires, vessies ou poumons)<sup>183</sup>.

## b. Th2. L'immunité à médiation humorale

Les lymphocytes Th2 vont sécréter de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-9 et de l'IL-13. Cette réponse est essentielle pour éradiquer les bactéries ou parasites extracellulaires. Ils coordonnent la réponse immunitaire de type humorale médiée par les lymphocytes B.

Les lymphocytes B expriment à leur surface, spécifiquement, CD19 et CD20. Deux types de réponse humorale se complètent, la réponse dépendante *versus* indépendante des lymphocytes T. Elles se distinguent par la nécessité ou non de l'implication du CMH II pour être activées. Une fois la reconnaissance de l'antigène réalisée par le récepteur spécifique des cellules B (BCR), celui-ci initie une cascade de signalisation. Cette cascade active :

Soit directement la cellule B, souvent classifiée comme lymphocytes B non conventionnels de type B1, fournissant alors une réponse rapide mais avec une production d'anticorps ayant tendance à avoir une plus faible affinité.

Soit l'antigène est digéré puis présenté à la surface par le CMH II des cellules B aux lymphocytes Th2, produisant alors des anticorps plus spécifiques mais nécessitant un processus plus lent à mettre en place.

Ces lymphocytes B sont classifiés comme des lymphocytes B conventionnels de type B2. Cette interaction nécessite donc au préalable que les lymphocytes CD4+ naïfs aient été eux-mêmes activés par une CPA sécrétant IL-4/IL-33, permettant une différenciation des lymphocytes CD4+ vers un profil Th2. Les cellules B activées se différencient alors en plasmocytes (cellules productrices d'Ig qui exprimeront CD138) et en cellules dites mémoire. Les différents types d'anticorps produits par les plasmocytes sont les IgM (premières à être amplifiées avec peu d'affinité mais une forte avidité lors de la réponse indépendante des lymphocytes T), IgG (principal anticorps circulant), IgA (principalement retrouvée dans les sécrétions), IgE (amplifiée dans les réactions allergiques) et IgD (surtout présente sur les membranes des lymphocytes B). Leur contribution permettra : une neutralisation en liant le pathogène empêchant son entrée dans les cellules saines, une opsonisation par leur partie FcR facilitant ainsi la reconnaissance par les phagocytes ou une activation du complément<sup>184</sup>.

Le rôle des CD4+ Th2 est plutôt controversé. Dans le cancer du pancréas et du sein, cette réponse est corrélée à un moins bon pronostic<sup>185-187</sup>. Néanmoins, l'IL-4 facilite l'infiltration des éosinophiles, des macrophages et dans certains cas des neutrophiles, en corrélation avec des effets anti-tumoraux<sup>188,189</sup>.

Cependant, l'implication *in fine* de cette réponse étant l'implication des cellules B, le rôle pro ou anti-tumoral de cette défense se complexifie davantage (Figure 18).

#### **i. Lymphocytes B effecteurs – anti-tumoraux**

Dans le domaine de la cancérologie, les cellules B ont longtemps été considérées comme non essentielles dans la défense tumorale. Toutefois, les études qui se sont intéressées aux rôles des cellules B ont montré des rôles contraires, à la fois positif et négatif, dans le microenvironnement tumoral<sup>190</sup>.

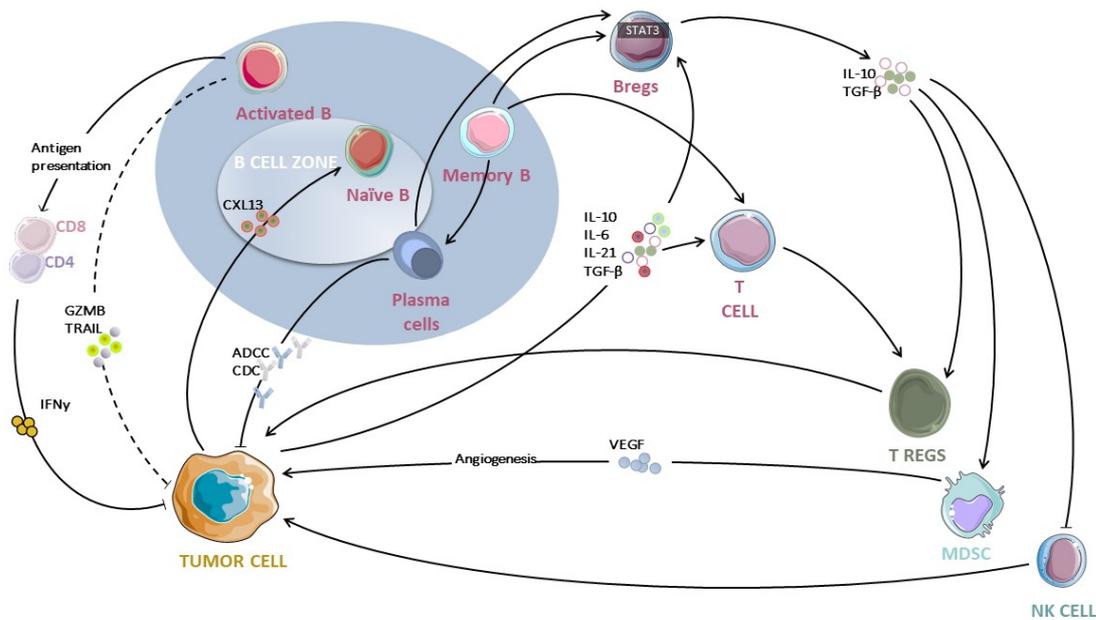
Il a été démontré que les cellules B pouvaient être des partenaires utiles notamment dans la présentation d'antigènes tumoraux aux lymphocytes T<sup>191,192</sup>. Entre autres, les lymphocytes B sont principalement localisés dans les structures TLS adjacentes aux tumeurs. Ces structures et leurs composants, sont corrélés à un meilleur pronostic dans de nombreuses tumeurs solides<sup>193-196</sup>. Les TLS sont des structures lymphoïdes ectopiques qui se constituent dans les sites inflammatoires. Elles regroupent, une fois matures, une zone T où les DC peuvent jouer leur rôle de CPA et une zone B prédominante où elles prolifèrent<sup>193</sup>.

Une autre fonction effectrice des lymphocytes B est l'activation du complément. Il a été montré que dans le contexte des tumeurs mammaires, un sous-ensemble de cellules B, caractérisé par la signalisation du complément – CR2 et exprimant ICOSL+ (Inducible T-cell Costimulator Ligand), émergeait après traitement par une chimiothérapie. L'équipe de Lu a démontré que la présence d'ICOSL renforçait l'immunité anti-tumorale en améliorant le rapport cellule T effecteur/régulateur<sup>197</sup>.

## ii. Lymphocytes B régulateurs – pro-tumoraux

Cependant, il a été décrit que certains lymphocytes B ayant une fonction régulatrice immunosuppressive, aujourd'hui communément appelés B régulateurs, peuvent jouer un rôle pro-tumoral. Les B régulateurs suppriment la réponse immunitaire par la sécrétion d'IL-10 et d'IL-35 ou par l'expression de PD-L1, tout comme son homologue lymphocytaire T régulateur<sup>198-202</sup>.

Cette sous-population détient une diversité phénotypique importante qui n'est pas encore, à ce jour, définie par un ensemble définitif de marqueurs phénotypiques ou une signature transcriptionnelle. Entre autres, les plasmocytes sécrétant des IgA sont parfois retrouvés dans des proportions plus importantes que l'IgG dans le microenvironnement tumoral. Une étude qui s'est intéressée au cancer de l'estomac induit par une infection à *Helicobacter pylori*, a montré que le risque de développer un cancer de l'estomac corrèle avec la présence d'IgA<sup>203</sup>. Leur origine, fonction, mécanisme d'action et phénotype restent à élucider.



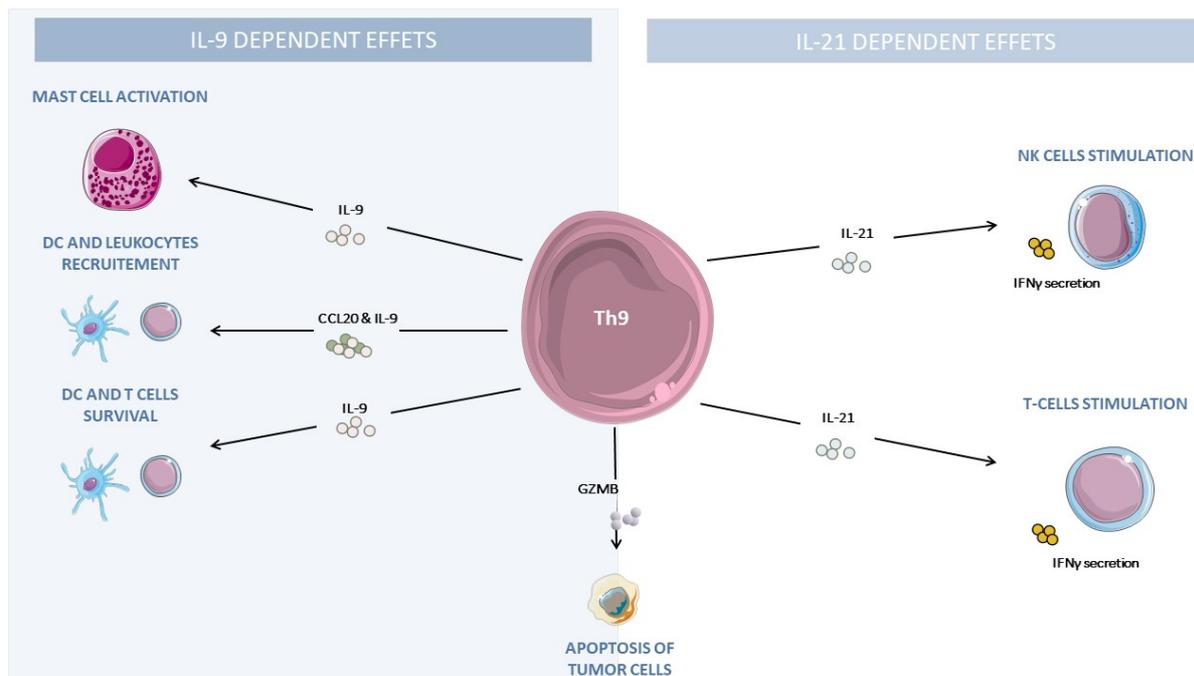
**Figure 18. Les fonctions du lymphocyte B dans le microenvironnement tumoral en fonction de sa polarisation et de sa localisation** (Adapté de Wang et al, Cellular & Molecular Immunology, 2019)<sup>204</sup>. Les lymphocytes B peuvent inhiber la croissance tumorale en sécrétant des Ig, ou en stimulant les lymphocytes T. Les Breg, quant à eux, promeuvent la croissance tumorale par la sécrétion de cytokines immunosuppressives.

### c. Th9

Cette sous-population de Th a été identifiée récemment. Elle est capable de sécréter de l'IL-9 mais aussi de l'IL-10 et l'IL-21 après s'être différenciée en présence de TGFβ et d'IL-4. Du fait des fonctions pléiotropiques de l'IL-9, les Th9 sont impliqués dans les maladies inflammatoires, l'asthme, la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde ou encore le cancer<sup>205-207</sup>. Cette cytokine est impliquée dans la survie et la prolifération des cellules T, des mastocytes et la modulation de la réponse des cellules B. Elle a également un rôle anti-apoptotique sur les neurones ou encore sur l'induction de cytokines dans les cellules épithéliales et musculaires<sup>165</sup>. Il a également été démontré que la réponse Th1 s'épuisait plus rapidement que Th9. En outre, son phénotype hyperprolifératif et son pouvoir cytolytique semblent similaire à la réponse Th17<sup>208</sup>.

Dans le contexte tumoral, Th9 semble avoir un rôle contraire selon que les tumeurs soient de types solides ou liquides. Son rôle anti-tumoral a été démontré dans plusieurs tumeurs différentes, notamment le mélanome, l'adénocarcinome pulmonaire, le cancer du côlon et le cancer du sein. Cet effet anti-tumoral semble être porté par différents mécanismes. Entre autres, l'activation des mastocytes par l'IL-9 a démontré, dans des souris Rag1-/-, une inhibition de la croissance tumorale chez des souris porteuses de B16F10 alors que le traitement par IL-9 n'avait aucun effet sur des souris déficientes en mastocytes<sup>209</sup>. Aussi, il a été montré que le transfert adoptif de cellules Th9 chez des souris porteuses de cellules B16-OVA, engendrait une forte réponse anti-tumorale<sup>210</sup>. Cet effet a, par contre, nécessité une immunité innée et adaptative. Effectivement, Lu et ses collègues ont découvert que le transfert de cellules de type Th9 permettait le recrutement des DC *via* l'axe CCL20-CCR6, entraînant leur migration vers les ganglions pour activer les lymphocytes T CD8<sup>210</sup>. D'autres études ont confirmé le rôle de Th9 dans le recrutement des DC et l'activation secondaire des CTLs<sup>211,212</sup>. Ce rôle pourrait être médié notamment par l'IL-21, du fait qu'il s'agisse d'un puissant activateur de la production d'IFN $\gamma$ , d'IL-2 et d'IL-15<sup>213</sup>. De plus, un rôle cytolytique intrinsèque de ces cellules a été observé grâce à une analyse transcriptomique qui a révélé une expression génique accrue d'un panel de granzymes<sup>214</sup>. Cette activité a été démontrée en réponse à des lignées cellulaires de cancer épidermoïde et de mélanome<sup>215,216</sup>. Toutes ces publications plaident en faveur d'un rôle anti-tumoral des Th9 (Figure 19).

Cependant et essentiellement dans les cancers de types liquides, Th9 semble avoir un impact délétère. Le taux d'IL-9 est augmenté dans les leucémies lymphoïdes chroniques, la leucémie à cellules T de l'adulte, le lymphome de Hodgkin, le lymphome anaplasique à grandes cellules et le lymphome à cellules NKT<sup>217-221</sup>. Dans les lymphomes non-Hodgkiniens à cellule B, le taux d'IL-9 est corrélée à l'immunosuppression médiée par les mastocytes et les Treg<sup>222</sup>. Sa neutralisation permettrait une diminution des Tregs et des mastocytes ainsi qu'une inhibition de la croissance tumorale. Malgré cela, aucune preuve directe ne semble relier l'IL-9 et les cellules Th9 dans les hémopathies<sup>223</sup>.



**Figure 19. Les fonctions du lymphocyte Th9 dans le microenvironnement tumoral** (Adapté de Végran et al, Cancer Research, 2015)<sup>208</sup>. Panel de gauche : les cellules Th9 peuvent sécréter de l'IL-9 qui augmentera la capacité cytotoxique des mastocytes et la survie des DCs. A l'interface entre les deux IL, les cellules Th9 sont aussi capables de libérer du granzyme B. Panel de droite : La sécrétion d'IL-21 par les cellules Th9 induit la prolifération des lymphocytes T CD8+ et l'augmentation des fonctions cytolytiques des cellules NK.

#### d. Th17

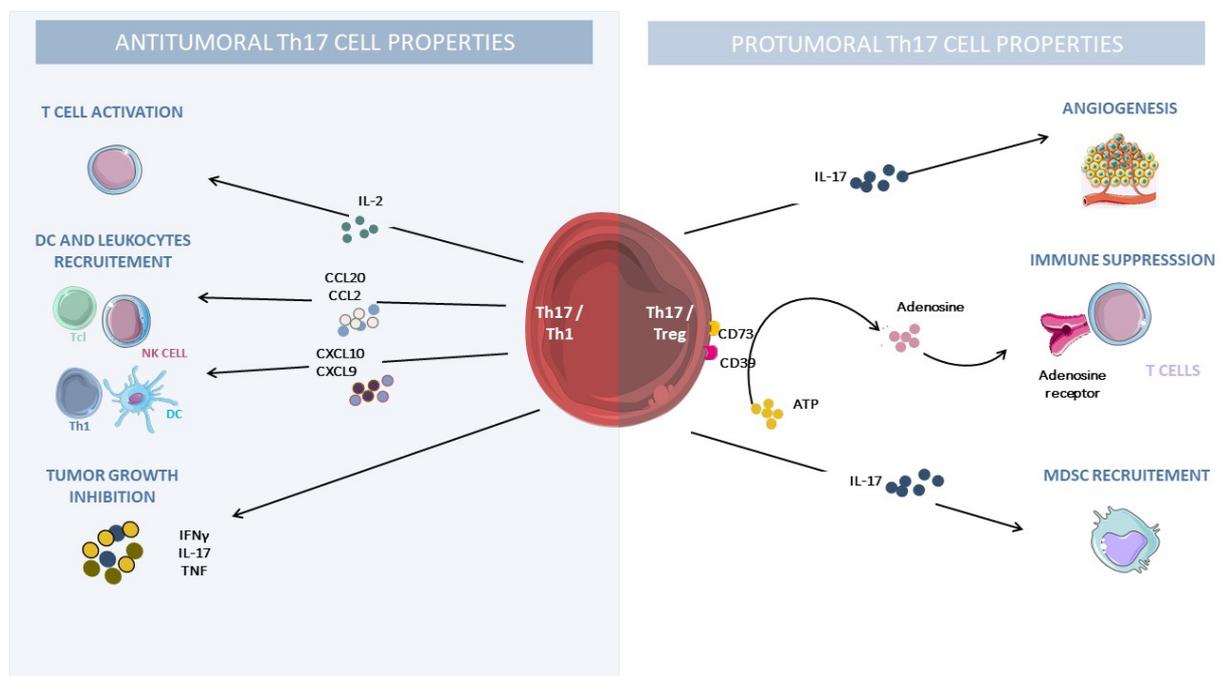
L'identification de nouvelles sous-populations Th17 capables de produire de l'IL-17 (A et F) a permis de mieux comprendre la complexité de la réponse immunitaire adaptative autrefois binarisée en Th1/Th2<sup>224</sup>. Les cellules Th17 peuvent être une source d'IL-21, d'IL-22, d'IL-26, de TNF $\alpha$  et d'IL-10<sup>225</sup>.

La réponse Th17 est, quant à elle, induite par TGF $\beta$  et l'IL-23 avec une contribution d'IL-6, d'IL-1 $\beta$ , d'IL-21 et pour cette dernière, de manière autocrine<sup>226,227</sup>. De nombreuses fonctions sont associées à ces cellules tout comme Th9. Tout d'abord, elle est un modulateur clé de l'auto-immunité et un mécanisme de protection contre les agents pathogènes bactériens et fongiques. Elle permet aussi l'induction de la granulopoïèse ainsi que le recrutement des

neutrophiles<sup>225</sup>. Du fait de ces fonctions physiologiques, cette cellule est aussi impliquée dans d'autres pathologies comme la sclérose en plaques, la maladie de Crohn ou le psoriasis<sup>228</sup>.

Dans un microenvironnement tumoral, la cellule Th17 peut avoir une activité à priori régulatrice et effectrice induisant une activité pro-tumorale ou anti-tumorale. De nombreuses publications ont plutôt montré un rôle pro-tumoral de l'IL-17 dans le cancer du poumon, prostate, pancréas, colon, sein et foie<sup>229-235</sup>. Une étude a corrélé le niveau d'IL-17 dans les cancers de l'ovaire à une angiogenèse plus importante; le même constat a été fait dans des échantillons de cancer du poumon<sup>236,237</sup>. En plus de cette fonction pro-angiogénique, le recrutement des neutrophiles par l'IL-17 dans les tumeurs pourrait avoir un effet pro-tumoral en fonction du stade de développement (Figure 20)<sup>85,93,238</sup>.

A l'inverse, les cellules Th17 provoqueraient aussi une inflammation protectrice activant les lymphocytes T CD8+<sup>239</sup>. De plus, le transfert adoptif des Th17 montre des effets anti-tumoraux importants mais le mécanisme sous-jacent reste à élucider<sup>239,240</sup>. Une hypothèse voudrait que ces cellules, puisqu'elles n'expriment que très peu de marqueurs d'épuisement et davantage de marqueurs de cellules souches (à l'inverse des lymphocytes T CD8+), ne deviennent pas dysfonctionnelles comme décrit pour les lymphocytes T CD8+<sup>241-243</sup>.



**Figure 20. Les fonctions du lymphocyte Th17 dans le microenvironnement tumoral** (Adapté de Guery et Hugues, BioMed Research International, 2015)<sup>244</sup>. Panel de gauche : les cellules Th17 inhibent la croissance tumorale en induisant le recrutement de cellules effectrices immunitaires dans les tumeurs. Panel de droite : la production d'IL-17 par les cellules Th17 contribue à l'angiogenèse et au recrutement intra-tumoral des MDSCs. Également, les cellules Th17 induisent l'expression des ectonucléotidases, permettant la conversion de l'ATP en adénosine, favorisant une immunosuppression.

#### e. Th22

Cette sous-catégorie a été définie comme une population à part entière il y a peu car longtemps considérée comme des cellules Th17. Les cellules Th0 se différencient en cellules Th22 en présence d'IL-6 et de TNF $\alpha$  et produisent donc de l'IL-22<sup>245</sup>. Les pDC sont l'une des sources principales d'IL-6 et de TNF $\alpha$  dans le microenvironnement inflammatoire<sup>246</sup>. Classiquement, les Th22 vont médier une réponse inflammatoire indépendamment de l'IFN $\gamma$  et l'IL-17. Elles expriment, à leur surface, les récepteurs de chimiokines CCR4, CCR6 et CCR10. L'IL-22 a pour fonctions principales la régulation de l'immunité innée, l'inhibition de la différenciation des kératinocytes ou encore la stimulation du remodelage tissulaire<sup>247</sup>. L'IL-22, du fait de ces fonctions, a des effets protecteurs dans des modèles de pancréatite inflammatoire de l'intestin ou d'infection bactérienne<sup>248</sup>. Cependant, dans une situation tumorale, les publications démontrent un rôle pro-tumoral, en particulier *via* l'activation de l'oncogène STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3)<sup>249</sup>.

Les fonctions des cellules Th22, dans un contexte tumoral, sont peu connues. Il a été observé que leur présence est corrélée à un mauvais pronostic dans le cancer du pancréas, colorectal, gastrique ou encore le myélome multiple<sup>249-252</sup>. Ce manque d'informations s'explique aussi par la complexité à différencier la réponse Th22 de la réponse Th17. Beaucoup d'études ont, de ce fait, examiné les deux réponses conjointement, rendant difficile de dissocier l'effet de Th22 uniquement.

## f. Treg

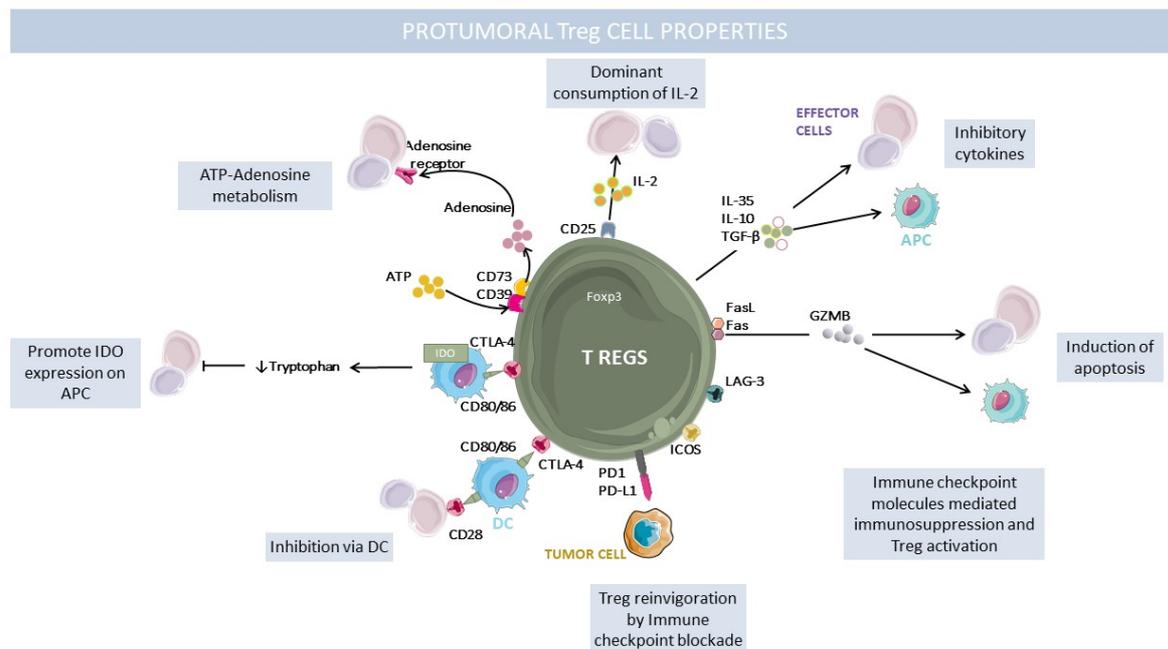
Cette sous-population est très complexe. Comme leur nom l'indique elle régule, contrôle le système immunitaire et aide à prévenir les maladies auto-immunes. Il faut distinguer deux sous-populations en fonction de leur ontogénie. Les Tregs provenant du thymus dit « naturels » : tTreg ou nTreg et les Tregs formés en périphérie suite à la différenciation des Th0 après stimulation par le TGF $\beta$ , dit « induits » : pTreg ou iTreg<sup>253</sup>. Ils exprimeront FoxP3 (Forkhead box P3) et CD25 et sécréteront du TGF $\beta$ , de l'IL-10, de l'IL-35 et de l'adénosine<sup>254</sup>. En matière de différenciation, on peut distinguer les cellules naïves, effectrices, à mémoire centrale et à mémoire effectrices comme pour les autres catégories de lymphocytes T.

Les Tregs sont, sans équivoque, l'une des populations immunitaires pro-tumorales des plus puissantes, faisant d'elles un partenaire privilégié des cellules tumorales. Elles représentent entre 10 et 50% des CD4+ infiltrant les tumeurs par rapport aux 2 à 5% des cellules CD4+ présentes dans le sang d'individus sains<sup>255</sup>. Un taux élevé de Tregs indique un mauvais pronostic dans les cancers du poumon, mélanome, sein, rein ou encore colorectal<sup>256-258</sup>. Elles ont différents mécanismes immunosuppresseurs.

On peut distinguer deux grandes catégories : dépendant ou indépendant d'un contact<sup>259</sup>. L'interaction DC-Treg par l'interaction CMH II-TcR respectivement, induit une suppression spécifique liée à l'antigène. La DC devient tolérogène et incapable de présenter l'antigène. Ceci est notamment dû à l'interaction entre CD80/86 et CTLA-4 (homologue de CD28) qui bloque un éventuel message de co-stimulation médié par CD28<sup>260</sup>. Ces mécanismes vont également rendre les DC capables de sécréterIDO ce qui aura une conséquence directe sur la diminution de la concentration de tryptophane nécessaire à la prolifération des CTL<sup>261</sup>. Notamment les cellules Tregs intra-tumorales expriment davantage de CTLA-4 en comparaison aux Tregs périphériques<sup>262</sup>. Un autre exemple est l'expression de LAG-3 par les Tregs qui se lie au CMH II des DC qui résultera en une altération de la maturation des DC et donc une anergie des CTLs<sup>263</sup>. D'autres points de contrôle comme PD-L1, vont avoir un effet direct d'inhibition en interagissant avec PD-1 exprimé par les cellules effectrices activées<sup>264</sup>. Les Tregs utilisent aussi le système Granzyme/Perforine et TRAIL comme moyens

immunosuppresseurs qui ciblent directement les cellules NK et lymphocytes T CD8+ permettant une expansion tumorale<sup>265</sup>.

Les mécanismes immunosuppresseurs indépendants des contacts cellulaires vont être médiés par la sécrétion de cytokines comme l'IL-10, IL-35 et le TGFβ. Ces cytokines vont avoir un large spectre d'action. Elles vont induire une suppression de l'immunité en empêchant l'activation optimale des cellules T et en maintenant l'expression de FoxP3 par les Treg pour stabiliser leur phénotype<sup>266,267</sup>. La dégradation de l'ATP (Adénosine Triphosphate) en adénosine par les Tregs par l'ectonucléotidase CD39 et CD73 exprimées à la membrane est un mécanisme hautement immunosuppresseur. L'adénosine va se lier au récepteur A2a, présent sur les lymphocytes T CD4+ et CD8+ effecteurs. Ceci va inhiber la voie NFκB (Nuclear Factor-kappa B) et augmenter l'AMPC intracellulaire, supprimant leur prolifération<sup>268</sup>. Un autre processus, directement lié à l'expression de CD25, va induire une concurrence locale pour l'IL-2, limitant les réponses des lymphocytes T effecteurs<sup>269,270</sup>. Une fonction récemment découverte, également attribuée au Treg, concerne la perturbation de l'apport des ions calcium (Ca<sup>2+</sup>) aux lymphocytes T effecteurs. Ceci inhibe l'expression de facteurs de transcription comme NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) et NFκB, qui sont en outre essentiels pour l'activation du TCR (Figure 21)<sup>271,272</sup>.



**Figure 21. Les diverses fonctions immunosuppressives de Treg dans le microenvironnement tumoral** (Adapté de Togashi et al, Nature Reviews Clinical Oncology, 2019)<sup>273</sup>. Les cellules Tregs épuisent l'IL-2 de leur environnement. De plus, elles produisent des cytokines immunosuppressives, telles que l'IL-10, l'IL-35 et TGF $\beta$ , qui régulent à la baisse l'activité des cellules CPA et CTLs. Elles sont aussi capables de sécréter de la perforine et des granzymes qui peuvent directement tuer ces cellules. Elles expriment CTLA-4 et d'autres ICIs permettant de transmettre des signaux suppresseurs aux cellules anti-tumorales comme les CTLs. Également, elles épuisent le milieu en tryptophane et sont capable de convertir, *via* CD39 et CD73, l'ATP en adénosine qui fournit des signaux immunosuppresseurs aux cellules anti-tumorales.

## 4. Mécanismes de maintien d'un environnement propice à la prolifération du cancer

Nous venons de voir dans la partie précédente comment les cellules immunitaires peuvent apporter leur contribution de manière à soutenir ou détruire le microenvironnement tumoral. Les tumeurs développent différents profils phénotypiques en fonction de la charge mutationnelle, de l'épigénétique, du métabolisme et de leur capacité à mimer les mécanismes immunosuppresseurs des cellules immunitaires. Dans cette partie, nous détaillerons comment les cellules tumorales engendrent un environnement propice à leur développement.

### A. Charge mutationnelle

Les cellules cancéreuses tirent avantage de leur instabilité génétique, certains oncogènes sont mutés et vont alors être surexprimés. Par exemple, RAS joue un rôle dans la croissance, P53 évite à la cellule cancéreuse d'entrer en apoptose et E-Cadhérine permet une invasion métastatique. Toutes ces dérégulations génétiques permettent à la tumeur de se développer et favorise un microenvironnement propice à sa croissance.

Avec l'apparition de nouvelles thérapies, comme l'immunothérapie qui s'attèle à réactiver le système immunitaire, la vision de ces mutations a changé. Le système immunitaire peut tirer avantage de cette instabilité génétique une fois réactivé.

La charge mutationnelle est un rapport entre le nombre de gènes altérés et le nombre total de gènes. On distingue ainsi deux types de tumeurs : celles à forte charge et celles à faible charge mutationnelle. Le seuil pour définir ces catégories est encore en débat. Il diverge en fonction des auteurs, des panels de gènes étudiés et des mutations. Certains types tumoraux, comme les carcinomes pulmonaires ou les mélanomes, ont une charge mutationnelle élevée du fait qu'ils ont beaucoup de mutations somatiques<sup>274</sup>. Ces mutations vont créer des néo-antigènes.

---

### Néo-antigènes

*Suite aux mutations, les cellules tumorales vont générer de nouveaux antigènes qui ne sont normalement pas exprimés dans l'organisme. Ces néo-antigènes sont circulants ou peuvent être présentés à la surface des cellules tumorales. Une fois reconnus comme anormaux par les cellules du système immunitaire, celles-ci sont activées et peuvent détruire la cellule cible.*

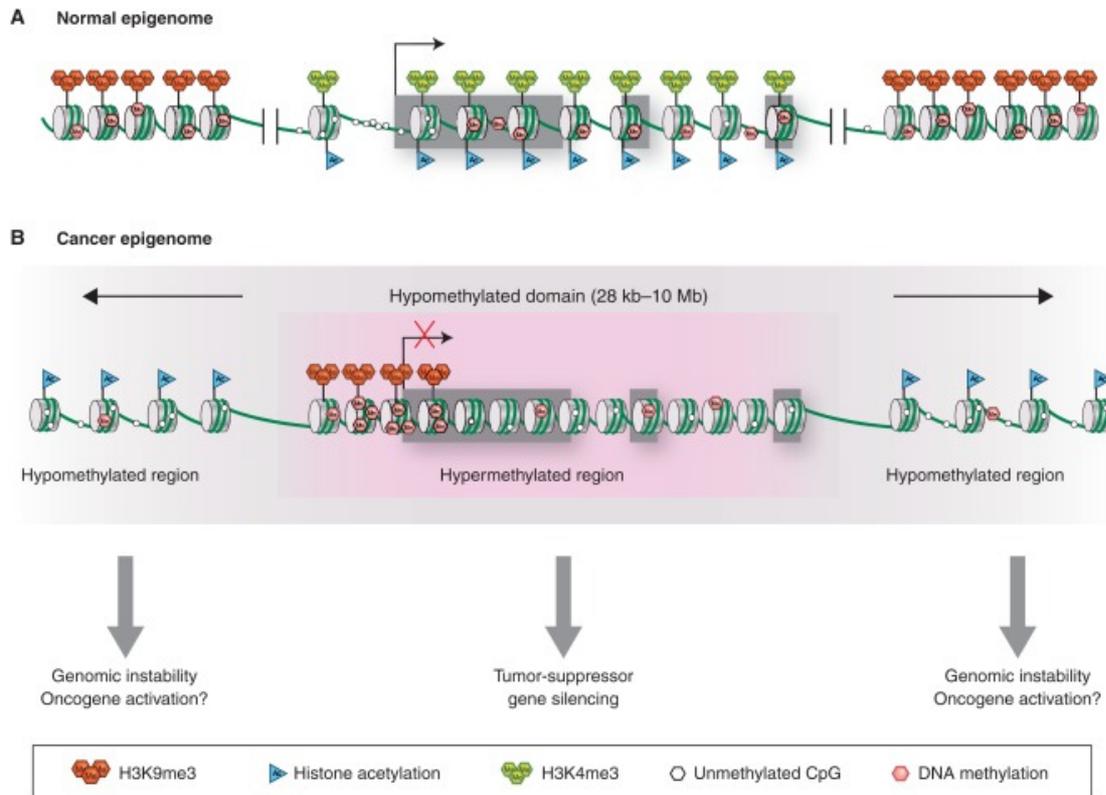
---

Au-delà du nombre de néo-antigènes nouvellement créés, l'important est leur immunogénicité. Un taux élevé de mutation rend le néo-antigène plus immunogène et donc plus efficacement reconnu par le système immunitaire. Ce ratio de charge mutationnelle peut servir de biomarqueur pour l'efficacité des immunothérapies. Il a été montré qu'une charge élevée permet une meilleure réponse aux traitements de type immunothérapie des patients atteints de mélanome ou de cancer pulmonaire<sup>275,276</sup>. Toutefois, une récente étude a démontré sur une cohorte de 10 000 patients, que ce biomarqueur ne pouvait pas être appliqué à tous les types de cancers comme valeur prédictive d'une réponse efficace suite aux traitements par les ICIs<sup>277</sup>. Cette charge mutationnelle permettrait, du fait de la présence de néo-antigènes immunogènes, une infiltration plus importante des lymphocytes T mais pas nécessairement une meilleure réponse aux thérapies.

### B. Dérégulation épigénétique

Bien que récente, l'épigénétique est une discipline aujourd'hui largement étudiée. Il s'agit d'un processus dynamique et réversible qui permet de moduler l'expression des gènes, sans modification dans la séquence de l'ADN. Les cellules tumorales vont mettre ce processus à profit en dérégulant l'épigénome. Elles induisent une méthylation de l'ADN (sur les cytosines) ou une désacétylation des histones ; ceci empêche la transcription du gène associé. Les cellules tumorales inactiveront, par ce processus, les gènes suppresseurs de tumeur (Figure

22)<sup>278,279</sup>. Ce processus confère encore une fois un avantage prolifératif à la cellule tumorale. De nouvelles thérapies s'attèlent à inverser ces changements, comme les inhibiteurs de l'ADN méthyltransférase (DNMT) ou de l'histone désacétylase (HDAC)<sup>280,281</sup>.



**Figure 22. Représentation schématique de la dérégulation épigénétique au sein des cellules cancéreuses** (Baylin, S. B. & Jones, P. A., Cold Spring Harb. Perspect. Biol, 2016)<sup>279</sup>. (A) Dans une cellule normale, un gène actif avec l'îlot CpG est reconnu grâce au promoteur appauvri en nucléosomes et non méthylé, mais également car il est entouré par H3K4me3. (B) L'épigénome du cancer est caractérisé par des pertes ou des gains de méthylation de l'ADN. Cela permet à la cellule tumorale de transcrire ou non le gène associé.

### C. Dérégulation du métabolisme

La transformation oncogénique amène les cellules cancéreuses à détenir un métabolisme particulier qui influence profondément le microenvironnement tumoral. Malgré la formation de vaisseaux sanguins dans le microenvironnement, l'efficacité des échanges de nutriments ou d'oxygène qui en émane est faible. Les cellules cancéreuses ont une demande forte en énergie. Elles appauvrissent le microenvironnement laissant peu de nutriments disponibles

aux cellules immunitaires qui deviennent moins efficaces. Ce microenvironnement est propice au développement des cellules immunitaires de types immunosuppressives qui préfèrent utiliser des lipides plutôt que du glucose à l'inverse des cellules anti-tumorales (Figure 23)<sup>282</sup>.

**Premièrement**, les cellules cancéreuses appauvrissent le milieu en glucose. Ceci a une conséquence directe sur l'expansion des lymphocytes T et leur fonction effectrice qui peut conduire à un phénotype d'épuisement. Cet environnement va également induire l'expression de FoxP3, augmentant ainsi le *pool* de Treg<sup>283,284</sup>. Ce métabolisme glycolytique tumoral favorise une augmentation de la production du facteur CSF par les cellules tumorales et par conséquent une infiltration des MDSCs.

**Deuxièmement**, les cellules cancéreuses modifient le fonctionnement de leur métabolisme, ceci a été décrit par Otto H. Warburg dans les années 30.

---

#### *Effet Warburg*

*Glycolyse Aérobie : Au sein de la mitochondrie, en présence d'O<sub>2</sub> les cellules métabolisent le glucose en pyruvate puis en CO<sub>2</sub> au cours du cycle de Krebs. Cette réaction permet la production d'ATP associée à une faible production de lactate.*

*Glycolyse Anaérobie : En absence d'O<sub>2</sub>, les cellules convertissent le glucose en acide lactique permettant la production de beaucoup de lactates mais peu d'ATPs.*

*Effet Warburg : Les cellules cancéreuses convertissent en majorité le glucose en lactate en présence d'O<sub>2</sub>.*

---

Une accumulation de lactate dans le milieu engendre une acidification du milieu (augmentation jusqu'à 40 fois dans certaines cellules tumorales)<sup>285,286</sup>. Ceci est corrélé positivement à la taille de la tumeur<sup>287,288</sup>. De la même manière, cela a un impact sur la prolifération des cellules T effectrices et la production d'IFN $\gamma$ . Cela inhibe l'activation des monocytes ainsi que la différenciation des DCs tout en favorisant la polarisation des TAM vers

un profil M2<sup>286,289-291</sup>. Le lactate a également un effet sur les cellules NKs en inhibant leur fonction et à l'inverse en augmentant celle des MDSCs<sup>292</sup>. Les Tregs tirent aussi avantage de ce milieu étant donné qu'ils ont la capacité d'oxyder le lactate exogène<sup>293</sup>.

**Troisièmement**, la glutamine, l'arginine et le tryptophane jouent des rôles essentiels pour soutenir les processus physiologiques.

**La glutamine** est la plus rapidement consommée en culture *in vitro* par les cellules tumorales<sup>294</sup>. Lors de la glycolyse aérobie, la glutamine est utilisée comme source de carburant pour maintenir le flux du cycle de Krebs. Elle est également utilisée comme source de citrate pour la synthèse de lipides.

La glutamine semble ne pas être utilisée de la même manière par les cellules immunitaires<sup>294</sup>. La privation de glutamine dans le microenvironnement altère la différenciation des cellules CD4+ naïfs en cellules Th1 et favorise un profil de différenciation en cellules Treg<sup>295</sup>.

Lors de l'inhibition du métabolisme de la glutamine, une décroissance tumorale a été observée dans un modèle de cancer du sein, accompagnée par la diminution du nombre de MDSCs et la conversion des TAMs en type M1-like<sup>296</sup>.

**L'arginine** joue un rôle important dans la prolifération, la survie et la synthèse de protéines que ce soit dans les cellules cancéreuses ou dans les cellules immunitaires. L'arginine est essentiellement métabolisée grâce aux enzymes NOS (oxyde nitrique synthétase) et ARG. Son effet dans le microenvironnement est complexe. Il a été montré qu'un épuisement de la quantité d'arginine dans le microenvironnement tumoral avait des effets anti-tumoraux<sup>297,298</sup>. Cependant, cet effet est largement en lien avec l'enzyme (NOS ou ARG) qui métabolisera l'arginine. Les MDSCs expriment l'ARG et contribuent à l'épuisement de l'arginine dans le microenvironnement tumoral afin de supprimer les réponses effectrices des lymphocytes T<sup>299</sup>. Le lactate joue également un rôle en favorisant le catabolisme de l'arginine par l'ARG au détriment du NOS<sup>300</sup>. A l'inverse, si l'arginine est métabolisée par NOS, une libération de NO est associée. Ceci a montré une augmentation de l'expression de la molécule

d'adhésion VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) dans des xénogreffes de mélanome qui conduisait à une meilleure extravasation des lymphocytes T. De plus, le NO est important pour l'activation des CTLs. Ceci a été démontré grâce à un co-transfert de lymphocytes T CD8+ avec des macrophages normaux ou déplétés de NO, montrant une meilleure activation et extravasation de la part de cellules T vers la tumeur<sup>301,302</sup>. Ce rôle dual, médié par ces deux enzymes, peut offrir un potentiel thérapeutique bien qu'il reste beaucoup à comprendre sur les mécanismes de régulation.

**Le tryptophane** est un acide aminé essentiel extrait de l'alimentation. Entre autres, il joue un rôle de substrat dans la voie de la kynurénine. IDO1, IDO2 et tryptophane-2,3-dioxygénase (TDO) catabolisent le tryptophane. Dans un contexte tumoral, l'activité dérégulée d'IDO et de TDO supprime l'immunité anti-tumorale. La présence d'IDO, de TDO et de kynurénine est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer du sein ou encore endométrial<sup>303-305</sup>. Mécanistiquement, la kynurénine ou l'IDO1 engendrerait une signalisation défectueuse de l'IL-2 dans les lymphocytes T CD4+ mémoire. Elles inhiberaient l'activation des CTLs, des cellules NK et à l'inverse favoriseraient l'activation des cellules Treg et des MDSCs<sup>303,306-308</sup>.

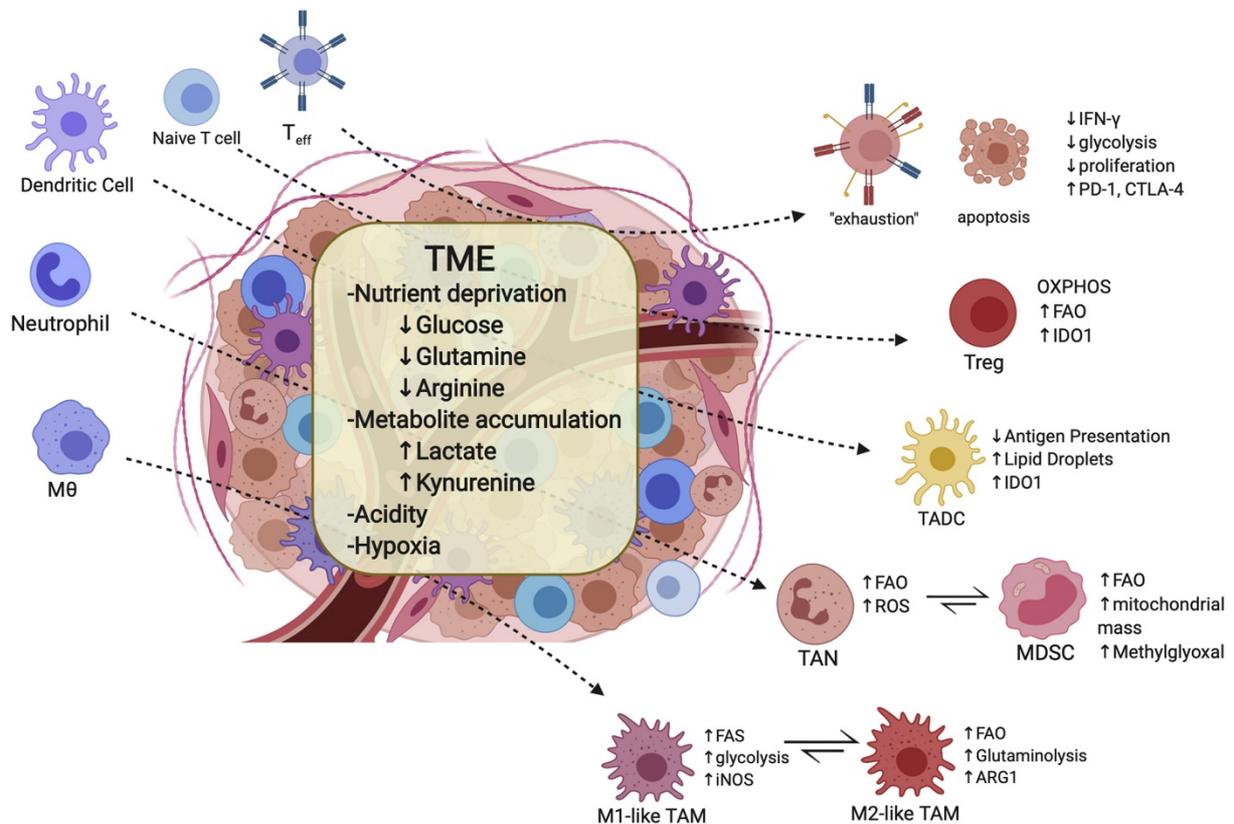
Ici encore, les cellules tumorales mettent à profit cette voie métabolique pour pousser le microenvironnement vers un état totalement permissif à son développement. Les thérapies qui ciblent cette voie sont encore controversées. Elles n'ont pas montré d'effets probants en monothérapie mais semblent par contre être efficaces en combinaison avec des anti-PD-1/L1<sup>309</sup>.

**Quatrièmement**, les cellules cancéreuses sont également avides des lipides et du cholestérol. Elles augmentent l'absorption de lipides exogènes ou en produisent en activant les voies de synthèse<sup>310,311</sup>. La présence de gouttelettes lipidiques, dans lesquelles sont stockés les lipides, est d'ailleurs corrélée à l'agressivité du cancer<sup>311</sup>. L'accumulation de lipides dans les cellules myéloïdes engendre en général des effets immunosuppresseurs<sup>312</sup>. Ceci améliore le métabolisme oxydatif - l'oléate par exemple - et favorise la polarisation des TAM vers le type M2-like<sup>313</sup>. Il a été également montré que l'abondance de lipides dans le microenvironnement,

altérerait la présentation antigénique par les DCs infiltrant les tumeurs engendrant une mauvaise activation des lymphocytes T<sup>314,315</sup>. En particulier, les sous-ensembles T ont un programme métabolique distinct. Les T effecteurs, comme vu précédemment, vont préférer un métabolisme glycolytique glutaminolytique tandis que les T mémoires et les Tregs vont s'appuyer sur l'oxydation des acides gras (FAO)<sup>316-318</sup>. Récemment, il a été montré que CD36 (transporteur de lipides) supportait la survie des cellules Tregs permettant un bon acheminement des lipides<sup>319</sup>. Ceci implique qu'un milieu enrichi en lipides favorisera un microenvironnement immunosuppresseur. Des thérapies émergentes, ayant pour ambition de bloquer par exemple l'enzyme qui permet la synthèse des acides gras (Fatty Acid Synthase : FASN), pourraient montrer une efficacité certaine<sup>320</sup>. Cependant, au regard de la complexité du métabolisme des lipides et du cholestérol, beaucoup de questions restent en suspens pour la mise en œuvre de telles stratégies.

**Cinquièmement**, les voies permettant la détection d'O<sub>2</sub> et de nutriments jouent un rôle essentiel dans la modulation du microenvironnement. Principalement, nous pouvons citer l'AMPK (5' AMP-activated protein Kinase), mTOR et HIF $\alpha$  (Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha). Dans un environnement appauvri en glucose, l'AMPK est activé. Ceci induit un *switch* métabolique vers OXPHOS (mitochondrial Oxidative Phosphorylation System)<sup>321</sup>, favorisant la présence des cellules immunosuppressives comme les lymphocytes Tregs qui dépendent d'OXPHOS pour fonctionner dans le microenvironnement tumoral riche en lactate<sup>293</sup>. AMPK peut également inhiber mTORC1 qui, à l'inverse de l'AMPK, soutient la glycolyse. Ceci entrave l'activation des lymphocytes T effecteurs<sup>322</sup>. Cependant, le rôle de l'AMPK est nécessairement plus complexe : il semble dépendre d'un équilibre entre le temps, le stress cellulaire et les cellules immunitaires. Une étude a montré un effet pro-tumoral du fait de l'absence de l'AMPK dans les cellules T. De plus, un traitement -la metformine- stimulant l'AMPK, améliore le recrutement des lymphocytes CD8<sup>+</sup> dans les tumeurs. Ces données peuvent être en cohérence avec le fait que les lymphocytes T, fonctionnellement épuisés, sont métaboliquement altérés, à cause des défauts du métabolisme mitochondrial. Par conséquent, l'amélioration de la condition métabolique des lymphocytes T par l'activation de l'AMPK, pourrait améliorer leur fonctions<sup>322-325</sup>.

Concernant HIF1 $\alpha$ , celui-ci est régulé positivement dans un environnement hypoxique typique du microenvironnement tumoral peu oxygéné et vascularisé. Il soutient la transcription des gènes glycolytiques qui favorisent le métabolisme anaérobie des cellules cancéreuses. Il peut aussi se lier à la région promotrice du facteur de transcription FoxP3, favorisant ainsi la différenciation des cellules T CD4+ naïves en cellules Tregs<sup>326</sup>. De plus, HIF1 $\alpha$  induit l'activation de ARG ou de molécules immunosuppressives autres comme CD39L ou VISTA<sup>327,328</sup> sur les cellules myéloïdes. Un environnement hypoxique semble inhiber la capacité de stimulation des DC. Il altère aussi les commutations de classe des lymphocytes B, favorisant une fois de plus un environnement propice aux développements tumoraux<sup>329,330</sup>. De manière plus directe, HIF1 $\alpha$  régule positivement CD39 et CD73 ce qui, *de facto*, augmente la dégradation de l'ATP et induit l'accumulation d'adénosine (ADO)<sup>331</sup>. ADO a un fort pouvoir immunosuppresseur *via* ses récepteurs A2A et A2B. Une fois ces récepteurs stimulés sur les cellules immunitaires par ADO, l'induction de différents mécanismes se met en place, à savoir: suppression de l'activation des lymphocytes T effecteurs, des DCs, des cellules NKs et de la production de cytokines Th1 et Th2; à l'inverse, activation des Tregs, des MDSCs et des TAM like-M2<sup>332,333</sup>.



**Figure 23. Représentation schématique de la dérégulation des voies métaboliques dans le microenvironnement tumoral** (Bader et al, Molecular Cell, 2020)<sup>282</sup>. Une compétition pour les nutriments, de l'oxygène, un faible pH et l'accumulation de métabolites favorisent des phénotypes immunosuppresseurs des cellules immunitaires (Treg, TAN, macrophages M2-like et MDSC), étant donné que leur métabolisme repose davantage sur la phosphorylation oxydative et l'oxydation des acides gras. Ceci a pour conséquence d'accélérer l'épuisement des lymphocytes T CD8+.

#### D. Tumeurs chaudes *versus* froides

On distingue phénotypiquement trois types de tumeurs en fonction de la quantité de cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement.

##### – Tumeur « immuno-inflammée »

Ces tumeurs, également dénommées « tumeurs chaudes », sont infiltrées par de nombreuses cellules immunitaires (lymphocytes T CD8+/CD4+ et myéloïdes) et sont donc très inflammatoires. Elles ont également une augmentation de la signalisation de l'IFN $\gamma$  et une charge mutationnelle élevée<sup>334,335</sup>. Malgré une infiltration immunitaire importante, les tumeurs se développent. Cela révèle que le système immunitaire fini par devenir inefficace. Les cellules tumorales vont mettre en place des processus pour inhiber les cellules immunitaires, par exemple par une forte expression de PD-L1. Par conséquent, les patients atteints de tumeurs chaudes vont, en général, mieux répondre aux traitements de type immunothérapie<sup>336,337</sup>.

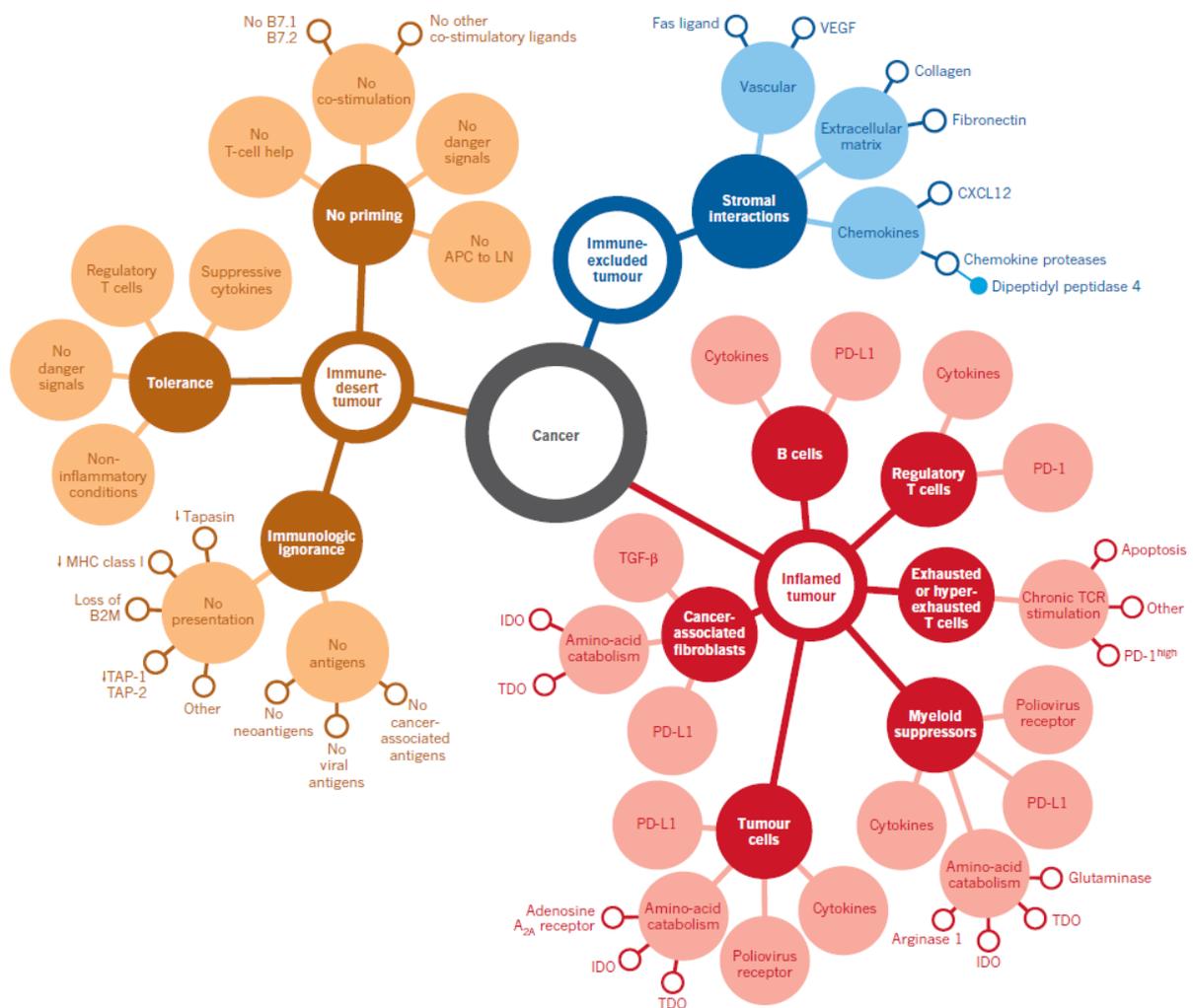
##### – Tumeur « immuno-exclue »

Dans ce microenvironnement, les cellules immunitaires sont présentes mais exclusivement en périphérie de la tumeur. Elles ne pénètrent pas à l'intérieur. Ces mécanismes de ségrégation sont dus à une quantité de chimiokines aberrante, un environnement hypoxique ou encore une barrière stromale. Ceci empêche les lymphocytes T de rentrer dans la tumeur pour détruire les cellules anormales<sup>334,335</sup>.

##### – Tumeur « immuno-désert »

Ici, à l'inverse des deux autres profils, très peu de cellules immunitaires sont présentes, parfois même aucune. Ceci laisse penser qu'aucune réponse immunitaire n'a été activée. Les hypothèses de cette défection du système immunitaire sont multiples: absence d'antigènes tumoraux, altération de la présentation d'antigènes ou encore défaut d'activation des lymphocytes T par les DCs<sup>335</sup>.

Les deux derniers profils sont également appelés « tumeur froide » du fait de leur manque d'immunité, de leur faible charge mutationnelle et de leur faible expression de CMH I. Ces tumeurs répondent à l'inverse des tumeurs « chaudes » rarement aux immunothérapies (Figure 24)<sup>336,337</sup>.



**Figure 24. Les trois catégories phénotypiques immunitaires du cancer** (Chen et Mellman, Nature Review, 2017)<sup>338</sup>. En rouge, symbolisation des tumeurs de type « immuno-inflammée »

». En bleu, symbolisation des tumeurs de type « immuno-exclue ». En orange, représentation des tumeurs de type « immuno-désert ».

## E. Défaut de reconnaissance des néo-antigènes

Les microenvironnements, même dits chauds, ont d'autres mécanismes qui leur permettent de se développer. Les cellules tumorales vont, par exemple, avoir un défaut dans la présentation des antigènes: de ce fait, même si ceux-ci ont un potentiel immunogène important, ils ne sont pas reconnus<sup>339</sup>. Il est estimé que 40 à 90% des tumeurs solides utilisent ce système (à savoir une régulation à la baisse de l'expression du CMH I)<sup>340</sup>.

Cette reconnaissance doit également être médiée par des DCs matures. Cependant, les cellules tumorales mettent tout en œuvre pour empêcher cette maturation. Les cellules cancéreuses sécrètent du TGF $\beta$ , de l'IL-10 ou de l'IL-6, empêchant les DCs de maturer. Ils expriment faiblement le CMH I et sécrètent IDO ou PGE<sub>2</sub> induisant un environnement immunosuppresseur. Ces DCs, qui restent immatures, ne peuvent pas stimuler efficacement les lymphocytes effecteurs<sup>341</sup>.

## F. Mimétisme de mécanismes immunosuppresseurs par les cellules tumorales

Un autre mécanisme, déjà en partie abordé dans les parties précédentes, consiste à mimer les fonctions immunosuppressives par les cellules tumorales. Ceci permet le recrutement des cellules immunosuppressives et l'inactivation des cellules effectrices. Deux grandes catégories sont ici abordées.

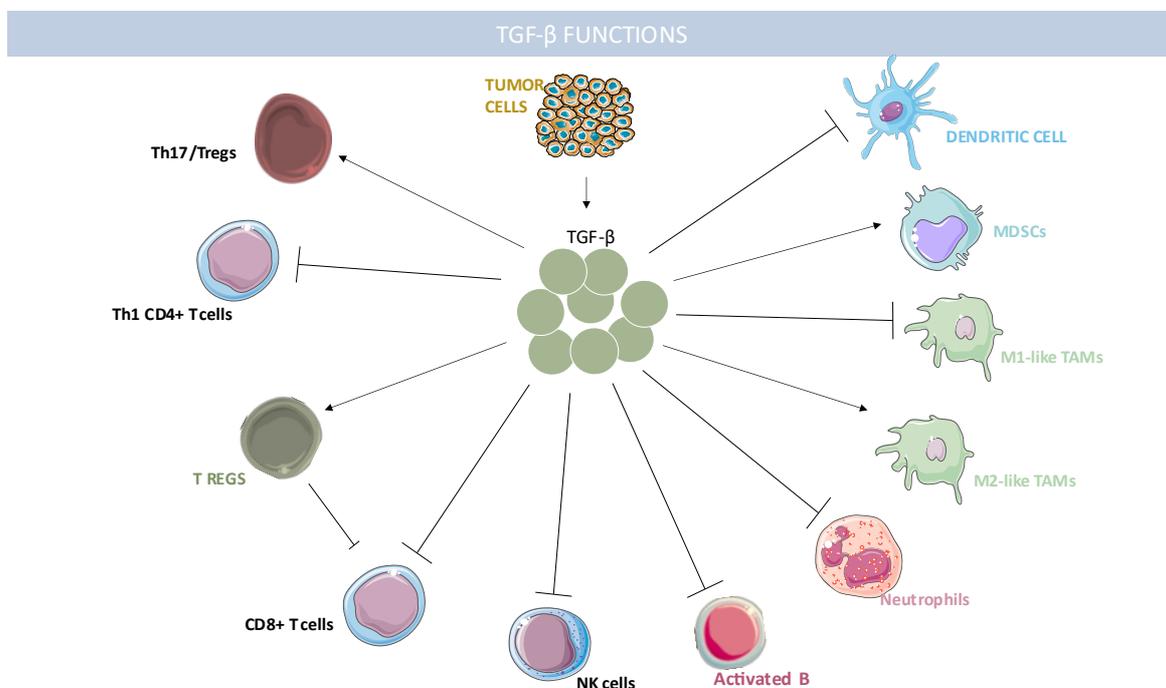
### a. Sécrétion de molécules immunosuppressives

Le rôle des cytokines, IL ou facteurs de croissances, synthétisés par les cellules tumorales, stromales et immunitaires, est d'exercer des effets sur l'orientation du microenvironnement importants. De nombreuses molécules sont libérées par les cellules tumorales comme le TGF $\beta$ , le VEGF, PGE<sub>2</sub> ou encore IDO comme précédemment expliqué. Dans cette partie, nous nous

focaliserons sur trois molécules en particulier : si leur présence a été abordée dans les parties précédentes, leur rôle spécifique au sein du microenvironnement reste à analyser.

### i. TGF $\beta$

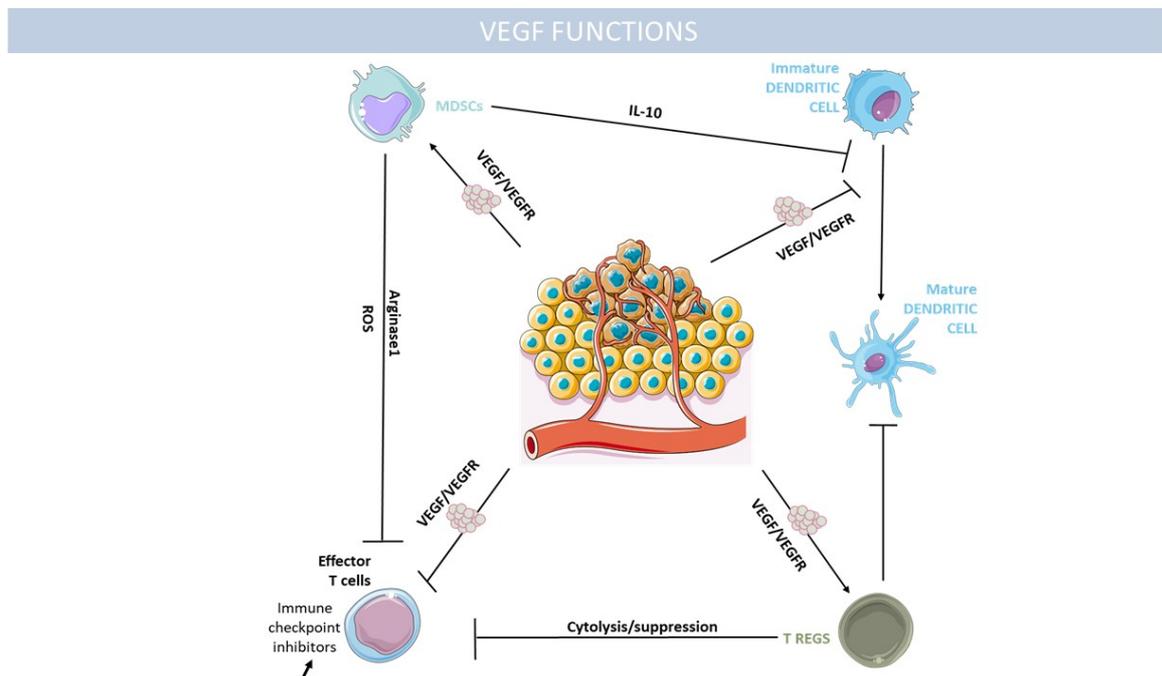
TGF $\beta$  est un facteur de croissance qui peut être sécrété, entre autres, par les cellules tumorales et stromales. C'est un facteur pléiotropique. Il régule l'homéostasie cellulaire sur tous les fronts : prolifération, différenciation, survie, adhésion, migration. Son rôle dans le microenvironnement tumoral est donc nécessairement très complexe. Dans un stade précoce de progression tumorale, il sera capable d'induire l'apoptose des cellules tumorales tandis que dans un stade avancé il favorisera leur croissance. Les cellules tumorales acquièrent donc une résistance face au TGF $\beta$  ce qui leur permet ensuite d'utiliser cette résistance à leur avantage. Son action pro-tumorale s'exerce *via* différents mécanismes (Figure 25). Il inhibe la production d'IL-2, perforine, granzyme et IFN $\gamma$ . Également, il inhibe la prolifération et la différenciation des lymphocytes T effecteurs, des lymphocytes B et des cellules NKs. Il est aussi en mesure d'altérer la maturation des DCs et diminuer l'expression de CD80/CD86. A l'inverse, le TGF $\beta$  favorise la différenciation des lymphocytes CD4+ en Treg ainsi que la polarisation des TAM en profile like-M2, des MDSCs et TAN2<sup>342,343</sup>.



**Figure 25. Les fonctions du TGFβ au sein du microenvironnement tumoral** (Adapté de Kim et Al, Journal of Hematology & Oncology, 2021)<sup>344</sup>. Le TGFβ peut être synthétisé par plusieurs types cellulaires au sein du TME. Le TGFβ soutient l'activité des cellules Th17 pro-inflammatoires, des MDSCs, des macrophages de type M2-like ainsi que des Tregs. Les Tregs réduisent ensuite le développement et l'expansion des lymphocytes T CD8+. Le TGFβ bloque l'induction des cellules Th1 pro-inflammatoires, des cellules NK, des cellules B, des neutrophiles, des macrophages M1-like ainsi que des DCs.

## ii. VEGF

Le VEGF est un facteur pro-angiogénique qui permet une migration et une prolifération des cellules endothéliales pour former de nouveaux vaisseaux sanguins. Les cellules tumorales se servent de ce facteur pour créer de nouveaux vaisseaux et *in fine* recevoir la quantité d'O<sub>2</sub> et de nutriments nécessaire à leur développement<sup>345</sup>. Au-delà de son rôle primaire, le VEGF a un impact sur les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral. Il peut inhiber la maturation des DC et induire les Tregs, ou encore favoriser l'expression des points de contrôle immunitaire inhibiteurs (Figure 26)<sup>346</sup>.



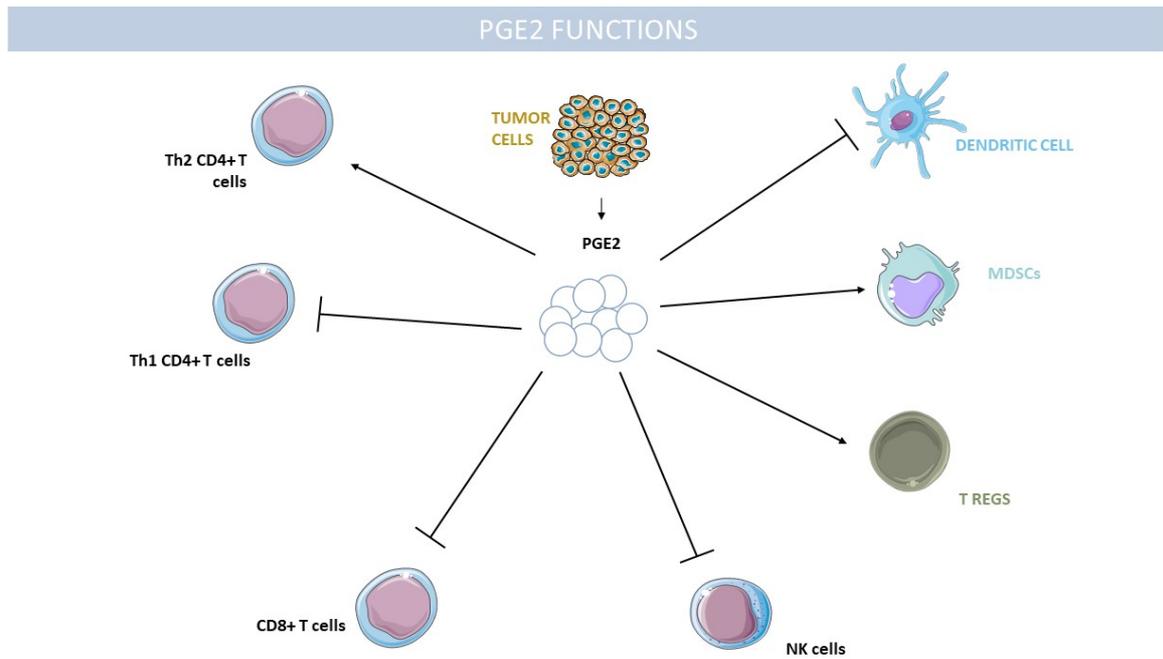
**Figure 26. Modulation du système immunitaire par le VEGF dans le microenvironnement tumoral** (Adapté de Yang et al, Frontiers in Immunology, 2018)<sup>347</sup>. VEGF aura un impact sur les lymphocytes T en inhibant les cellules T effectrices et en activant les cellules Tregs qui elles-

mêmes seront capables d'inhiber l'activation des lymphocytes T anti-tumoraux. Également, VEGF activera les MDSCs et inhibera les DCs.

### iii. PGE<sub>2</sub>

PGE<sub>2</sub> est un lipide ayant de multiples fonctions qui appartient à la famille des prostanoides (sous-classe des eicosanoïdes). Suite à l'oxydation d'acide arachidonique libéré par la membrane plasmique, il est synthétisé grâce aux cyclooxygénases (COX) puis grâce aux synthèses microsomales (mPGES-1 et 2) ou cytosolique (cPGES). PGE<sub>2</sub> va pouvoir se lier à l'un des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G. Ce récepteur est exprimé de manière ubiquitaire et peut moduler les niveaux de Ca<sup>2+</sup>, AMP cyclique et d'inositol phosphate. Ceci explique le pléiotropisme de PGE<sub>2</sub>. Il va donc être impliqué dans l'apoptose mais aussi dans la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, l'inflammation et la surveillance immunitaire. Dans le contexte tumoral, il a été montré que l'utilisation régulière d'aspirine était corrélée à un risque réduit de contracter un cancer colorectal<sup>348</sup>. Une hypothèse a donc été formulée : l'inhibition de COX par l'aspirine permettrait une réduction de synthèse notamment de PGE<sub>2</sub> qui elle, a un effet direct sur la tumorigenèse. Également, des antagonistes des récepteurs de PGE<sub>2</sub> sont en développement et démontrent des effets encourageant sur l'inhibition de la croissance tumorale sur des modèles pré-cliniques de cancer du côlon, du poumon ou encore du sein<sup>349-351</sup>.

Dans le microenvironnement tumoral, les cellules tumorales exploitent les fonctions immunomodulatrices de la PGE<sub>2</sub>. Plusieurs mécanismes rentrent en jeu comme le fait d'inhiber la prolifération des cellules NKs et des CTLs, inhiber la différenciation et l'activation des DCs, inhiber l'activité de phagocytose des macrophages et à l'inverse favoriser la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en Treg et stimuler l'expansion des MDSCs (Figure 27)<sup>175</sup>.



**Figure 27. Impact du PGE<sub>2</sub> sur les cellules immunitaires dans le contexte du cancer** (Adapté de Wang, D. & Dubois, Nature Review Cancer, 2010)<sup>351</sup>. PGE<sub>2</sub> produite par les cellules tumorales induit une immunosuppression grâce à une régulation négative des cytokines de type Th1 et une régulation positive des cytokines de type Th2 immunosuppressives. L'immunosuppression est également induite par une inhibition de la prolifération et de l'activité des cellules T CD8+, des cellules NK et des DCs. A l'inverse, PGE2 permettra l'expansion des cellules Treg ainsi que des MDSCs.

### b. Points de contrôle immunitaire

Le deuxième mécanisme d'immunosuppression qu'utilisent les cellules tumorales est l'induction de l'expression de points de contrôle immunitaire de types inhibiteurs, leur permettant d'échapper encore une fois au système immunitaire.

Les points de contrôle immunitaire sont essentiels pour réguler la balance activation/suppression du système immunitaire. Ces points de contrôle sont, soit de nature activatrice comme vu précédemment avec l'exemple du récepteur co-stimulateur CD28, soit de nature inhibitrice comme PD-1 présent sur les lymphocytes T. La liste s'est étoffée au fil des années, une trentaine de couples récepteur/ligand sont aujourd'hui répertoriés (Figure 28).

Les cellules tumorales détournent leurs fonctions physiologiques (maintenir un état d'équilibre, une tolérance du soi ou encore empêcher l'apparition de maladies auto-immunes).

Elles expriment de façon aberrante les ligands des points de contrôle inhibiteurs afin de limiter l'activation des cellules effectrices. Dans la suite de cet écrit, nous nous focaliserons tout d'abord sur CTLA-4 puis sur PD-1/PD-L1, cœur du sujet de ma thèse.

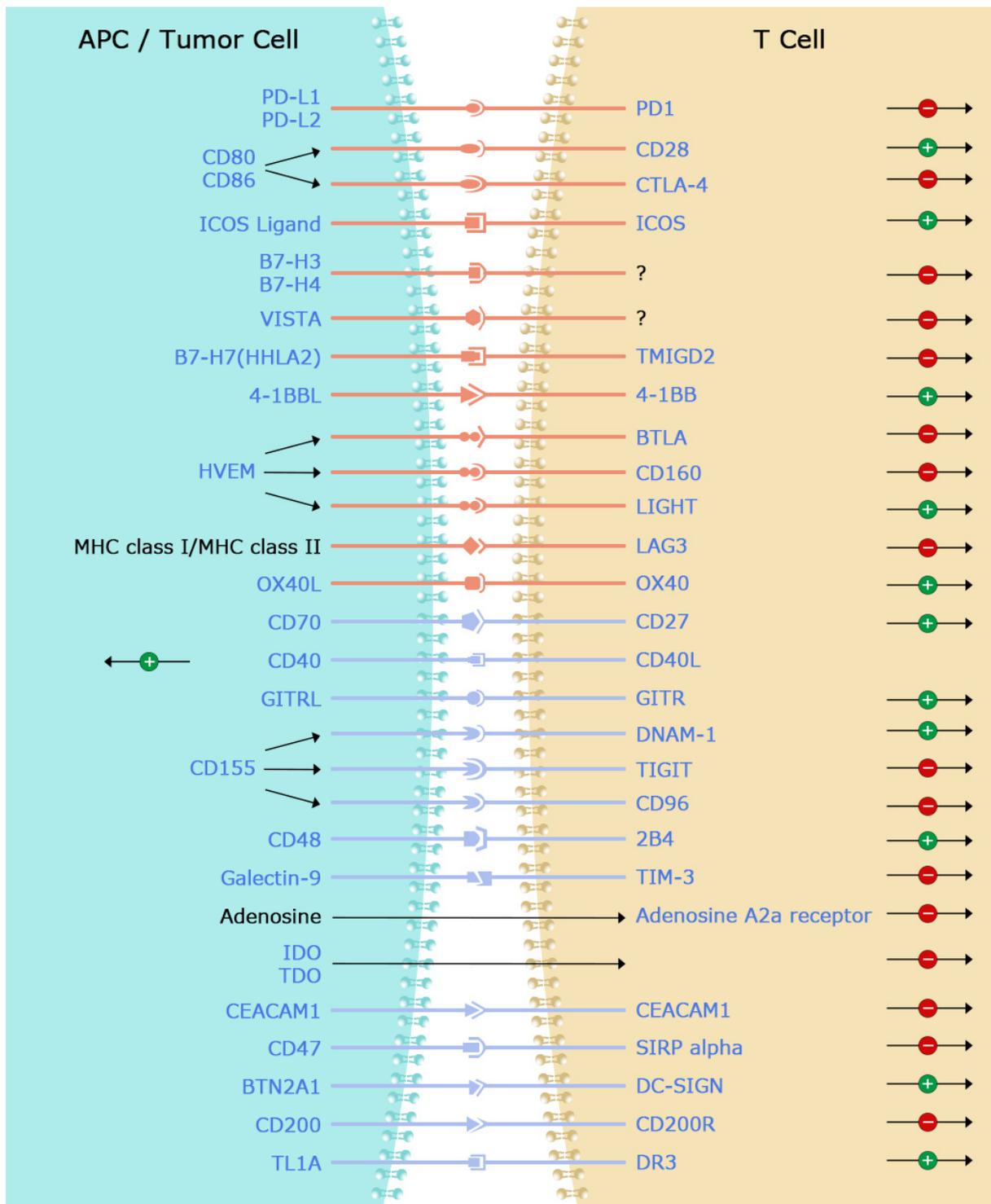


Figure 28. Liste des points de contrôle immunitaire non exhaustive (SinoBiological)<sup>352</sup>

### **i. CTLA-4 / CD80-86**

En 1987, une équipe de recherche française basée à Marseille décrit pour la première fois le récepteur homodimérique CTLA-4<sup>353</sup>. Depuis, beaucoup d'études se sont intéressées à cet antigène. Il interfère dans la stimulation des lymphocytes T étant donné qu'il est en compétition avec le co-stimulateur CD28 pour CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2). Cependant, il détient une affinité plus forte pour ces ligands que CD28 ce qui fait de lui une arme redoutable que met à profit la cellule cancéreuse : en inhibant la réponse T en diminuant leur prolifération, leur différenciation et leur activation.

### **ii. PD-1/PD-L1**

Contrairement à CTLA-4, PD-1 est un récepteur monomérique. Il est composé de 288 acides aminés et est codé par le gène PDCD1 (chromosome 1 chez la souris et 2 chez l'Homme). Également connu sous le nom de CD279, il est composé de deux domaines ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitor Motif) et ITSM (Immunoreceptor Tyrosine Switch Motif). Il doit son nom « programmed death » à l'étude de 1992, du fait de son induction lors de l'apoptose de thymocytes<sup>354</sup>. PD-1 est exprimé par les lymphocytes T et B, les monocytes, les cellules NK et les DCs. Il possède deux ligands PD-L1 (B7-H1 ou CD274) et PD-L2 (B7-DC ou CD273). Le rôle de PD-L2, dans les réponses immunitaires, est controversé du fait de ses fonctions activatrices ou inhibitrices<sup>355</sup>. Nous nous focaliserons ici sur PD-L1.

PD-L1 est également exprimé par un grand nombre de cellules, à savoir les lymphocytes T et B, les DCs, les macrophages mais aussi des cellules non sanguines telles que les cellules neuronales, les cellules souches mésenchymateuses ou encore pulmonaires et bien évidemment par les cellules tumorales. L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales est induite soit: (i) par des altérations génomiques qui permettent l'amplification du gène, (ii) par une régulation transcriptionnelle suite à l'induction de voies oncogéniques telles que AKT ou STAT3, (iii) par des régulations épigénétiques comme la méthylation d'îlot CpG dans le promoteur CD274, (iv) par des modifications post-transcriptionnelles ou traductionnelles, tout

ceci pouvant être induit à la suite de signaux inflammatoires produits par les lymphocytes T effecteurs (IFN $\gamma$ , IL-6 ou encore TNF $\alpha$ )<sup>356,357</sup>.

La régulation post-transcriptionnelle de PD-L1 est par contre mal connue. Récemment, un régulateur CMTM6 comme stabilisateur de PD-L1 a été identifié dans un bon nombre de cancers différents. En l'absence de CMTM6, l'expression de PD-L1 est réduite<sup>358</sup>. A l'inverse, l'ubiquitine ligase STUB1 E3 serait responsable de la dégradation de PD-L1<sup>359</sup>. L'engagement de PD-L1 avec son récepteur envoie également des signaux à la cellule tumorale. Cette signalisation protège de la cytotoxicité induite par l'IFN $\gamma$  *via* une voie dépendante de STAT3/caspase<sup>360</sup>. L'engagement de PD-L1 sur les cellules T CD4+ va par contre induire une signalisation inhibitrice dépendante de STAT3 qui induit une polarisation Th17 favorisant la polarisation des TAM en M2-like et supprimant l'activation des cellules effectrices<sup>361</sup>.

Outre l'expression de PD-L1 à la surface de la cellule tumorale, celle-ci est également capable de fabriquer une forme sécrétée qui garde ses fonctions inhibitrices. Le PD-L1 soluble a été détecté dans du plasma de patients atteints d'un cancer du poumon et a été associé à un mauvais pronostic<sup>362</sup>. Également, un nouveau variant d'épissage a été détecté et semble inhiber encore plus efficacement les lymphocytes T effecteurs que la forme monomérique<sup>363</sup>.

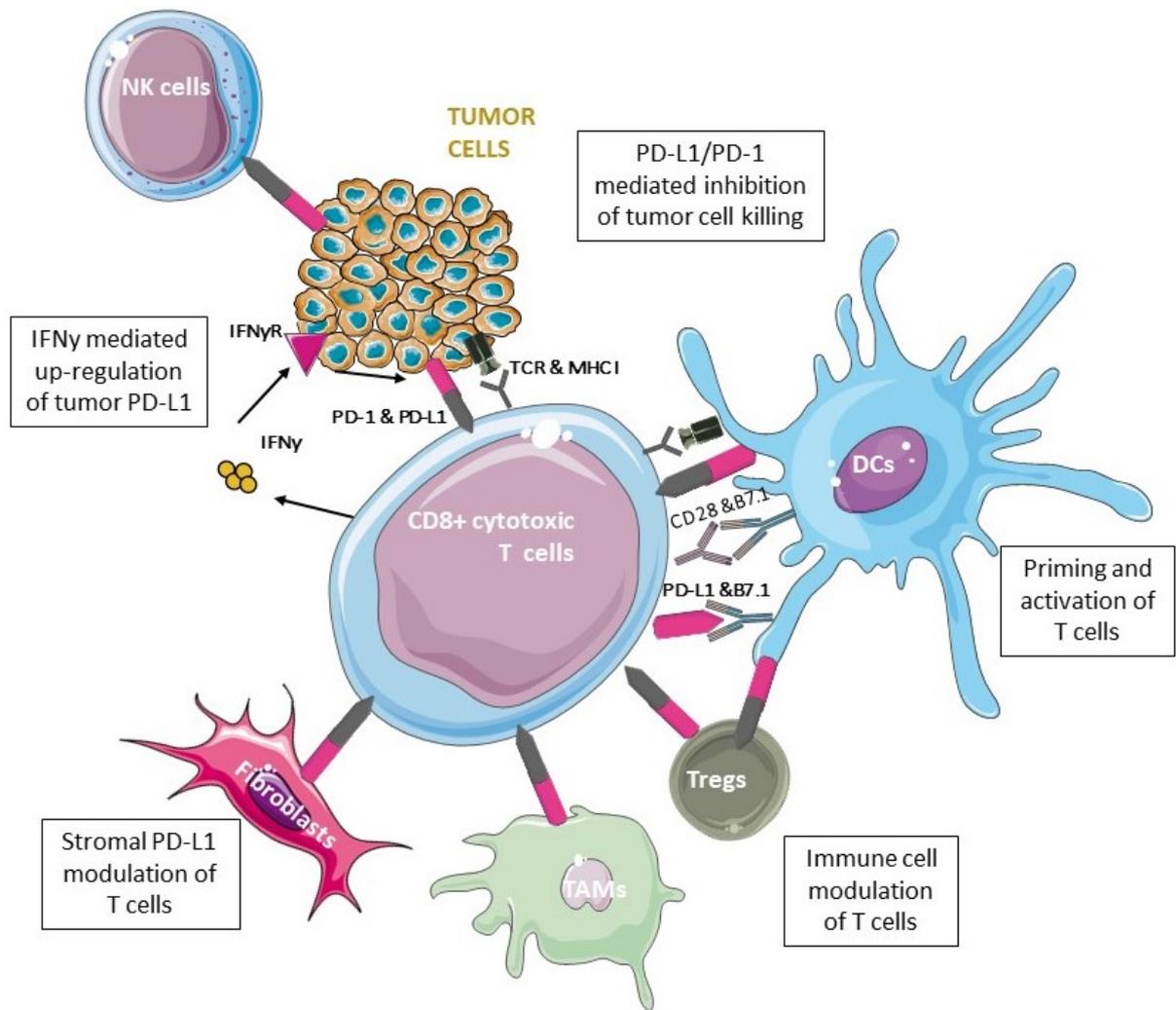
Mécanistiquement, lorsque PD-1 se lie à PD-L1, les régions ITIM et ITSM sont phosphorylées permettant une cascade de signalisation qui n'aura pas les mêmes conséquences en fonction du type cellulaire. Les tyrosines phosphatases SHP1 et SHP2 sont recrutés, permettant la déphosphorylation des molécules de signalisation qui ciblent les voies MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) /ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases) et PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase )/AKT et altèrent la signalisation TCR des lymphocytes T effecteurs<sup>364</sup>. A l'inverse, l'interaction de PD-L1 avec PD-1 exprimée sur les Treg induira l'expression de FoxP3, soutenant leur rôle immunosuppresseur<sup>365</sup>. Beaucoup d'études se focalisent sur l'effet de PD-1 sur les voies de signalisations. Un débat est en cours: quelle voie de signalisation est la cible principale de PD-1, à savoir TCR ou CD28<sup>366,367</sup>?

Même si cela reste à déterminer, un accord existe sur SHP2 qui est le seul partenaire direct de PD-1. Cependant, une étude a remis en cause cette certitude : elle a montré que des souris,

avec une délétion SHP-2 spécifique aux lymphocytes T, étaient capables de bénéficier du blocage PD-1 dans le contexte du cancer<sup>368</sup>. Ceci suggère qu'un autre partenaire existe et qu'il est tout à fait capable de fonctionner sans la présence de SHP2. De plus, l'équipe de Schatton, a cherché à savoir si la voie PD-1/PD-L1 pouvait être fonctionnelle dans la cellule tumorale. A l'aide de cellules de mélanome PD1+ provenant de patients, il a été démontré que, contrairement aux lymphocytes T où l'inhibition des voies MAPK/ERK et PI3K/AKT est effective, celles-ci étaient activées dans les cellules cancéreuses soutenant leur croissance<sup>369,370</sup>.

L'interaction PD-1/PD-L1 permet donc d'inhiber les cellules immunitaires effectrices. Ce processus est largement repris par les cellules tumorales afin de parvenir à une évasion immunitaire et permettre la mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur. Notamment, l'engagement de PD-1 sur les cellules T détourne la reprogrammation métabolique. Il favorise la FAO au détriment de la glycolyse, la glutaminolyse et l'utilisation des acides aminés. Ainsi comme décrit précédemment, ceci engendre une différenciation des Th en Treg et empêche les T effecteurs d'être actifs et de s'engager vers un phénotype mémoire<sup>316,371,372</sup>. Cette interaction sur les cellules NK diminuerait également leur activité effectrice. Sur les TAM, l'expression de PD-1 est corrélée à la polarisation de type M2<sup>373</sup>. Une étude a notamment montré qu'une inhibition du gène PDCD1 sur les cellules myéloïdes empêchait l'accumulation de MDSC dans le microenvironnement tumoral, mais permettait également une fonctionnalité améliorée des cellules effectrices ainsi qu'une croissance tumorale diminuée<sup>374</sup>.

Toutes ces fonctions sont donc supportées par la cellule cancéreuse qui s'est adaptée pour survivre face aux nombreuses possibilités que détient le système immunitaire pour la tuer. Elle crée un environnement qui lui est complètement favorable et optimal pour sa croissance (Figure 29). Face à ce processus bien rodé, les thérapies ciblant les points de contrôle immunitaire ont permis une avancée considérable dans le domaine de la cancérologie impliquant une meilleure prise en charge des patients, accompagnée parfois d'une rémission prolongée. Nous développerons cet axe dans le chapitre suivant.

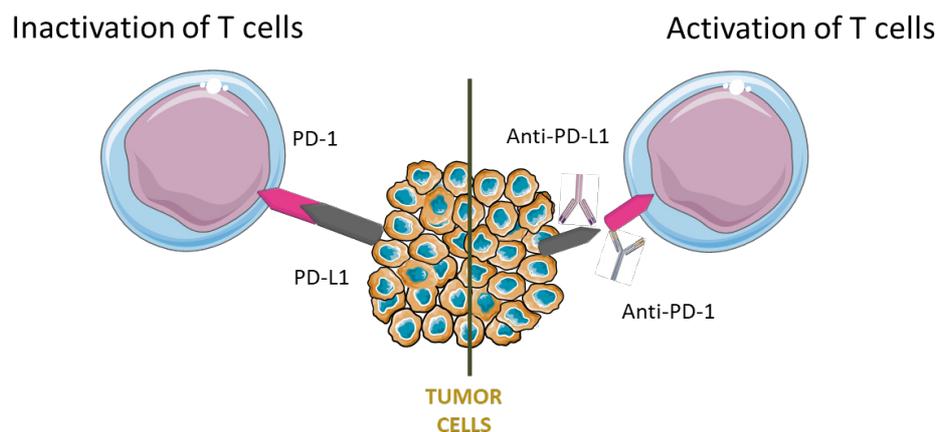


**Figure 29. Environnement immunosuppresseur médié par l'axe PD-1/PD-L1** (Adapté de Guo et al, *Frontiers in Immunology*, 2020)<sup>375</sup>. PD-1 est exprimé par les cellules T CD8+ et les cellules NK. PD-L1 est exprimé par les cellules tumorales, les DCs, les Tregs, les TAM et les fibroblastes. La production d'IFN $\gamma$ , par les cellules effectrices, module à la hausse l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales. La liaison PD-1/PD-L1 inhibe les cellules T CD8+ et les NK.

## 5. Blocage de l'axe PD-1/PD-L1

### A. Bénéfice

Les ICIs ont permis de révolutionner la prise en charge des patients atteints de certains sous-types de cancers qui, avant ces thérapies, étaient incurables. Cette thérapie s'attèle à réactiver le système immunitaire à l'aide d'anticorps monoclonaux ciblant les points de contrôle immunitaire inhibiteurs ou activateurs. Le premier anticorps testé en clinique fut l'anti-CTLA-4, ipilimumab, mais à cause de ses effets secondaires importants, les anticorps ciblant l'axe PD-1/PD-L1 ont rapidement pris l'ascendant (Figure 30). Actuellement le développement de nombreuses thérapies ciblant d'autres points de contrôle immunitaire comme TIM-3, LAG-3 ou encore ICOS sont à l'étude<sup>376-378</sup>.



**Figure 30. Mécanisme d'action de l'immunothérapie ciblant l'axe PD-1/PD-L1** (Adapté de Alard et Butnariu et al, *Cancers*, 2020)<sup>379</sup>. La liaison PD-1/PD-L1 inactive les cellules T. Les anticorps thérapeutiques ciblant cet axe, à savoir anti-PD-1 ou anti-PD-L1, permettent d'activer les cellules T.

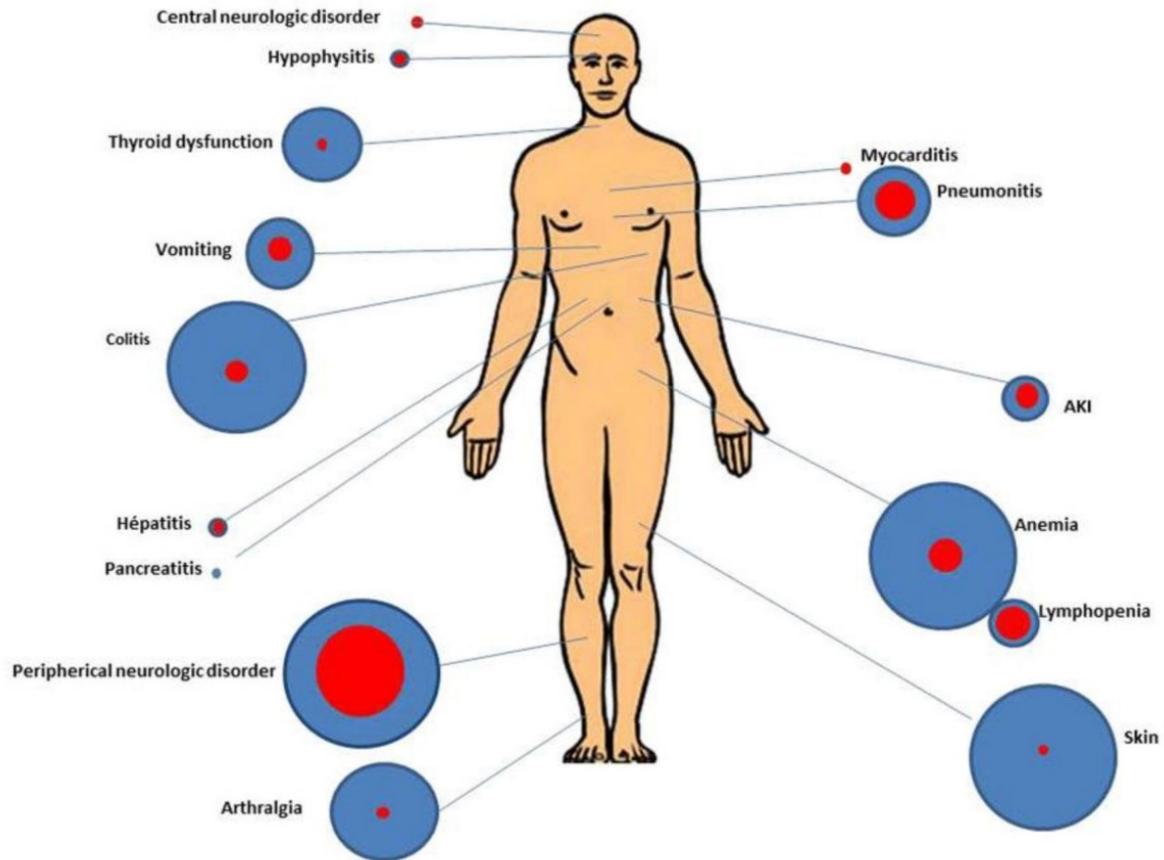
Ces thérapies ont d'abord été adressées aux patients souffrant de mélanome ou de cancer du poumon. Aujourd'hui, elles sont approuvées dans bon nombre de cancers tels que décrits précédemment (Figure 5). A ce jour, deux anticorps anti-PD-1 (nivolumab et pembrolizumab) sont autorisés en France pour traiter le mélanome, le cancer bronchique non à petites cellules, le cancer du rein, le lymphome de Hodgkin, le cancer urothélial et les cancers épidermoïdes

tête et cou<sup>380</sup>. Pour anti-PD-L1, l'atezolizumab et l'avelumab sont utilisés pour le cancer du sein triple négatif, le cancer urothélial et le cancer bronchique non à petites cellules<sup>380</sup>.

L'efficacité est variable en fonction du type de cancer: pour le mélanome, 40% des patients seront de bons répondeurs tandis que dans le cancer du poumon la proportion varie entre 20 et 30%<sup>2</sup>.

Cependant, il est important de noter que les critères d'évaluation classique RECIST1.1 ne sont pas optimaux pour évaluer cette efficacité. Ces critères sous évaluent le taux de répondeurs du fait d'une réponse particulière survenant chez certains patients traités par immunothérapie, appelé « pseudo-progression ». Pour le mélanome et le cancer du poumon, le taux de pseudo-progresseurs est respectivement de 3,7 - 15,8% et 5 %. Une réponse de type pseudo-progression est définie comme une augmentation initiale de la taille de la tumeur, due à une infiltration de cellules immunitaires exacerbée dans le lit tumoral mais qui s'accompagne d'une réponse au traitement<sup>381</sup>. De nouveaux critères, créés spécialement pour ces traitements, tels que irRC (immune related Response Criteria) ou iRECIST sont mieux adaptés pour évaluer la réponse à l'immunothérapie et discriminer le profil de pseudo-progression<sup>382</sup>.

De manière générale, ces thérapies sont mieux tolérées qu'une chimiothérapie. Cependant, des effets indésirables liés à l'activation excessive du système immunitaire peuvent survenir, accompagnés d'effets graves (Figure 31). La détection précoce de ces effets secondaires est primordiale pour une bonne prise en charge.



**Figure 31. Fréquence des effets secondaires liés aux inhibiteurs de points de contrôle ciblant l'axe PD-1/PD-L1** (Ann Intensive Care, 2019. doi: 10.1186/s13613-019-0487)<sup>383</sup>. La taille du cercle en bleu représente l'incidence des effets secondaires, la taille du cercle en rouge représente les effets secondaires graves III et IV.

Le mécanisme d'action de ces thérapies reste mal connu. L'anti-PD-1 renforce la réponse effectrice médiée par les lymphocytes T mais peut, à priori, aussi soutenir la réponse B et accroître la production d'anticorps ainsi que restaurer les fonctions des cellules NK<sup>384</sup>. Une étude longitudinale a montré que le microenvironnement tumoral des patients répondant au traitement par l'anticorps anti-PD-1, s'avérait être enrichi en cellules T CD8+ et cellules NK<sup>385</sup>. Egalement, le répertoire TCR des patients répondeurs était augmenté.

Cette différence de composition semble émerger en début de traitement<sup>386</sup>. Elle permettrait aussi de reprogrammer le métabolisme des lymphocytes T pour leur fournir la capacité de proliférer<sup>323</sup>. Pour l'anti-PD-L1, une plus faible toxicité a été décelée puisque que PD-1 peut toujours se lier à son autre ligand PD-L2. Le mécanisme d'action de l'anti-PD-L1 peut être

accompagné par une régulation positive des signaux délivrés par les DC, car PD-L1 ne peut plus se lier à CD80. Comprendre les mécanismes sous-jacents pourrait permettre de mieux cibler les futurs patients répondeurs et proposer de nouveaux biomarqueurs.

## B. Biomarqueurs

L'identification de biomarqueurs est un enjeu majeur pour prédire l'efficacité de réponse aux ICIs. Notamment les effets secondaires, parfois importants, associés aux ICIs poussent les recherches à trouver quels patients pourront être de bons répondeurs.

### a. Expression de PD-L1

L'évaluation de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales ou immunitaires est l'un des marqueurs prédictifs le plus largement utilisé. Ce statut est mesuré par immunohistochimie (IHC) et correspond à la proportion de cellules tumorales et/ou cellules immunitaires positives pour PD-L1 ou PD-1. En toute logique, on s'attendrait à ce qu'un taux élevé soit corrélé à un taux de réponse accru aux ICIs. Lors de l'une des premières études pivots sur le nivolumab, des patients atteints de divers cancers solides ont été recrutés. Cette étude a montré que seules les tumeurs avec une expression de PD-L1 >5% répondaient aux traitements, en comparaison aux tumeurs qui n'exprimaient pas de PD-L1<sup>387</sup>.

Cependant, les conclusions ne sont pas si simples. De nombreuses études ont démontré des effets contradictoires, notamment, à cause de méthodes non standardisées dans les différentes études cliniques (différents seuils d'expression de PD-L1, différents systèmes de notation, différents kits d'IHC provenant de multiples fournisseurs et anticorps de détection provenant de clones distinct). De plus, l'hétérogénéité tumorale et le stade de développement peuvent aussi être des facteurs confondants. Dans une étude, 73 cas de patients avec un cancer primitif du poumon et des métastases cérébrales ont révélé une discordance significative dans l'expression de PD-L1 entre les tumeurs primaires et métastatiques<sup>388</sup>.

## b. Système de réparation des mésappariements

Un autre biomarqueur utilisé en clinique est le système de réparation des mésappariements (MMR) qui permet de corriger les défauts lors de la réplication de l'ADN. Le maintien de ce système contribue à une stabilité génomique; à l'inverse sa réduction favorise l'oncogenèse<sup>389,390</sup>. Ce déficit de MMR provoque une instabilité des microsatellites (MSI) qui conduit à une augmentation de mutations associée à un meilleur pronostic chez des patients recevant l'anti-PD-1/PD-L1<sup>391</sup>. Une autre mutation, celle de POLE (impliqué dans la réparation des erreurs causées par la réplication de l'ADN) est à l'étude. Il a été démontré que des patientes atteintes d'un carcinome de l'endomètre avec une mutation POLE répondaient mieux au traitement<sup>392</sup>.

## c. Charge mutationnelle

La charge mutationnelle, comme citée précédemment, est souvent utilisée comme biomarqueur prédictif de la réponse aux ICIs. Cependant, il a été montré que ce biomarqueur ne semble pas être un bon indicateur dans tous les sous-types tumoraux. Il semblerait que ce biomarqueur puisse être efficace s'il est combiné à la composition clonale de la tumeur. Il a été montré qu'une charge mutationnelle élevée dans une tumeur homogène -c'est à dire peu de mutations sous-clonales- était associé à des bénéfices cliniques et à une sensibilité accrue au traitement anti-PD-1/PD-L1 par rapport à une tumeur avec un taux élevé de mutations sous-clonales<sup>393</sup>. De plus, il s'agit d'un marqueur testé sur une biopsie à site unique. Selon la masse tumorale, le prélèvement peut ne pas être représentatif avec le risque d'une surestimation du niveau de mutation. Ceci peut expliquer pourquoi ce marqueur n'est pour le moment pas suffisamment puissant pour prédire la réponse aux ICIs.

## d. Oncogènes

Dans la même veine, l'identification de mutations qui affectent l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales comme celles touchant EGFR, KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog) et ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) permet de prédire

une réponse ou non aux ICIs. Les patients avec une mutation sur EGFR, bien qu'ils régulent positivement l'expression de PD-L1, ont une réponse plus faible aux traitements anti-PD-1/PD-L1 par rapport aux patients avec un EGFR non muté<sup>394,395</sup>. Les patients ayant le réarrangement ALK ont eu une régulation à la baisse de PD-L1. Ils présentent également un moins bon taux de réponse<sup>396,397</sup>. A l'inverse, des patients avec une mutation KRAS semblent mieux répondre aux anti-PD-1<sup>398</sup>. Notamment, dans le cas des adénocarcinomes pulmonaires, KRAS est le facteur oncogénique le plus courant. Une hétérogénéité phénotypique associée aux mutants KRAS existe. Une co-mutation KRAS et TP53 représente un groupe distinct ainsi qu'une inactivation de STK11/LKB1 associée à KRAS mutant. Ce dernier sous-groupe est associé à une moins bonne réponse aux anti-PD-1 et également à un microenvironnement immunitaire de tumeurs « froides »<sup>399</sup>.

#### e. Microbiote

Le microbiote peut aussi être utilisé comme indicateur de la réponse aux ICIs. En effet, en fonction des bactéries présentes, une réponse efficace ou non pourra être associée. Par exemple un taux élevé de *Faecalibacterium* est corrélé à un taux de réponse élevé chez les patients recevant de l'anti-PD-1, à l'inverse d'une colonisation par *Akkermansia muciniphila* (Figure 32)<sup>400,401</sup>. De ce fait, la composition du microbiote semble être un bon facteur pronostic.

Bactéries	Effet principal sur l'immunité	Prédiction de l'effet du traitement	Modèle
<i>A. muciniphila</i>	Recrutement accru de cellules CCR9 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T dans le lit tumoral	Réponse anti-tumorale efficace	Souris/Humain
<i>E. hirae</i>	Augmentation de l'IL-12 sécrétée par le DC	Réponse anti-tumorale efficace	Souris/Humain
<i>E. faecium</i> <i>C. aérofaciens</i> <i>B. adolescentis</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>V. parvula</i> <i>P. merdae</i> <i>Lactobacillus sp. B. longum</i>	Augmentation des cellules CD8 <sup>+</sup> T spécifiques aux néoantigènes et diminution de FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Treg dans le microenvironnement tumoral	Réponse anti-tumorale efficace	Souris/Humain
<i>Bifidobactérie</i>	Augmentation de la production d'IFN-γ et complexe majeur d'histocompatibilité Classe II <sup>hi</sup> DC	Réponse anti-tumorale efficace	Souris
<i>Fécalibactérie</i>	Cellule effectrice périphérique accrue CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> T	Réponse anti-tumorale efficace	Souris/Humain
<i>Bactéroïdales</i>	Augmentation des Treg périphériques et des cellules suppressives dérivées des myéloïdes	Mauvaise réponse anti-tumorale	Souris/Humain

**Figure 32. Récapitulatif des bactéries présentes dans le microbiote et leurs impacts sur la tumeur** (Adapté de Yi et al, Molecular Cancer, 2018)<sup>402</sup>.

#### f. Immunoscore

La présence de lymphocytes T CD8+ peut aussi être un bon biomarqueur prédictif. En particulier, l'immunoscore tumoral est une nouvelle méthode de classification qui s'appuie sur l'infiltration des cellules T précédemment citées: il s'avère être un bon prédictif dans les cancers colorectaux<sup>174</sup>. Cependant, le statut des cellules T CD8+ semble aussi être important dans la fiabilité de prédiction. En effet, une étude a montré qu'une proportion plus importante de cellules CD8+ qui expriment PD-1 permettra aux patients de mieux répondre aux thérapies anti-PD-1/PD-L1<sup>403</sup>.

#### g. Sang périphérique

Les biomarqueurs détectés dans le sang périphérique sont également très étudiés. A l'inverse d'une biopsie, le prélèvement sanguin à l'avantage d'être très peu invasif. Plusieurs marqueurs sont donc en cours de développement.

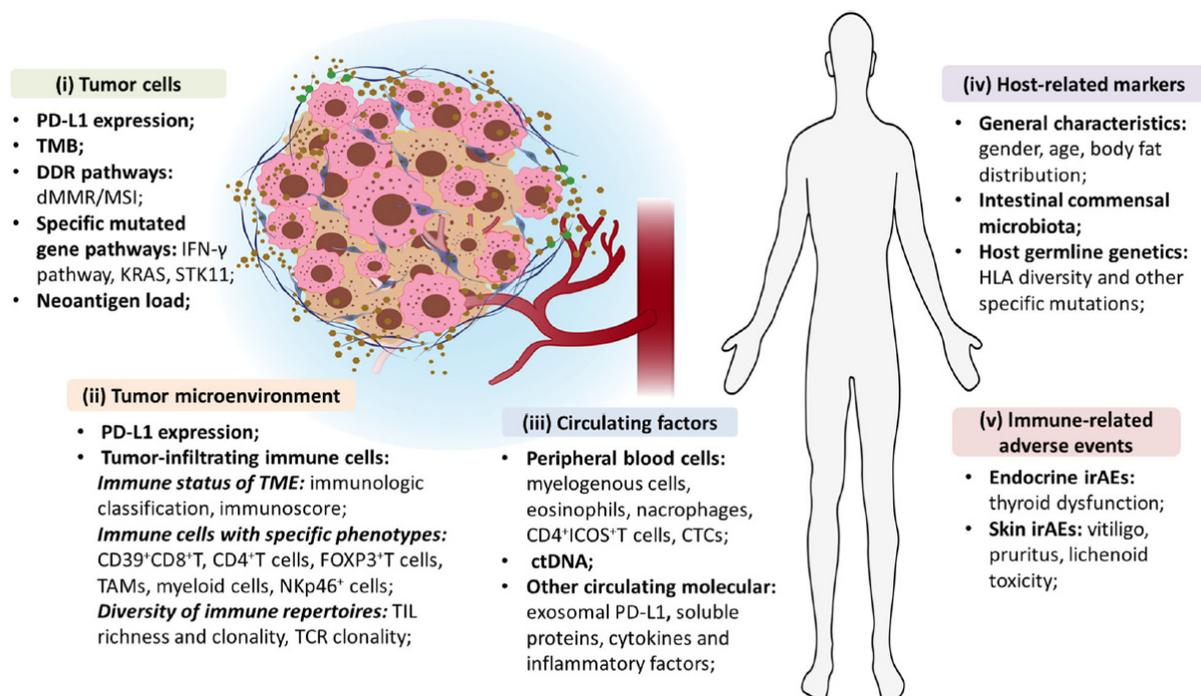
Le rapport neutrophiles/lymphocytes (NLR) est par exemple associé à une moins bonne réponse<sup>404</sup>. Le faible taux de LDH (lymphocyte déshydrogénase) est lui associé à une meilleure réponse. Ceci a amené à proposer un indice pronostic immunitaire pulmonaire (LIPI) qui regroupe ces deux indicateurs. Trois groupes ont été définis en fonction de l'association du rapport NLR et du taux de LDH, l'analyse de près de 4 000 patients a démontré la puissance prédictive de leur association<sup>405</sup>.

Le taux de cytokines s'avère aussi être un bon marqueur. Entre autres, un niveau élevé d'IFN $\gamma$  est corrélé à une meilleure réponse à l'anti-PD-1 dans le cancer du poumon<sup>406,407</sup>. Récemment, il a été montré que la perte de Polybromo-1 (PBRM1) pouvait altérer la voie de signalisation de l'IFN $\gamma$ . La mutation PBRM1 étant aussi associée à une plus faible réponse au traitement dans le cancer rénal<sup>408</sup>, celle-ci pourrait devenir un futur biomarqueur routinier.

La détection d'ADN tumoral circulant (ADNct) permet également d'obtenir des informations liées à la future réponse. Par exemple, la présence persistante d'ADNct pendant le traitement est associée à une moins bonne réponse chez des patients atteints de mélanome<sup>409</sup>.

PD-L1, qui a plusieurs variants d'épissage, peut être sous forme soluble. La détection de PD-L1 soluble avant le traitement est associée à un mauvais pronostic. Cependant, si ce taux augmente rapidement après traitement par des ICI, cela pourrait indiquer le déclenchement d'une réponse immunitaire spécifique et puissante contre la tumeur<sup>410</sup>.

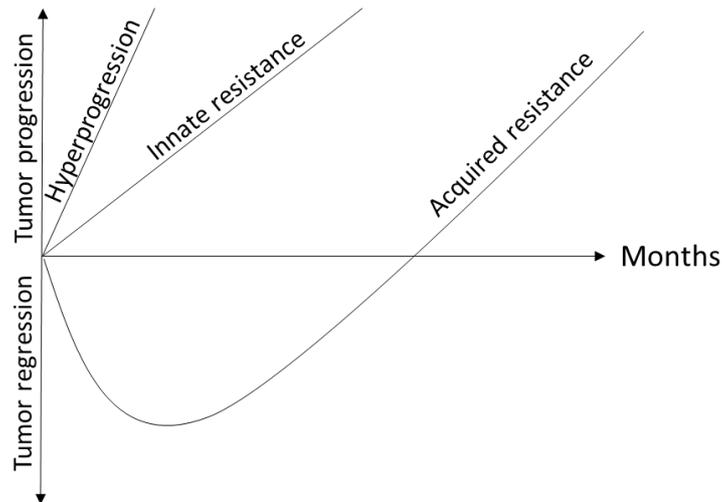
Avec les nouvelles connaissances autour de la question « comment les cellules tumorales échappent au système immunitaire ? », il semble que seule une association de marqueurs permettra de sélectionner efficacement les patients répondeurs des non-répondeurs. Ce large cadre composé de plusieurs biomarqueurs s'étoffe d'année en année et devient de plus en plus précis (Figure 33).



**Figure 33. Les différents biomarqueurs prédictifs de l'efficacité des ICI** (Bai et al, Biomarker Research, 2020)<sup>411</sup>. Détails des biomarqueurs liés aux cellules tumorales, des biomarqueurs du microenvironnement immunitaire tumoral, des facteurs circulants, des facteurs liés à l'hôte et des événements indésirables liés au système immunitaire.

## C. Les Résistances cliniques

Bien que les immunothérapies aient permis une avancée fulgurante dans la prise en charge des patients atteints de cancers, il n'en reste pas moins que la plupart des patients ne répondent pas aux traitements comme espéré. Dans les parties suivantes, nous aborderons les différents types de résistances et leurs mécanismes associées aux ICI (Figure 34).



**Figure 34. Représentation graphique des différents types de résistances pouvant survenir suite aux traitements ciblant l'axe PD-1/PD-L1 (Adapté de Frelaut et al, Int J Mol Sci, 2019)<sup>412</sup>. Évolution tumorale dans le temps, suite à l'administration d'ICIs de type PD-1 ou PD-L1.**

### a. Hyperprogression

Depuis l'une des premières publications par Champiat et al. qui rapporte le cas de patients hyperprogressseurs, de nombreuses études ont été publiées dans ce sens. Cette réponse, paradoxale n'est cependant pas encore complètement acceptée dans la communauté scientifique. La définition communément admise de l'hyperprogression est une accélération de la croissance tumorale suite à l'administration d'un ICI, supérieur à ce qui est attendu dans le cadre d'une progression conventionnelle sans traitement. Le point principal que nous pouvons relever est que, vraisemblablement, une réponse spécifique suite aux traitements par ICI est observable en clinique par rapport à d'autres thérapies. Une étude a comparé la

survenue d'une réponse hyperprogressive suite à l'administration de chimiothérapies conventionnelles *versus* ICI chez des patients atteints de cancer du poumon. Le pourcentage rapporté de patients hyperprogresseurs a été de 5,1% pour la chimiothérapie *versus* 13,8% pour l'ICI<sup>413</sup>. Ce type de réaction est donc exacerbé chez des patients traités aux ICIs. Cette réponse peut survenir dans presque tous les cancers traités par les ICIs mais de manière extrêmement variable en fonction de leurs sous-types (4% à 29%)<sup>381</sup>.

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce mécanisme. Afin de faire un état des lieux de cette question et ainsi mieux comprendre les enjeux de cette observation clinique, nous avons écrit une mini revue publiée dans *Frontiers in Immunology* en 2020 (Annexe I). La conclusion de ce travail est qu'il reste à ce jour compliqué d'expliquer ce mécanisme du fait de la faible disponibilité d'échantillons de patients. Cette question pourrait faire l'objet d'une étude à l'aide d'une cohorte homogène d'échantillons de patients avant et après traitements. L'obtention de résultats comparables permettrait de comprendre ce que le blocage des points de contrôle immunitaire provoque.

## b. Résistance primaire

La résistance initiale aux traitements de type ICI concerne environ 60% des patients<sup>414</sup>. Une définition consensuelle a été proposée depuis peu par un groupe de travail. Une résistance primaire (ou innée/*de novo*) doit être distinguée d'une pseudo-progression : la durée d'exposition au médicament requise pour la classification de cette résistance est donc extrêmement importante. Ce groupe a déterminé que si une personne, après avoir reçu au moins 6 semaines d'exposition aux ICIs (soit deux cycles complets) pendant 6 mois maximum, présentait toujours une progression de la maladie, elle pouvait être considérée comme ayant une maladie avec une résistance primaire. Cette résistance est définie par l'incapacité des cellules immunitaires à produire une réponse anti-tumorale suite à l'exposition au traitement<sup>415</sup>.

Cependant, une zone grise existe, moins de 5% des patients auront à la première imagerie une régression partielle et développeront ensuite une progression de la maladie dans les 6

premiers mois. Pour simplifier l'éligibilité aux essais cliniques, ces patients sont définis comme ayant une résistance primaire.

Pour ce type de résistance aux ICIs, au-delà de comprendre quels mécanismes sont impliqués, il est crucial, pour la prise en charge future des patients, d'identifier les bons biomarqueurs qui permettront de définir les combinaisons de traitement potentiellement efficaces. En effet, cette résistance implique que la thérapie n'a aucun effet sur la progression tumorale. Par conséquent, la résistance peut être déjà présente et n'est pas définie comme une réponse à la thérapie.

#### **i. Mécanismes de résistance extrinsèque à la cellule tumorale**

Les mécanismes de résistance extrinsèque impliquent les composants autres que les cellules tumorales du microenvironnement tumoral : toutes les cellules immunosuppressives précédemment citées peuvent jouer un rôle dans cette résistance primaire.

Dans les mécanismes principaux découverts nous pouvons citer :

- L'expression des ligands inhibiteurs de points de contrôle immunitaire tel que PD-L1 ou CTLA-4, permettant une inhibition locale des CTLs<sup>414</sup>.
- De façon similaire l'intensité d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD8+ peut induire une résistance. En effet, des cellules CD8+ avec une forte expression de PD-1 ne pourront pas être réactivées par la thérapie et resteront dysfonctionnelles<sup>416</sup>. TOX (Thymocyte selection-associated high mobility group box gene) a récemment été identifié comme un régulateur positif de PD-1. Son niveau d'expression par les cellules CD8+ infiltrant les tumeurs est corrélé négativement avec le taux de réponse à l'anti-PD-1 chez les patients atteints de cancer du poumon et de mélanome<sup>417</sup>. Il semble que TOX agisse en réduisant la dégradation de PD-1 et en favorisant sa translocation à la surface de la membrane des lymphocytes T CD8+<sup>418,419</sup>.
- Les points de contrôle immunitaire tels que TIM3 et LAG3 peuvent également être régulés de prime abord à la hausse par les lymphocytes T. Ceci implique que le blocage

seul de l'axe PD-1/PD-L1 ne sera pas suffisant pour réactiver les lymphocytes T<sup>420</sup>. Tout ceci peut être en lien avec l'épuisement irréversible des cellules T qui, de fait, contribue à la résistance aux ICIs.

- La sécrétion de cytokines immunosuppressives comme le TGFβ ou l'IL-10.
- Les fibroblastes jouent également un rôle. En présence de TGFβ, les fibroblastes vont acquérir un phénotype pro-tumoral (CAFs Cancer-Associated Fibroblasts).

## ii. Mécanismes de résistance intrinsèque à la cellule tumorale

Ces mécanismes de résistance intrinsèque comprennent l'expression ou la répression de certaines voies ou certains gènes dans la cellule tumorale qui empêchent l'infiltration ou le fonctionnement des cellules immunitaires même si celles-ci sont réactivées par la thérapie. Certaines ont été abordées dans les parties précédentes puisqu'initialement ces voies permettent à la tumeur d'évoluer. Elles ne sont donc pas forcément activées du fait de la thérapie mais bien déjà fonctionnellement actives avant l'administration du traitement. Ceci implique donc que les ICIs ne sont pas assez puissants pour contourner les mécanismes déjà mis en place par la tumeur. Ce point montre toute la subtilité d'un biomarqueur efficace qui prédira si la tumeur est déjà « conçue » pour être résistante ou non. Ces mécanismes incluent l'altération des voies permettant la fabrication et l'expression des antigènes, l'altération du CMH I, la mutation des voies oncogéniques ou encore l'expression constitutive des ligands des points de contrôle. De ceci en découle de multiples mécanismes intrinsèques à la tumeur associés à cette résistance innée aux ICIs.

Le dysfonctionnement de la présentation de l'antigène par le CMH I est l'un des processus de résistance les plus importants. Le β2-microglobuline est un composant essentiel à la bonne présentation de l'antigène par le CMH I. Le β2-microglobuline muté a pour conséquence un mauvais transport du CMH I à la surface de la membrane plasmique. Cette mutation est fréquemment retrouvée mutée dans les cancers colorectaux impliquant une résistance primaire<sup>421</sup>. De plus, la mutation de β2-microglobuline est trois fois plus élevée chez les

patients non répondeurs en comparaison avec les patients répondeurs atteints de mélanome<sup>422</sup>.

La voie oncogénique MAPK permet, entre autres, la production de VEGF et d'IL-8 qui ont des effets inhibiteurs sur le recrutement et le fonctionnement des lymphocytes T<sup>423</sup>. Il a été montré que les inhibiteurs de MAPK augmentaient la fonction des lymphocytes T ainsi que l'expression du CMH I et de PD-L1 dans le cancer du poumon<sup>424,425</sup>.

PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) est un régulateur négatif de la voie de signalisation PI3K. La perte de PTEN qui est détectée chez 30% des patients atteints de mélanome<sup>426,427</sup>. Cette perte est associée à une diminution significative de l'expression des gènes de l'IFN $\gamma$ , du granzyme B et de l'infiltration des cellules CD8 + T. De plus, la détection de la perte de PTEN est plus élevée dans les tumeurs non infiltrées par les lymphocytes T<sup>428,429</sup>.

Une signalisation aberrante de la voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine est aussi associée à une résistance. En particulier, la  $\beta$ -caténine empêche le recrutement des DCs CD103+ et des lymphocytes T. Ceci implique que les DCs ne peuvent plus jouer leur rôle de CPA et inhibent par conséquent l'activation potentielle des lymphocytes T<sup>430</sup>.

Le remodelage de la chromatine par le complexe SWI/SNF (fréquemment muté dans les cancers) semble aussi être impliqué dans la résistance. L'étude des analogues mammifères BAF (BRG1-Associated Factor) et PBAF (Polybromo-associated BAF) a montré des conséquences différentes. L'inactivation de BAF augmente l'instabilité des microsatellites et le fardeau mutationnel permettant une sensibilisation des tumeurs à l'anti-PD-L1<sup>431</sup>; tandis que si PBAF est inactivé, une accessibilité accrue à la transcription des gènes inductibles par IFN $\gamma$  ainsi qu'un meilleur recrutement des TILs ont été démontrés<sup>432</sup>.

Également, l'augmentation de CD73 qui favorise l'épuisement des lymphocytes T contribue à la résistance aux ICIs<sup>433,434</sup>.

Le défaut d'activation de la voie IFN $\gamma$  a été identifié comme un mécanisme de résistance innée. Lorsque les lymphocytes T reconnaissent l'antigène tumoral, ils produisent de l'IFN $\gamma$  qui pourra se lier à ses récepteurs et activer la cascade de signalisation impliquant un grand

nombre de gènes qui ont, pour la plupart, des effets antitumoraux<sup>407,414</sup>. Néanmoins, l'IFN $\gamma$  permet également l'activation de la voie JAK1/2 (Janus Kinase) responsable de la régulation de PD-L1. Par conséquent, si cette voie est inactive, même si les lymphocytes T engendrent une réponse avec production d'IFN $\gamma$ , ceci ne conduira pas à une expression réactive de PD-L1. Par conséquent, ces patients sont considérés comme constitutivement négatifs pour PD-L1 et ne répondant pas aux ICI<sup>435,436</sup>. Ce défaut d'activation de la voie médiée par l'IFN $\gamma$  peut également réguler à la baisse l'expression de CXCL9 et CXCL10 nécessaire au trafic des lymphocytes T<sup>435</sup>.

Toutes ces études ont démontré l'implication de différentes voies de signalisation qui engendraient une résistance aux ICI. Dans cette optique, une étude a identifié un ensemble de gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse, dans l'angiogenèse et dans la cicatrisation des plaies appelé signature de résistance innée à l'anti-PD-1 « IPRES », est préférentiellement exprimé dans les cancers qui ne répondent pas à la thérapie tel que le mélanome métastatique ou le cancer du pancréas<sup>437</sup>.

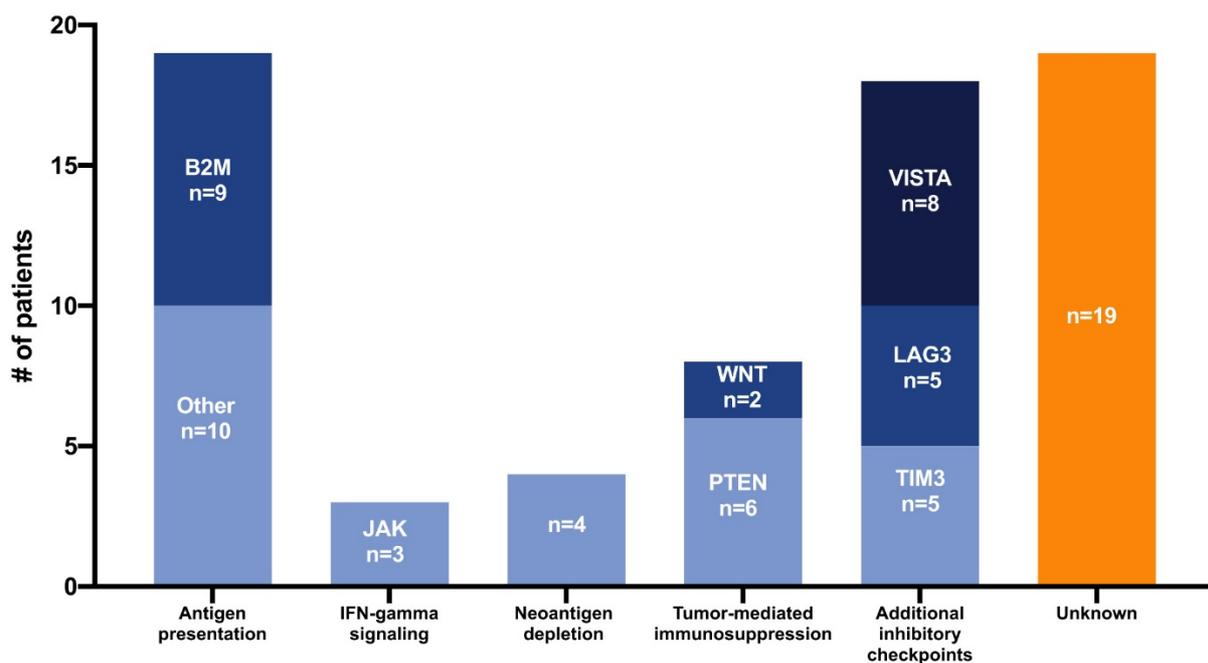
Tous ces processus, qui permettent la production d'un microenvironnement immunosuppresseur ou qui permettent à la cellule tumorale de ne pas être reconnue par le système immunitaire contribuent à une résistance primaire. Cependant, pour le moment, leurs processus de mise en œuvre restent mal connus. Le lien entre mécanisme déjà présent et ce qui supprime la thérapie est complexe à appréhender.

### c. Résistance Secondaire

La résistance secondaire ou acquise est définie par une progression de la maladie sous traitement après que le patient ait eu une réponse initiale prolongée supérieure à 6 mois<sup>415</sup>. L'utilisation croissante des ICI s'est accompagnée d'une augmentation du nombre de patients présentant ce type de résistance. Il a été observé qu'environ un quart voire un tiers des patients atteints de mélanome présentait une résistance secondaire<sup>438</sup>. Les mécanismes sous-

jacents sont étudiés depuis peu pour les ICIs. Ces mécanismes sont complexes à identifier : ils sont la conséquence du traitement contrairement à la résistance dite innée. Au cours du temps, les cellules tumorales et immunitaires présentes vont subir des changements phénotypiques et génétiques. Il est donc extrêmement compliqué d'identifier les mécanismes sous-jacents et de déterminer quand ceux-ci se mettront en place. Il est par contre important de signaler que des facteurs qui déterminent une résistance initiale sont également susceptibles de se mettre en place au cours de la thérapie pour entraîner l'apparition d'une évvasion immunitaire secondaire.

Entre autres, les données cliniques sur la résistance acquise aux ICIs sont peu documentées. Une récente publication a identifié 13 rapports cliniques qui regroupent au total seulement 58 patients ayant développé une résistance secondaire tous types de tumeurs confondus (Figure 35). Ce constat révèle bien que les hypothèses avancées sont pour le moment encore à vérifier et qu'elles sont finalement peu nombreuses.



**Figure 35. Nombre de cas cliniques par mécanismes de résistance acquise** (Schoenfeld et Hellmann, Cancer Cell, 2020)<sup>439</sup>. Histogramme empilé récapitulant le nombre de patients présentant le mécanisme de résistance, issus de différentes études scientifiques.

### i. Le concept d'*immunoediting*

Ce concept émane de la théorie des trois « E » précédemment décrit. En effet, il implique une première phase où la thérapie va permettre une élimination des cellules cancéreuses liée au fait que les cellules effectrices anti-tumorales ont été réactivées, une seconde phase d'équilibre où une sélection clonale des cellules tumorales va se mettre en place, pour permettre la troisième phase, l'échappement au système immunitaire malgré la présence de la thérapie.

L'un des mécanismes est en lien avec les néo-antigènes. L'analyse de tissus tumoraux avant et après traitement provenant de patients avec une résistance acquise a montré une élimination de 7 à 18 néo-antigènes. Ces néo-antigènes étaient en effet capables de provoquer l'expansion clonale de lymphocytes T<sup>440</sup>. Ceci suggérant bien que, suite à la thérapie, une pression de sélection s'était produite.

Ainsi que décrit précédemment, l'un des mécanismes d'échappement de la cellule tumorale au système immunitaire est la perte de fonction de la  $\beta$ 2-microglobuline, entraînant un défaut dans la machinerie de présentation d'antigène. Ceci peut provoquer une résistance primaire mais également secondaire. Des études ont démontré que cette perte d'expression est associée à une résistance acquise aux ICIs dans les cancers colorectaux, mélanome et de poumon<sup>421,422,441-443</sup>.

De façon similaire, les mutations JAK1/2 ont également été détectées chez des patients présentant une résistance secondaire. En effet, suite à un séquençage de l'exome entier de quatre patients, chez deux patients les mutations de JAK1/2 se sont révélées essentielles dans l'échappement de la tumeur à la thérapie<sup>441</sup>. Cependant, mise à part une étude récente qui a confirmé, suite à une manipulation génétique de JAK1/2 dans des lignées de mélanome, l'importance de cette voie dans la sensibilisation à l'anti-PD-1<sup>443</sup>, à notre connaissance, aucune autre étude n'a démontré l'implication de JAK1/2 dans la résistance acquise aux ICIs. Ce mécanisme de résistance acquise nécessite une exploration plus approfondie : entre autres, dans quelle mesure d'autres altérations génomiques de la voie IFN $\gamma$  peuvent-elles contribuer à la résistance aux ICIs, au-delà de JAK1/2 ?

## ii. Signalisation inhibitrice supplémentaire

Peu de recherches existent sur les facteurs extrinsèques conduisant à une résistance secondaire. Une étude a montré une augmentation de Treg dans le microenvironnement tumoral. L'analyse par RNAseq de ces cellules a révélé une surexpression des voies d'activation du TGF $\beta$  et de l'IL-10. Une augmentation des MDSCs exprimant PD-L1 et galectin-9 a également été détectée chez des patients ayant une résistance secondaire<sup>420</sup>.

Au-delà de l'augmentation d'une sous-population immunitaire particulière, d'autres publications se sont intéressées aux autres voies inhibitrices des points de contrôle immunitaire précédemment cités. Des études précliniques et cliniques ont notamment montré une régulation positive de TIM3 induisant une résistance secondaire aux ICI<sup>30,444</sup>. Johnson et al. ont aussi démontré que l'expression de CMH II par les cellules tumorales pouvait caractériser un sous-ensemble capable d'entraîner un mécanisme d'échappement *via* une pression de sélection des lymphocytes infiltrant les tumeurs qui expriment des ligands alternatifs LAG3 et FCRL6<sup>445</sup>. Un autre point de contrôle inhibiteur VISTA a parallèlement été identifié comme soutenant un mécanisme de résistance acquise chez des patients atteints de mélanome et traités à l'anti-PD1<sup>446</sup>.

D'autres publications ont montré une augmentation du rapport kynurénine/tryptophane ou de CD73, chez des patients avec une résistance acquise<sup>433,447</sup>. Ceci suggère un mécanisme de résistance en lien avec une altération métabolique.

## iii. Epuisement secondaire des lymphocytes T

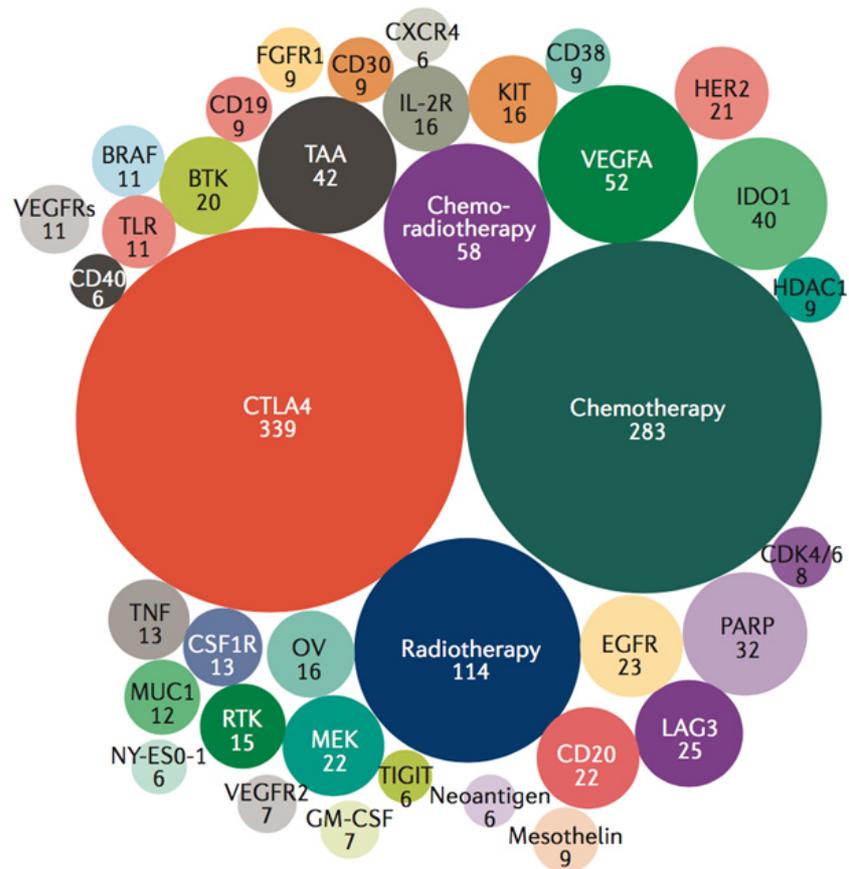
Comme nous l'avons expliqué ci-dessus, un groupe de cellules T effectrices se transforme de façon physiologique en cellules mémoires. Ceci implique que lorsque ces cellules rencontrent de nouveaux antigènes tumoraux elles pourront être réactivées. Les lymphocytes Tem sont augmentés chez les patients qui répondent aux ICI. Cependant, si le niveau élevé d'antigènes tumoraux se maintient et que les cellules T, réactivées par le blocage PD-1/PD-L1, ne parviennent pas à devenir des cellules T mémoires, la durabilité de la réponse sera limitée<sup>448-</sup>

<sup>450</sup>. Pauken et al. ont montré que l'anti-PD-1 réactive aussi les cellules T<sub>H</sub> CD8<sup>+</sup> et que celles-ci sont incapables de se différencier en cellules mémoires du fait d'un programme épigénétique distinct<sup>451</sup>.

#### D. Contourner les résistances

Toutes ces données révèlent que peu de choses sont connues sur les mécanismes sous-jacents impliqués dans la résistance innée mais surtout acquise aux immunothérapies anti-PD-1 et anti-PD-L1. L'une des explications est la difficulté à obtenir des échantillons appariés de patients avant et après résistance. Au-delà de cette compréhension, beaucoup d'équipes se sont intéressées, non pas à savoir quel mécanisme précis était responsable, mais plutôt quelles combinaisons seraient capables de l'inverser.

Augmenter l'efficacité et le taux de réponse des ICI est aujourd'hui un enjeu majeur. Aussi, le nombre d'essais cliniques de combinaison de traitements s'est considérablement développé (Figure 36). A titre d'exemple, en mars 2020, la FDA a approuvé la combinaison de nivolumab avec ipilimumab pour le traitement des carcinomes hépatocellulaires avancés.



**Figure 36. Nombre d'essais cliniques associés avec les 38 plus prometteuses cibles aux anti-PD-1 ou anti-PD-L1 (Tang, J. et al., Nature Review Drug Discovery, 2018)<sup>452</sup>. Au centre du cercle le nombre d'essais cliniques impliquant la thérapie indiquée.**

## Chapitre II. Résultats

### Caractérisation de modèles tumoraux syngéniques de souris détenant une résistance acquise aux anti-PD-1/PD-L1.

#### 1. Introduction

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, les ICI ont révolutionné la prise en charge de certains patients atteints de cancers. Cependant, les résistances qui surviennent suite à l'administration de ces traitements sont nombreuses. Permettre une augmentation de l'efficacité des traitements chez les patients qui ne répondent pas ou plus, est ainsi aujourd'hui un enjeu majeur. Afin de permettre une meilleure prise en charge, comprendre quels mécanismes sont impliqués est crucial. Les résistances de type « innées » peuvent être plus facilement étudiées grâce notamment aux modèles tumoraux murins insensibles aux traitements, mimant ainsi la réponse observée chez certains patients. *A contrario*, l'étude des résistances de type « acquises » est encore aujourd'hui un *challenge*.

La première partie de ce travail, que j'ai effectué durant mon stage de master 2, a été de développer des modèles tumoraux pré-cliniques robustes détenant une sensibilité partielle aux anti-PD-1/PD-L1. L'objectif de ces développements a été de tester des combinaisons thérapeutiques, dans le but de proposer une alternative plus efficace aux patients.

Dans cette optique, après une première sélection de 20 lignées cellulaires, la tumorigenèse de celles-ci s'est avérée effective dans 14 d'entre elles. Nous avons testé leurs sensibilités aux anti-PD-1 ou anti-PD-L1 : 8 modèles se sont révélés partiellement sensibles.

A partir de ce premier travail, Chloé Grasselly (ancienne doctorante du laboratoire) et moi-même avons testé des combinaisons de traitements avec des chimiothérapies conventionnelles et caractérisé le microenvironnement ainsi généré sur les modèles partiellement sensibles. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans *Frontiers in Immunology* en 2018 (Annexe 2).

Les travaux de ma thèse se sont inscrits dans la continuité de ces résultats. En effet, la deuxième partie de ce travail a été de développer des modèles tumoraux pré-cliniques mimant une résistance acquise aux ICIs, à partir des modèles tumoraux pré-cliniques précédents partiellement sensible. L'objectif de ce développement a été d'avoir à notre portée un outil simple pour évaluer de nouvelles combinaisons thérapeutiques transposable aux patients réfractaires, ainsi que générer de nouvelles hypothèses mécanistiques afin de comprendre comment la résistance aux ICIs se met en place. Nous sommes donc partis des modèles partiellement sensibles précédemment cités. Dans l'idée où chaque type de cancers aura potentiellement un mécanisme de résistance différent, il nous a semblé important de générer plusieurs types tumoraux avec une résistance acquise à savoir : MC38, un modèle colorectal ; MB49 et MBT2, des modèles de vessies ; RENCA, un modèle rénal ; et TyrNras, un modèle de mélanome. La création de cette résistance s'est effectuée par implantation en série. Une fois que la tumeur a atteint son volume éthique et après traitement par les ICIs, la tumeur est prélevée et réimplantée dans une souris naïve. Celle-ci est de nouveau traitée aux ICIs, puis réimplantée dans une souris naïve une fois le volume éthique atteint. Ces implantations en série, sous pression de sélection aux ICIs, nous ont permis d'obtenir, à force de passages, une résistance complète aux ICIs que nous avons qualifié d'acquise.

Notre approche, pour cette publication, s'est voulue descriptive, avec des analyses immunologiques et moléculaires.

Pour ce faire, nous avons développé un panel d'immunophénotypage de 29 marqueurs permettant une analyse approfondie du microenvironnement tumoral immunitaire à l'état basal. Cette première technique nous a permis de comparer les modèles sauvages (Wild type : WT) partiellement sensibles et les modèles résistants aux ICIs, en termes de changement de proportion et d'activation des cellules immunitaires présentes au sein des tumeurs.

La deuxième approche que nous avons choisie a été un génotypage par RNAseq de nos modèles à l'état basal. Nous avons comparé quelles voies pouvaient être altérées et quels gènes étaient préférentiellement inhibés ou surexprimés en fonction des modèles.

L'objectif ultime de cette étude étant, bien évidemment, de pouvoir proposer aux patients des alternatives thérapeutiques, nous avons testé, dans un troisième volet, des combinaisons

de traitement afin de contourner la résistance induite aux anti-PD-1/PD-L1. De ces combinaisons, certaines semblent très prometteuses, en particulier, anti-TNF $\alpha$  et anti-CD47 ou encore aLy6G qui, en combinaison avec anti-PD-1, ont permis chez certaines souris une rémission complète suite à l'implantation du modèle MC38 aPD-1-R, connu pour être très agressif.

Ces modèles permettent de fournir une nouvelle approche innovante pour comprendre ce mécanisme complexe de résistance acquise aux anti-PD-1/PD-L1 et de tester de nouvelles combinaisons thérapeutiques.

Cet article est en cours de révision dans le journal *Cancer immunology research*.

## 2. Article

### **INNOVATIVE IN VIVO SYNGENEIC TUMOR MODELS WITH ACQUIRED RESISTANCE TO THERAPIES TARGETING THE PD-1/PD-L1 AXIS**

#### **Authors**

Morgane Denis<sup>1, 2\*</sup>, Chloé Grasselly<sup>1, 2\*</sup>, Pierre-Antoine Choffour<sup>2</sup>, Anne Wierinckx<sup>1</sup>, Doriane Mathé<sup>2</sup>, Kamel Chettab<sup>1</sup>, Anne Tourette<sup>2</sup>, Nolan Talhi<sup>2</sup>, Aurore Bourguignon<sup>1, 2</sup>, Fabian Birzele<sup>5</sup>, Elsa Kress<sup>2</sup>, Lars Petter Jordheim<sup>1</sup>, Christian Klein<sup>4</sup>, Eva-Laure Matera<sup>1</sup>, Charles Dumontet<sup>1, 3</sup>

#### **Keywords:**

Preclinical models, Drug resistance, Immune checkpoint inhibitor, PD-1, PD-L1, MC38, MB49, MBT2, TyrNras, RENCA.

#### **Authors' information**

<sup>1</sup>Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, 69008, France, <sup>2</sup>Antineo, Lyon, France, <sup>3</sup>Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, <sup>4</sup>Roche Pharma Research & Early Development, Roche Innovation Center Zurich, Schlieren, Switzerland, <sup>5</sup>Roche Pharma Research & Early Development, Pharmaceutical Sciences, Roche Innovation Center Basel, Basel, Switzerland.

\*Contributed equally

#### **Corresponding Author**

[charles.dumontet@chu-lyon.fr](mailto:charles.dumontet@chu-lyon.fr)

Pr. Charles Dumontet

CRCL, INSERM U1052-CNRS UMR 5286

8 avenue Rockefeller, 69008, Lyon, France.

## **Abstract**

Immune checkpoint inhibitors, such as antibodies directed against PD-1 and PD-L1, have been shown to produce durable responses in a subset of patients. However, many patients either are refractory or ultimately relapse due to acquired resistance mechanisms. As the underlying mechanisms of this secondary resistance are not well understood, we developed five syngeneic murine tumor models to characterize *in vivo* variants with acquired resistance to PD-1 and/or PD-L1 antibodies. Resistant *in vivo* models were obtained by serial treatment/reimplantation cycles in immunocompetent mice bearing MC38, MB49, MBT2, TyrNRas or RENCA tumors. Spectral cytometry was applied to characterize modifications in the tumor immune microenvironment. RNAseq analyses were performed to identify differences in expression profiles between sensitive parental models and their resistant counterparts. Alterations in the tumor immune microenvironment were highly heterogeneous amongst resistant models, and are thus representative of the diversity expected in patients. Each resistant model displayed multiple modifications in the tumor immune infiltrate in comparison to the wild type model, involving selected lymphoid and/or myeloid subpopulations. Gene profiling analyses demonstrated the variability associated with acquisition of a resistance phenotype. Alterations of previously identified pathways were observed in some models while other genes appeared to be highly deregulated in several models. Several therapeutic combinations, in particular targeting alternative immune checkpoints, were found to reverse the resistance phenotype in selected models. Acquired *in vivo* resistant models displayed strong diversity, both in terms of alterations of the tumor immune microenvironment and tumor gene expression profile.

## Introduction

Immune checkpoint inhibitors (ICIs) directed against Programmed Death 1 (PD-1) and Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) have shown impressive clinical efficacy in a wide range of cancer types. Several monoclonal antibodies (mAbs) have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of patients with various indications including melanoma, non-small cell lung cancer (NSCLC), Hodgkin's disease, bladder cancer, prostate carcinoma and renal cell carcinoma (1–9). The mode of action of PD-1 (aPD-1) and PD-L1 (aPD-L1) monoclonal antibodies (mAbs) results in the restoration of T cell anti-tumor functions (10). However, a large proportion of patients demonstrates *de novo* resistance to these therapies, or relapse after a primary response.

Mechanisms of resistance to ICIs remain poorly understood. Mutations in human melanomas inducing  $\beta$ -catenin activation have been linked to primary resistance to aPD-L1 and anti-CTLA-4 treatment correlated with T-cell evasion (11). Moreover, some mechanisms of acquired resistance to aPD-1 therapy have been identified, such as mutations in  $\beta$ 2 microglobulin causing inefficient antigen presentation by HLA class 1, while mutations of Janus kinase 1 and Janus kinase 2 genes, causing a loss of interferon response, have been associated with acquired resistance in patients with melanoma (12). Furthermore, a preclinical model of acquired resistance to aPD-1 blockade, using a genetically engineered mouse model of lung cancer, showed an upregulation of the alternative immune checkpoint T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM-3) in infiltrating T cells (13). In clinical samples, a correlation between increased expression of inhibitory immune checkpoints and progression has also been demonstrated in patients with lung cancer (14). Overall, these data suggest that the underlying mechanisms of innate and acquired resistance are likely to be multifactorial and remain largely undetermined. A recent review identified three main causes to explain why it is so challenging to study acquired resistance mechanisms: the absence of uniform terminology, the difficulty to obtain tumor patient samples and a powerful tool to study mechanisms (15). The establishment of robust *in vivo* variants derived from sensitive models is a promising means to decipher the mechanisms of acquired resistance to immune checkpoint antibodies as they allow comparison with their sensitive parental counterparts.

The mechanistic hypotheses generated from such models can subsequently be validated in the clinical setting. Moreover, these models are powerful tools to evaluate new treatments or therapeutic combinations for patients with acquired resistance to PD-1/PD-L1 antibodies.

In this study we used immunocompetent mouse models to analyze diverse types of syngeneic mouse tumors (colorectal, bladder, melanoma and renal cancers) chosen for their initial sensitivity to aPD-1/ aPD-L1 axis blockade, and developed *in vivo* resistant models. Since acquired resistance is defined by the emergence of reduced sensitivity to therapy after an initial response to this same agent, we decided to compare the characteristics of the resistant models at basal state to those of the corresponding sensitive models, focusing on the differences in immune cell infiltrates. We also performed gene expression profiling of sensitive and resistant models in an effort to identify pathways and genes of interest with an altered expression in resistant tumors. We also used these resistant models to evaluate potential therapeutic combinations designed to revert resistance to ICIs.

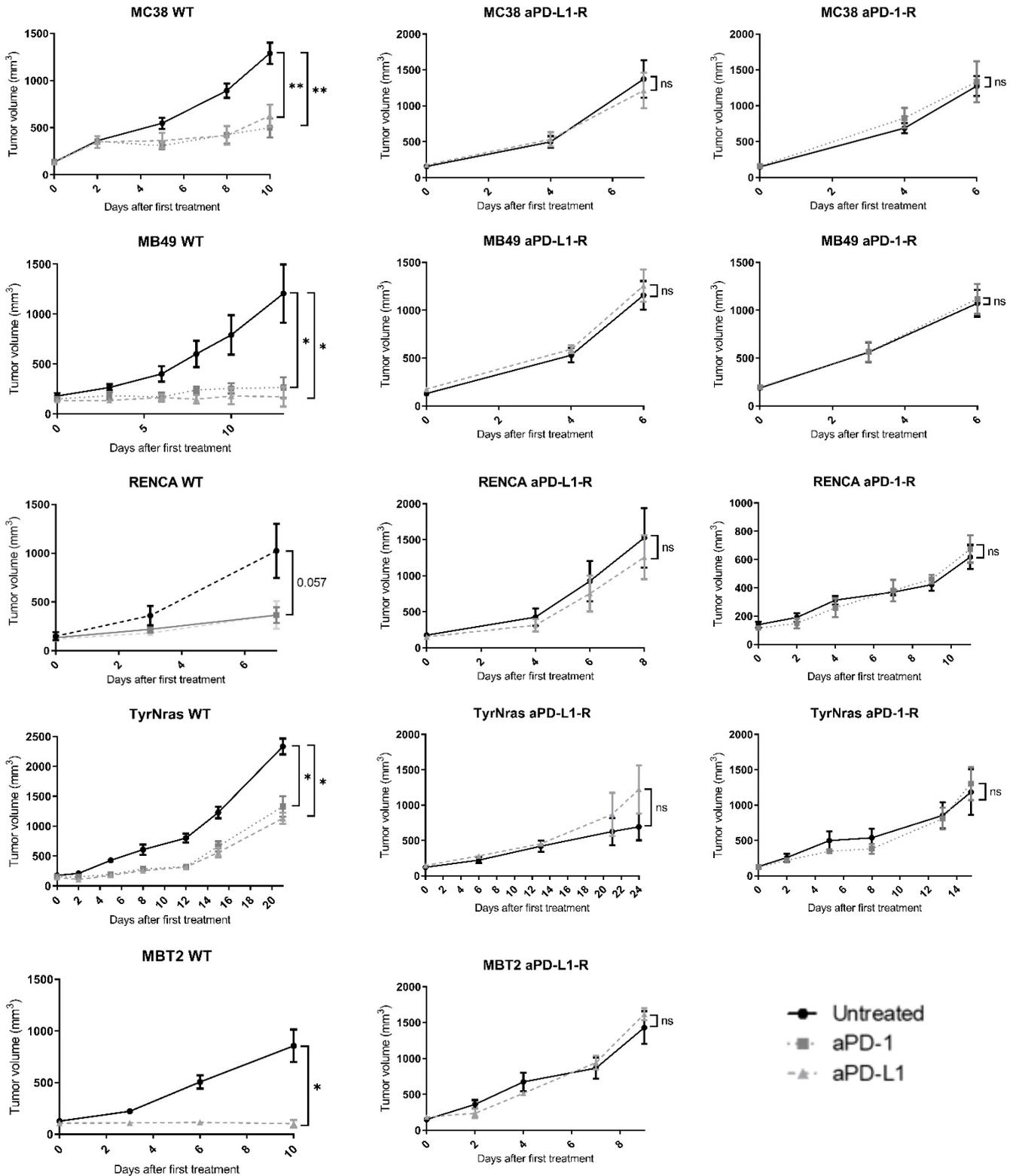
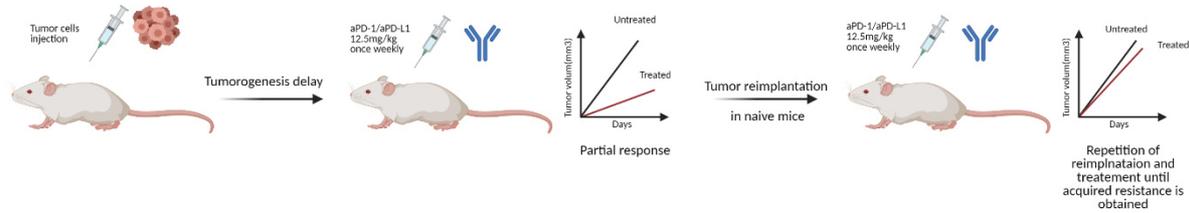
## **Results**

### **Development of models with *in vivo* resistance to aPD-1 and aPD-L1 mAbs**

In a first step, we identified five models, which were robustly sensitive to treatment with PD-1 and/or PD-L1 mAbs. The treatment regimens used induced partial response in all of these models and consisted in aPD-1 or aPD-L1, 12.5 mg/kg, initiated when tumor volume reached 200 mm<sup>3</sup>, administered intraperitoneally once weekly. We established nine resistant models, five selected with PD-L1 mAb and four with PD-1 mAb. As shown in Figure 1, these models obtained after five serial implantations and exposure to antibodies had become resistant to the selecting agent (Fig 1A). The models included the colorectal cancer MC38 model (Fig. 1B and Additional file 4: Figure S1A), two bladder cancer models MB49 (Fig. 1C and Additional file 4: Figure S1B) and MBT-2 (Fig. 1F and Additional file 4: Figure S1C), the renal cell carcinoma RENCA (Fig. 1D and Additional file 4: Figure S1D) and a melanoma TyrNras models (Fig. 1E and Additional file 4: Figure S1E). All WT models were

sensitive to both aPD-1 and aPD-L1 blockade, except for MBT-2 which was sensitive to aPD-1 blockade only.

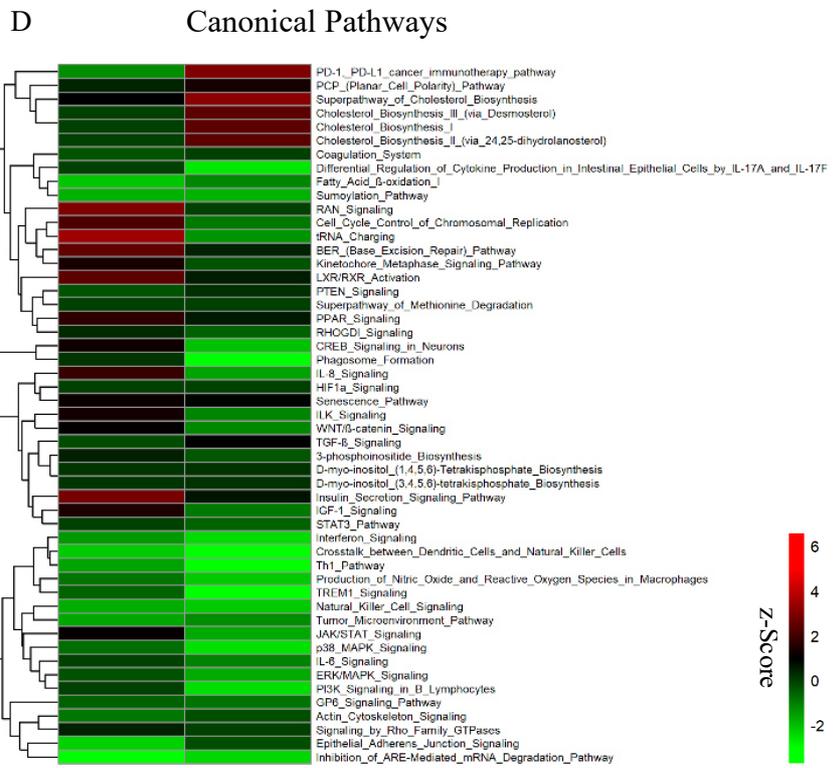
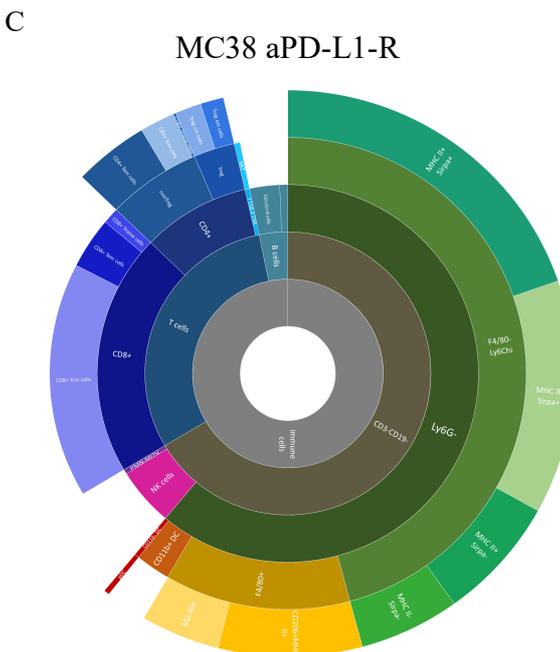
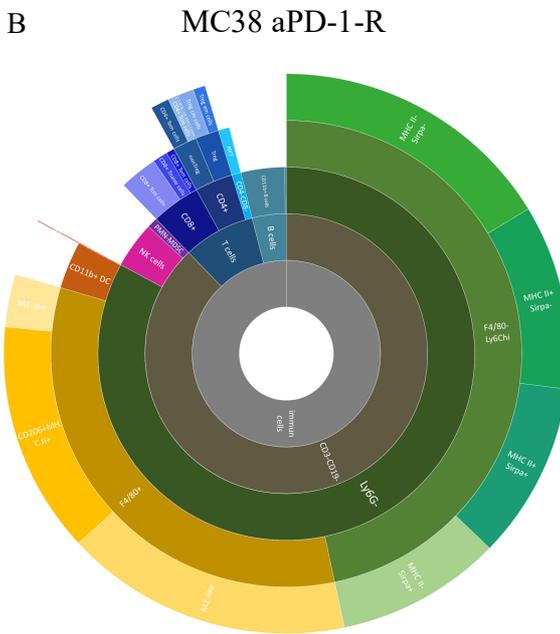
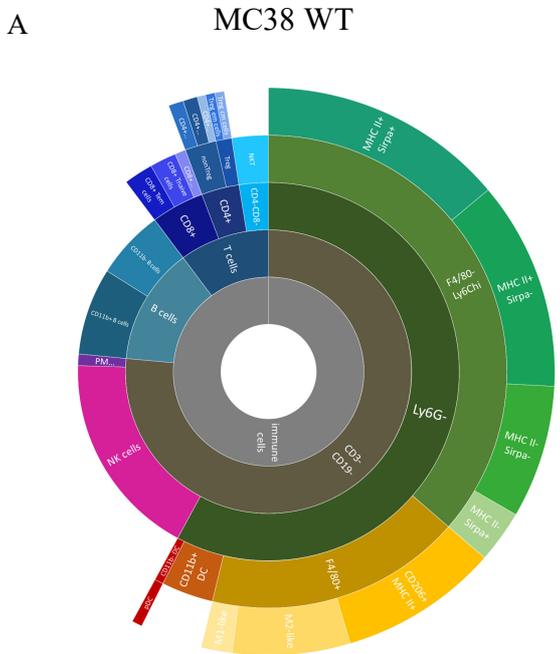
Once these models established, we evaluated their cross-resistance to the other ICI inhibitor targeting the aPD-1/aPD-L1 interaction, *i.e.* aPD-1 mAb in aPD-L1-R models and aPD-L1 treatment in aPD-1-R models. Interestingly, we showed a complete or partial cross-resistance in some models, suggesting that the resistance phenotype was not limited to the antibody used for the selection of resistant models, but to PD-1/PD-L1 checkpoint inhibition (Additional file 5: Figure S2).



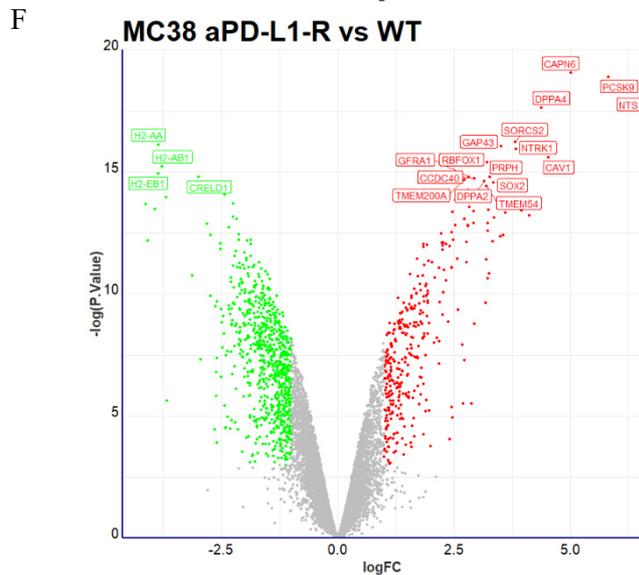
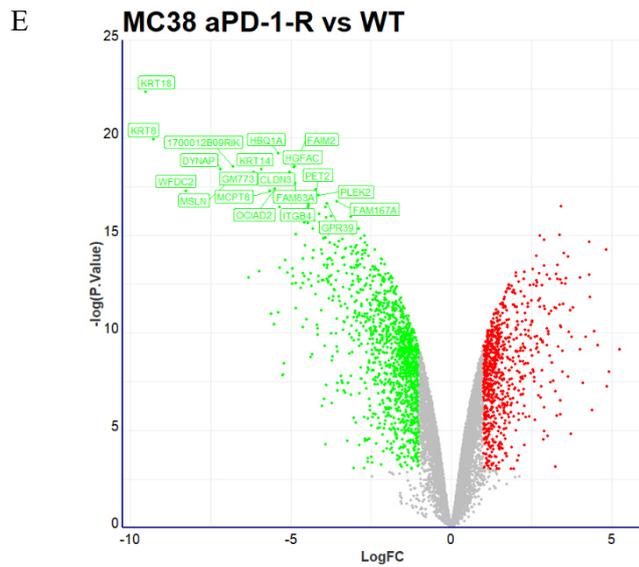
**Figure 1. Wild type sensitive models were rendered resistant *in vivo* to aPD-1 and/or aPD-L1.** (A) Tumor cell lines were injected in mice to establish the resistant models. For all models when tumors reached 150 mm<sup>3</sup>, mice were randomized and treated with aPD-1 (BioXCell, 12.5 mg/kg per week) or aPD-L1 (BioXCell, 12.5 mg/kg per week). Tumor cell lines initially responding to aPD-or aPD-L1, were serially implanted subcutaneously into new groups of naive mice and treated once a week to maintain selection pressure. At least five passages were necessary to induce acquired resistance. (B) MC38, colorectal cancer. (C) MB49, bladder cancer. (D) RENCA, kidney cancer. (E) TyrNras, melanoma cancer. (F) MBT2, bladder cancer. Data shown are mean tumor volume values and error bars are  $\pm$  SEM. n=4 or 6 mice/group, ns, not significant; \*: p<0.05 and \*\*: p<0.01, using Mann Whitney t-test.

### **Characterization of syngeneic MC38 acquired resistance models**

The immune infiltrate of MC38 WT at basal state contains a majority of CD11b<sup>+</sup> cells and an equivalent proportion of B cells, T cells, and NK cells, in accordance with other publications (21). In the MC38 aPD-1-R model, we observed that Tumor Associated Macrophages (TAMs), particularly M2-like and M-MDSC were significantly up-regulated, while in the MC38 aPD-L1-R model T cells were up regulated, representing up to 20% of CD45<sup>+</sup> cells with an increased content of Treg cells. Moreover, both resistant models showed an increase in CD8<sup>+</sup> Central Memory (Tcm) cells, suggesting that ICP therapies were unable to activate these cells properly. Conversely, NK, NKT and B cell contents were decreased in both resistant models in comparison with the WT model. Examination of the PMN-MDSC population revealed an increased infiltration in the MC38 aPD-1-R model (Fig 2 and additional file 6: Figure S3). These data suggest that the MC38 aPD-1-R and MC38 aPD-L1-R model differ in terms of immune infiltrates. In gene expression profiling analyses, the MC38 resistant models displayed the highest level of alterations in canonical pathways among all the models which we developed. Classical pathways such as HIF1 $\alpha$  or TGF $\beta$  were found to be up regulated, in accordance with an aggressive pattern. The analysis of these models suggests that we may have a “hot” tumor profile and supposes that it is a good model for testing immune combination therapies for reverse resistance.



aPD-1-R aPD-L1-R



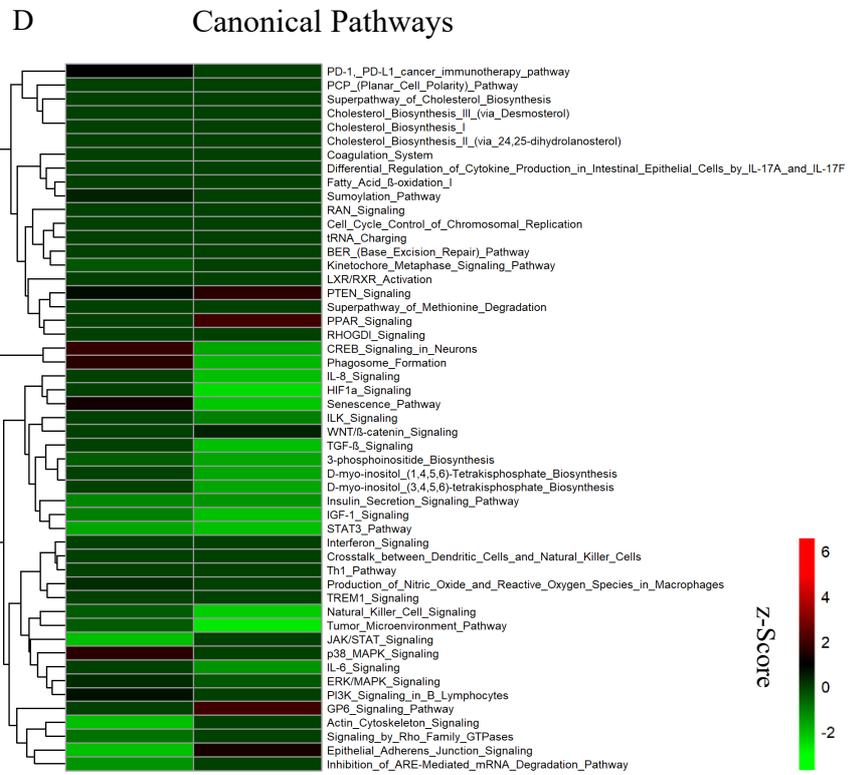
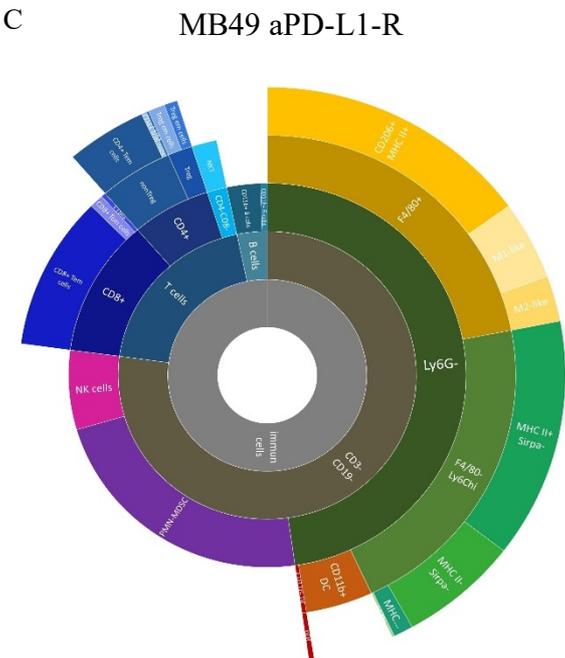
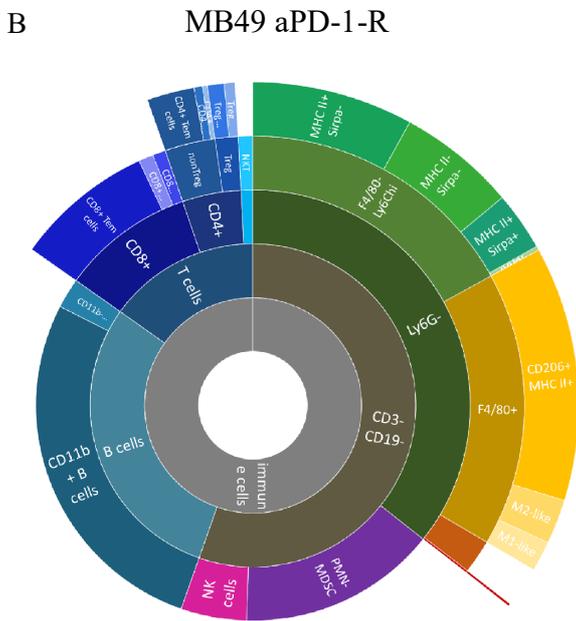
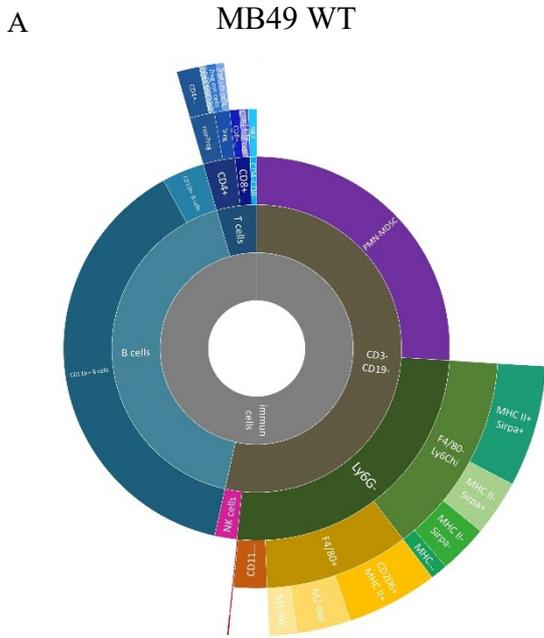
l21

CD4+ Tem cells	CD4+ Tcm cells	CD4+ Tnaive cells	Treg cm cells	Treg em cells	CD8+ Tem cells	CD8+ Tcm cells	CD8+ Tnaive cells	CD11b+ B cells	CD11b- B cells	NKT	NK cells	PMN-MDSC	CD11b+ DC	pDC	F4/80+ Ly6C <sup>hi</sup> CD206+ MHC II <sup>+</sup>	F4/80+ M1-like	F4/80+ M2-like	F4/80- Ly6C <sup>hi</sup> MHC II- Sirpa <sup>+</sup>	F4/80- Ly6C <sup>hi</sup> MHC II+ Sirpa <sup>+</sup>	F4/80- Ly6C <sup>hi</sup> MHC II+ Sirpa <sup>-</sup>	F4/80- Ly6C <sup>hi</sup> MHC II- Sirpa <sup>-</sup>

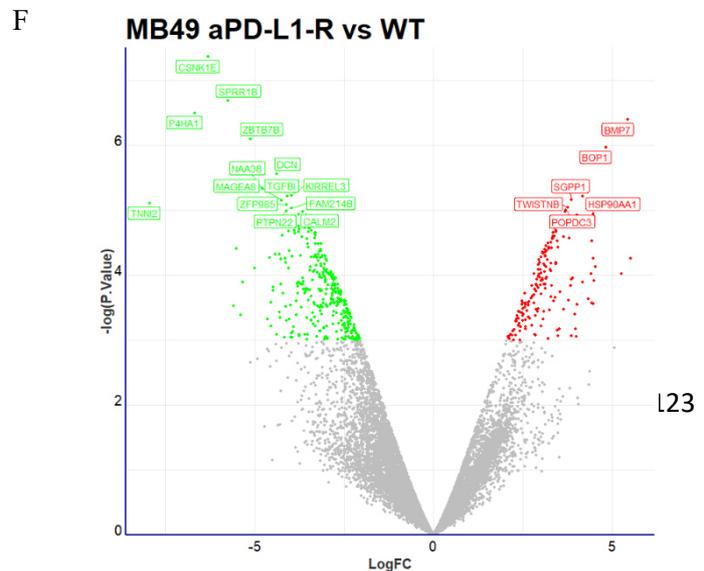
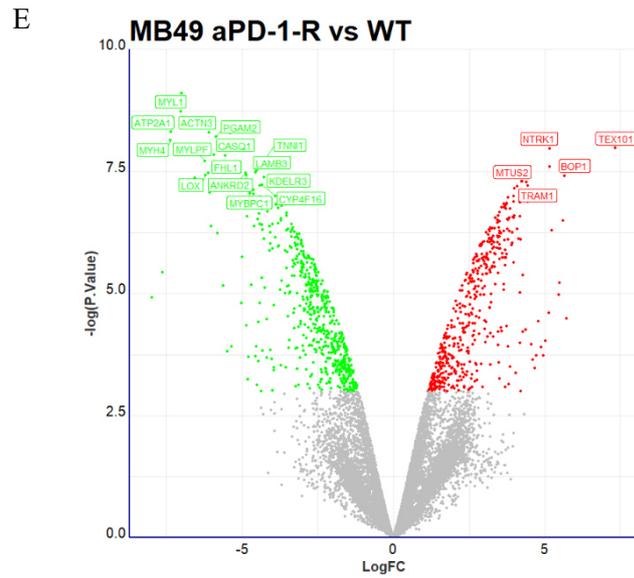
**Figure 2. Changes in tumor immune infiltrate and gene expression profiling in MC38 aPD-1-R and aPD-L1-R models.** For all models, tumor pieces were implanted in naïve mice and when tumors reached 200 mm<sup>3</sup> tumors, flow cytometry analysis and RNAseq were performed. (A, B and C) Sunburst plots showing the proportion of CD45<sup>+</sup> immune infiltration in MC38 WT, aPD-1-R and aPD-L1-R respectively. Flow cytometry data is n=5 for tumors. Sunburst plots represent a pool of samples. (D) Heat map displaying the prediction of deregulated pathways due to the acquisition of aPD-1 or aPD-L1 resistance (pheatmap package for R version 1.0.12). Canonical pathways were filtered to those that had at least 1.5-fold z-score change and significant pvalue<0.05. The top five up and down regulated pathways for each model were selected and group. At least 51 pathways were significantly modulated (IPA, Qiagen). (E) Volcano plot of top differentially gene expression in aPD-1-R models. (F) Volcano plot of top differentially gene expression in aPD-L1-R models. Volcano plots were generated with ggplot2 package for R version 2\_3.3.5.

### **Characterization of syngeneic MB49 acquired resistance models**

The immune infiltrate of the MB49 WT model comprised two main populations, represented by PMN-MDSC and CD11b<sup>+</sup> B cells (22% and 35% respectively) (Fig 3A). Interestingly, PMN-MDSC were more markedly increased in the MB49 aPD1-R model than in the aPD-L1-R model while B cells were more markedly decreased in the MB49 aPD-L1-R model than in the aPD-1-R model. In the resistant models, analysis of CD11b<sup>+</sup> cells revealed an increase of the proportion of CD206<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup> macrophages and M-MDSC, which are expected to promote tumor growth. In both resistant models, the CD3<sup>+</sup>T cell content was increased, corresponding to CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> T cells with an effector memory phenotype (Fig 3B and 3C). Moreover, pDC were significantly increased in the MB49 aPD-L1-R model, which may correlate with Treg up regulation (Additional file 7: Figure S4)(22). As opposed to the MC38 variants described above, these data show similar alterations in the immune infiltrates of the two MB49 resistant models, in particular for macrophages and M-MDSC, suggesting that these models would be well adapted to evaluate therapies targeting myeloid cells. Concerning the alterations of gene expression in canonical pathways, only a limited number were found to be up- or down-regulated, suggesting that these models have not undergone significant genetic modifications. Moreover, the profiles are very similar in both aPD-1-R and aPD-L1- R models. For instance, WTN/ $\beta$  catenin signaling was up-regulated in both models, an alteration which was recently associated with aPD-1 resistance correlated with PMN-MDSC accumulation, as observed in our models (Fig3D, 3E, 3F) (23).



aPD-1-R aPD-L1-R



L23

CD4+ Tem cells	CD4+ Tcm cells	CD4+ Tnaive cells	Treg cm cells	Treg em cells	CD8+ Tem cells	CD8+ Tcm cells	CD8+ Tnaive cells	CD11b+ B cells	CD11b- B cells	NKT	NK cells	PMN-MDSC	CD11b+ DC	pDC	F4/80+ CD206+ MHC II+	F4/80+ M1-like	F4/80+ M2-like	F4/80- Ly6C <sup>hi</sup> MHC II- Sirpa+	F4/80- Ly6C <sup>hi</sup> MHC II+ Sirpa+	F4/80- Ly6C <sup>hi</sup> MHC II+ Sirpa-	F4/80- Ly6C <sup>hi</sup> MHC II- Sirpa-
Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green

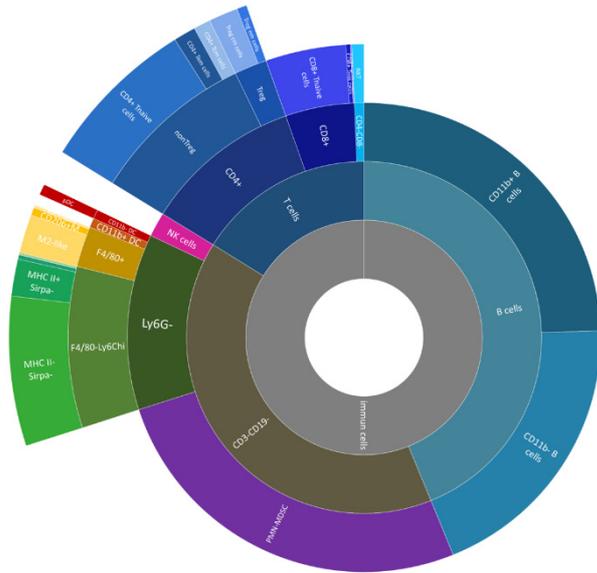
**Figure 3. Changes in tumor immune infiltrate and gene expression profiling in MB49 aPD-1-R and aPD-L1-R models.** For all models, tumor pieces were implanted in naïve mice and when tumors reached 200 mm<sup>3</sup> tumors, flow cytometry analysis and RNAseq were performed. (A, B and C) Sunburst plots showing the proportion of CD45<sup>+</sup> immune infiltration in MB49 WT, aPD-1-R and aPD-L1-R respectively. Flow cytometry data is n=5 for tumors. Sunburst plots represent a pool of samples. (D) Heat map displaying the prediction of deregulated pathways due to the acquisition of aPD-1 or aPD-L1 resistance (pheatmap package for R version 1.0.12). Canonical pathways were filtered to those that had at least 1.5-fold z-score change and significant pvalue<0.05. The top five up and down regulated pathways for each model were selected and group. At least 51 pathways were significantly modulated (IPA, Qiagen). (E) Volcano plot of top differentially gene expression in aPD-1-R models. (F) Volcano plot of top differentially gene expression in aPD-L1-R models. Volcano plots were generated with ggplot2 package for R version 2\_3.3.5.

### **Characterization of syngeneic MBT-2 acquired resistance models**

The MBT-2 model displayed innate resistance to aPD1 antibodies, explaining why we only developed an aPD-L1 resistant variant for this model. As in the case of the other bladder cancer model MB49 WT, two main immune populations were represented in MBT-2 WT tumors, namely PMN-MDSC and CD11b<sup>+</sup> B cells (20% and 33%, respectively) (Fig 4A). Additionally, B cells were strongly decreased in the aPD-L1-R MBT-2 variant, similarly to what we had observed in the aPD-L1-R MB49 model. Detailed analysis of CD11b<sup>+</sup> cells revealed a significantly increase of pro-tumoral immune cells, such as M2-like macrophages and M-MDSC, while T cells were decreased with residual T cells consisting almost only of Treg. (Fig 4B and Additional file 10: FigureS5). Consistent with the MB49 models described above, this model could also be used to evaluate myeloid-targeted therapies. However, the analysis of canonical pathways is completely different in comparison of MB49 aPD-L1-R models. Many signaling pathways were found to be up-regulated, such as HIF1 $\alpha$ , TGF $\beta$ , and ERK/MAPK signaling. These pathways may explain the preferential recruitment of M-MDSC in the immune infiltrate and resistance to aPD-L1 therapy (Fig 4C, 4D) (24–26).

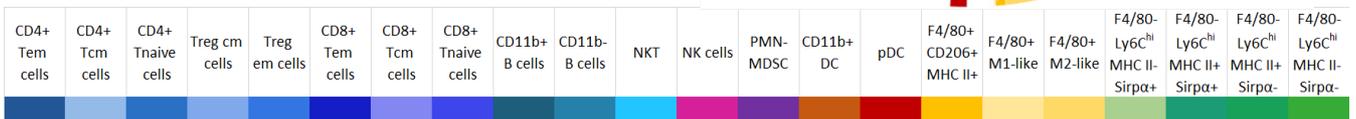
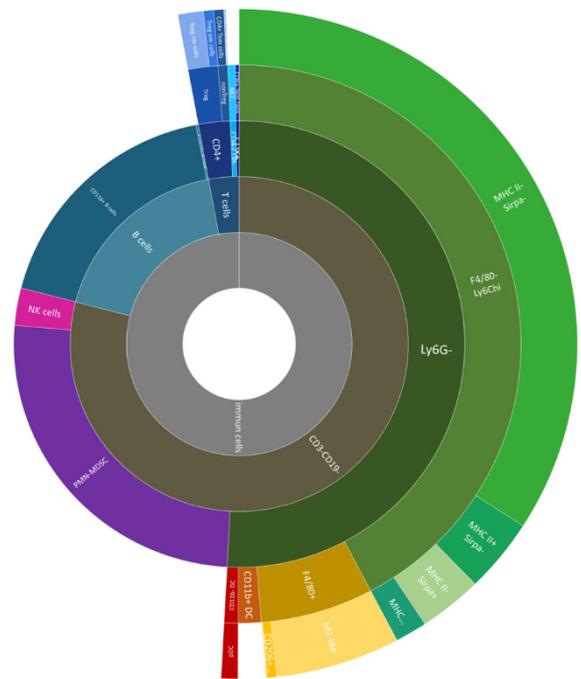
A

MBT2 WT



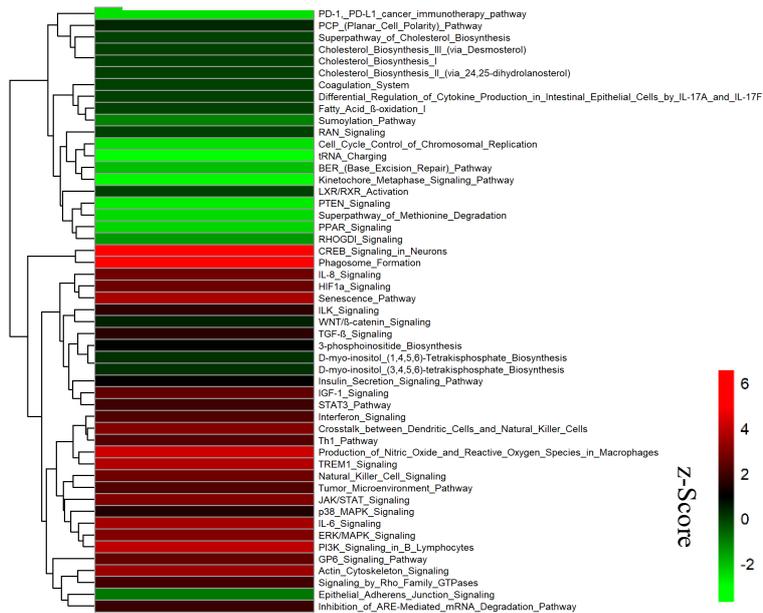
B

MBT2 aPD-L1-R



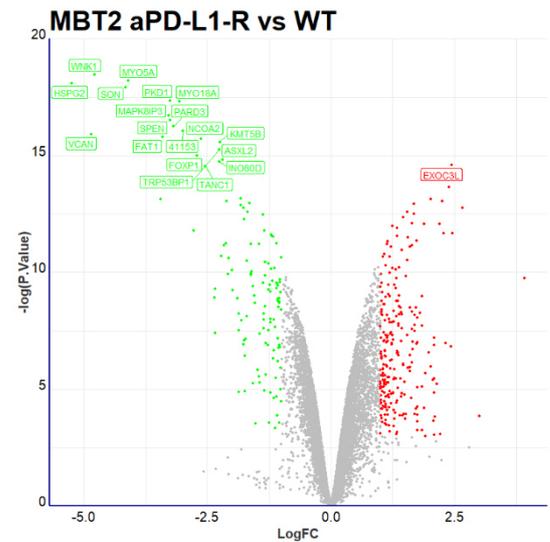
C

Canonical Pathways



aPD-L1-R

D

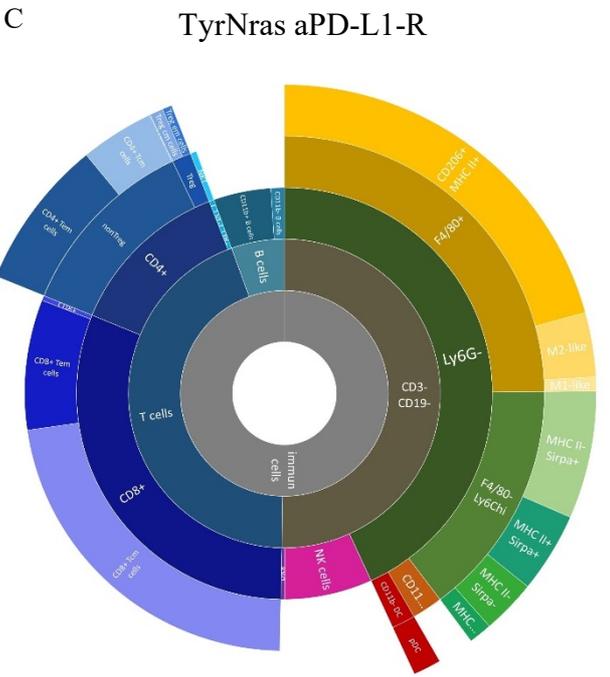
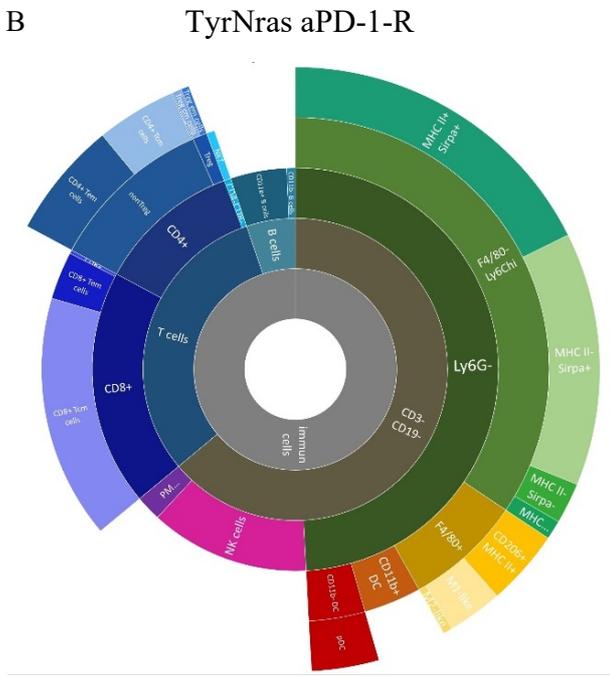
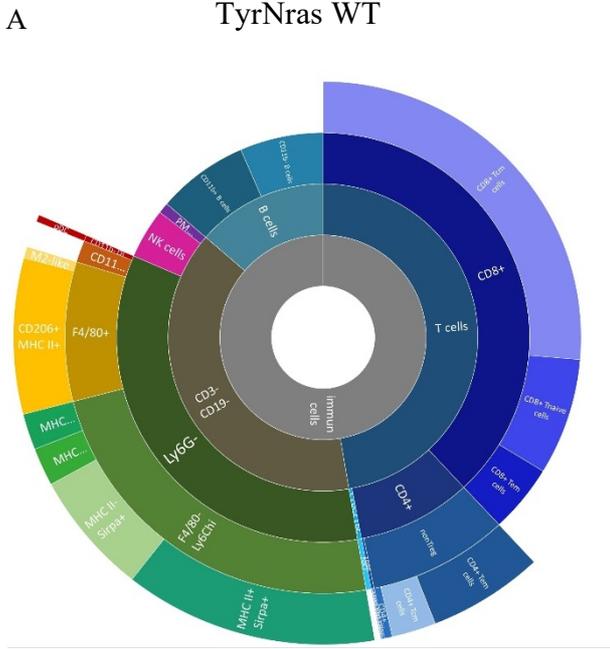


**Figure 4. Changes in tumor immune infiltrate and gene expression profiling in MBT2 aPD-L1-R models.** For all models, tumor pieces were implanted in naive mice and when tumors reached 200 mm<sup>3</sup> tumors, flow cytometry analysis and RNAseq were performed. (A and B) Sunburst plots showing the proportion of CD45<sup>+</sup> immune infiltration in MBT2 WT and aPD-L1-R respectively. Flow cytometry data is n=5 for tumors. Sunburst plots represent a pool of

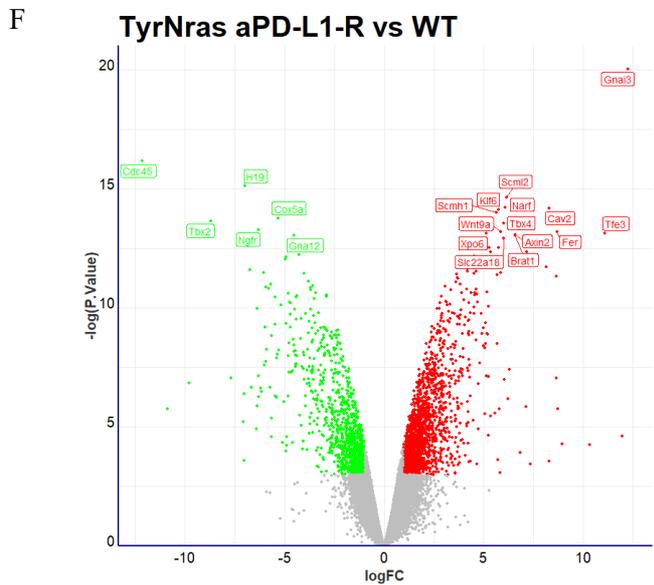
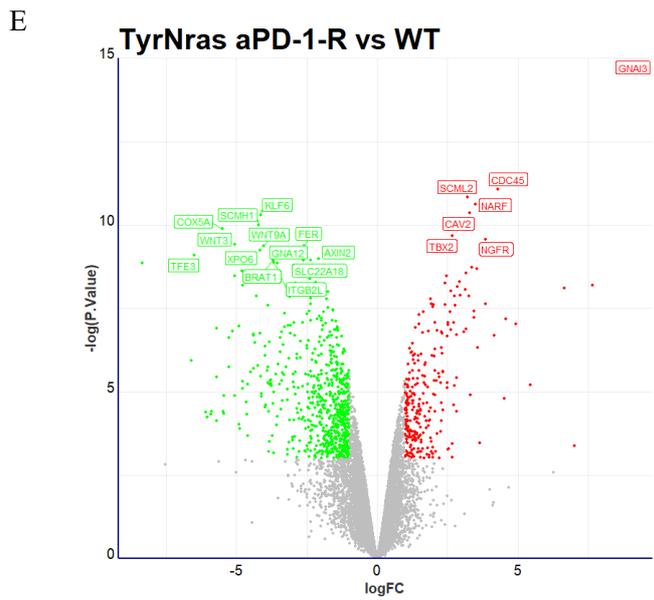
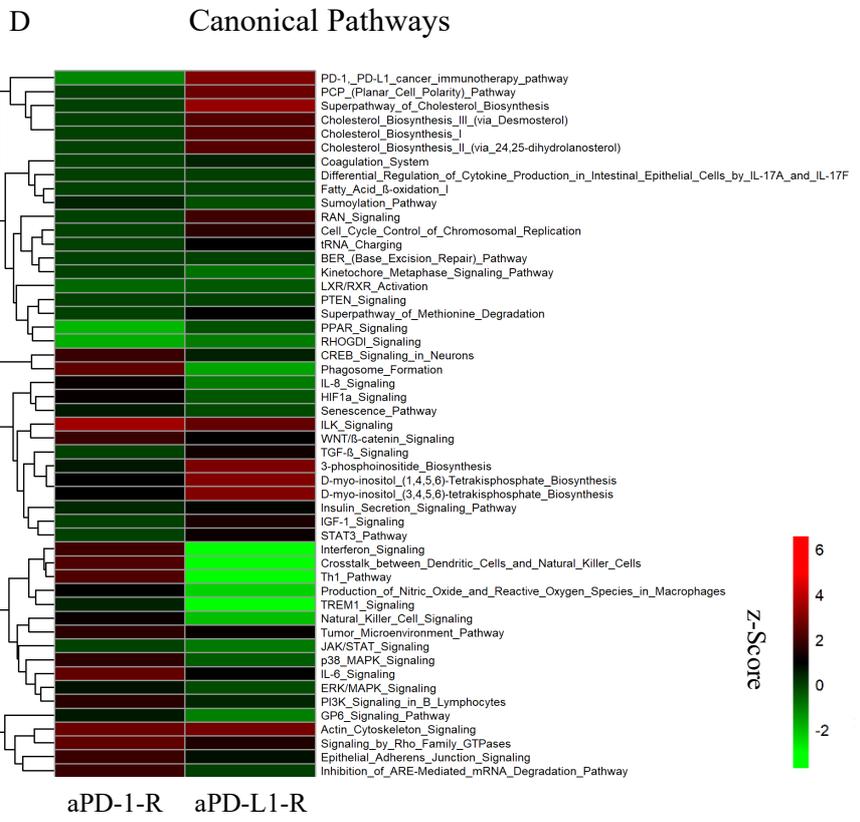
samples. (D) Heat map displaying the prediction of deregulated pathways due to the acquisition of aPD-1 or aPD-L1 resistance (pheatmap package for R version 1.0.12). Canonical pathways were filtered to those that had at least 1.5-fold z-score change and significant  $p$ value $<0.05$ . The top five up and down regulated pathways for each model were selected and group. At least 51 pathways were significantly modulated (IPA, Qiagen). (E) Volcano plot of top differentially gene expression in aPD-1-R models. (F) Volcano plot of top differentially gene expression in aPD-L1-R models. Volcano plots were generated with ggplot2 package for R version 2\_3.3.5.

### **Characterization of syngeneic TyrNras acquired resistance models**

Classical melanoma cell lines such as B16F10, which are baseline resistant to aPD-1 treatment, were not adapted to our research topic (27). Therefore, we selected the TyrNras cell line which partially responds to aPD-1 and aPD-L1 single agent therapies. Analysis of total leucocyte CD45<sup>+</sup> cells revealed that the baseline immune infiltration in the WT model was low, and further decreased in aPD-1-R et aPD-L1-R models (from 35% to 25% and 15%, respectively) (Additional file 11: Figure S8). Overall, T cell content was strongly reduced in the two resistant models. However, we observed an increase in Treg cells as well as pDCs in the aPD-1-R model, as observed previously in the MB49 aPD-L1-R model. Regarding macrophage populations, the aPD-1-R model had an infiltrate similar to that of the WT model while the aPD-L1-R model showed a strong decrease in the M-MDSC population and therefore a higher proportion of CD206<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup> macrophages (Fig 5 and Additional file 9: FigS6). Overall, these resistant models have a limited immune infiltrate, assimilating them to represent “cold tumors”. Unlike the other two models mentioned above, the TyrNras models display deregulation of large number of pathways, suggestive of significant genetic alterations. In addition, each model seems to have its own pattern. For instance, in the TyrNras aPD-1-R model pathways that activate T cells (with Th1 pathways, cross talk with DC and Interferon signaling) were up regulated while in the aPD-L1-R model these pathways were decreased. However, the ILK-signaling pathway, which has been largely associated with tumor progression, was up regulated in both models (28,29). Moreover, the JAK/STAT signaling pathway was down-regulated, in keeping with previous reports demonstrating an implication of JAK1 and 2 in acquired resistance to aPD-1 (Fig 5C, 5D, 5E) (12,30).



CD4+ Tem cells	CD4+ Tcm cells	CD4+ Tnaive cells	Treg cm cells	Treg em cells	CD8+ Tem cells	CD8+ Tcm cells	CD8+ Tnaive cells	CD11b+ B cells	CD11b- B cells	NKT	NK cells	PMN-MDSC	CD11b+ DC	pDC	F4/80+ CD206+ MHC II+	F4/80+ M1-like	F4/80+ M2-like	F4/80- Ly6Ch <sup>hi</sup> MHC II- Sirpa+	F4/80- Ly6Ch <sup>hi</sup> MHC II+ Sirpa+	F4/80- Ly6Ch <sup>hi</sup> MHC II+ Sirpa-	F4/80- Ly6Ch <sup>hi</sup> MHC II- Sirpa-
----------------	----------------	-------------------	---------------	---------------	----------------	----------------	-------------------	----------------	----------------	-----	----------	----------	-----------	-----	-----------------------	----------------	----------------	-------------------------------------------	-------------------------------------------	-------------------------------------------	-------------------------------------------

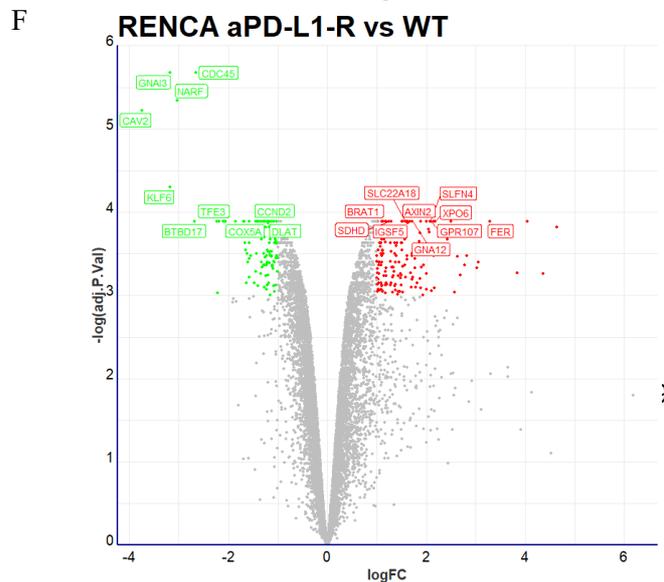
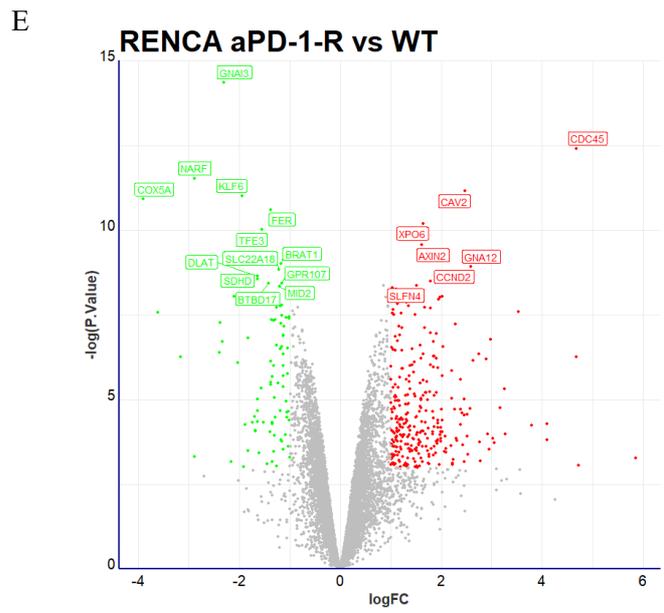
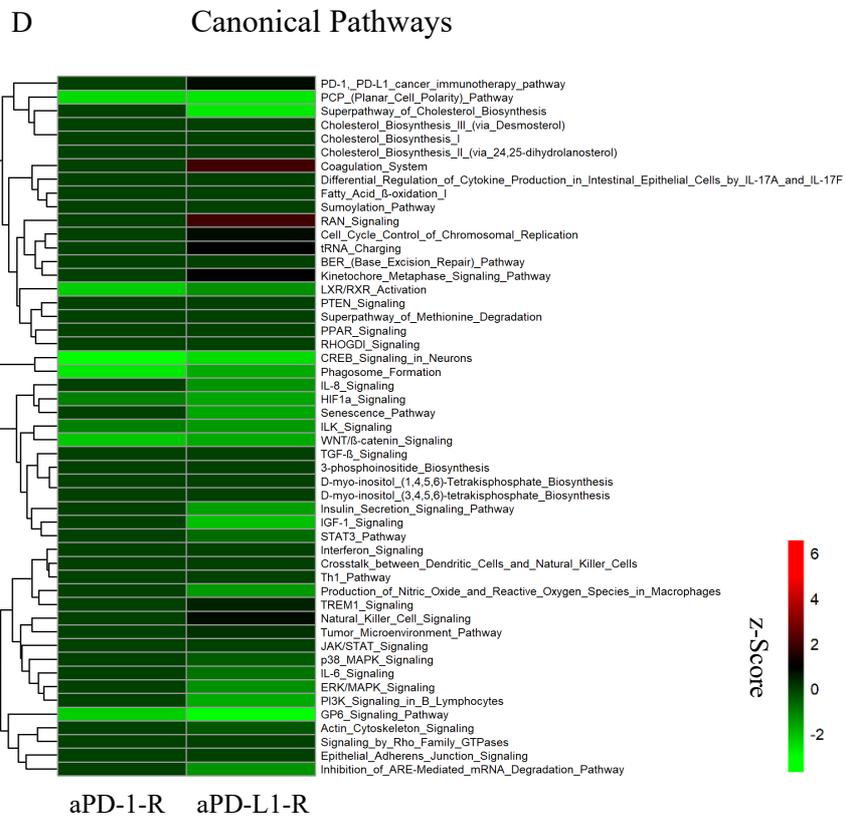
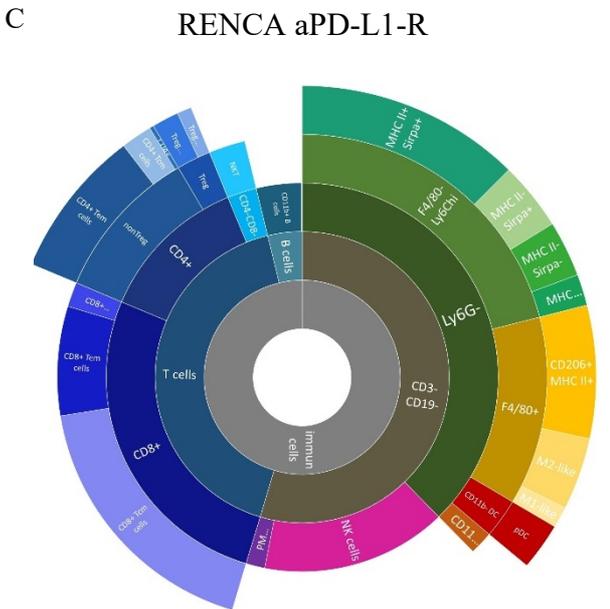
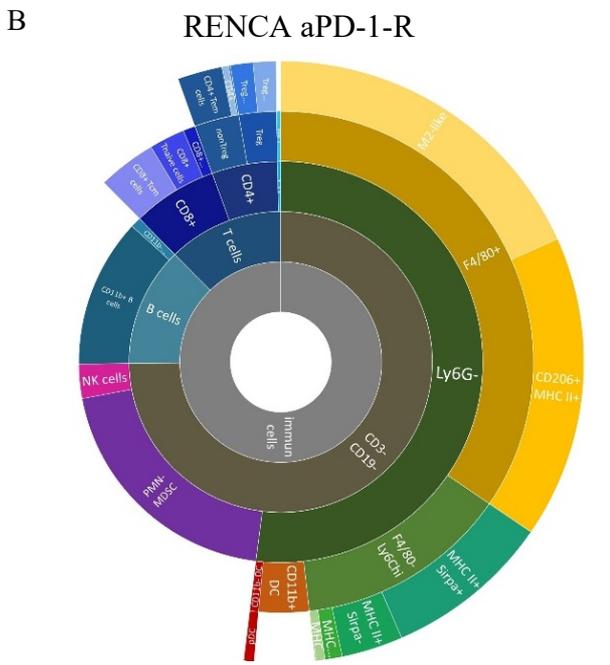
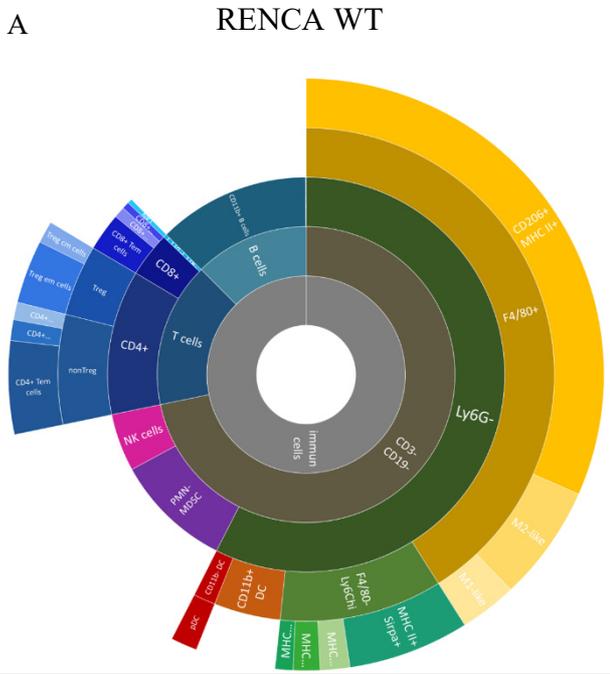


**Figure 5. Changes in tumor immune infiltrate and gene expression profiling in TyrNras aPD-1-R and aPD-L1-R models.** For all models, tumor pieces were implanted in naïve mice and when tumors reached 200 mm<sup>3</sup> tumors, flow cytometry analysis and RNAseq were performed. (A, B and C) Sunburst plots showing the proportion of CD45<sup>+</sup> immune infiltration in TyrNras WT, aPD-1-R and aPD-L1-R respectively. Flow cytometry data is n=5 for tumors. Sunburst plots represent a pool of samples. (D) Heat map displaying the prediction of deregulated pathways due to the acquisition of aPD-1 or aPD-L1 resistance (pheatmap package for R version 1.0.12). Canonical pathways were filtered to those that had at least 1.5-fold z-score change and significant pvalue<0.05. The top five up and down regulated pathways for each model were selected and group. At least 51 pathways were significantly modulated (IPA, Qiagen). (E) Volcano plot of top differentially gene expression in aPD-1-R models. (F) Volcano plot of top differentially gene expression in aPD-L1-R models. Volcano plots were generated with ggplot2 package for R version 2\_3.3.5.

### **Characterization of syngeneic RENCA acquired resistance models**

RENCA tumors have previously been reported to contain a dense immune infiltrate, representing up to 60% of total cells at basal state (Additional file 11: Figure S8) (31). In the WT model, the main subpopulation was CD206<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup> TAM cells. Moreover, similar proportions of PMN-MDSC, B cells and T cells were observed in this model (Fig 6A). In the aPD-1-R model, an up-regulation of M2-like and PMN-MDSC was observed, suggesting that resistance may involve these subpopulations. In the aPD-L1-R model, M-MDSC were also increased but T cells were more markedly up regulated, with a strong increase in CD8<sup>+</sup>Tcm cells (Fig6 and Additional file 10: Figure S7).

Taken together, these data suggest that RENCA resistant models, with the expansion of CD8<sup>+</sup> T cells, may be an appropriate pre-clinical model for testing combinations with other therapies targeting alternative immune checkpoints. Indeed, some studies have previously described upregulation of TIM-3 as a mechanism of adaptive resistance to aPD-1 therapy [29]. The large proportion of CD8<sup>+</sup> Tcm suggests that if they are reactivated by targeting other inhibitory checkpoints, resistance reversal may occur. The analysis of canonical pathways suggested that the resistant RENCA variants had not undergone significant genetic modifications, as in the case of MB49 models (Fig 6D, 6E, 6F).



CD4+ Tem cells	CD4+ Tcm cells	CD4+ Tnaive cells	Treg cm cells	Treg em cells	CD8+ Tem cells	CD8+ Tcm cells	CD8+ Tnaive cells	CD11b+ B cells	CD11b- B cells	NKT	NK cells	PMN-MDSC	CD11b+ DC	pDC	F4/80+ CD206+ MHC II+	F4/80+ M1-like	F4/80+ M2-like	F4/80- Ly6Chi MHC II- Sirpa+	F4/80- Ly6Chi MHC II+ Sirpa+	F4/80- Ly6Chi MHC II+ Sirpa-	F4/80- Ly6Chi MHC II- Sirpa-
----------------	----------------	-------------------	---------------	---------------	----------------	----------------	-------------------	----------------	----------------	-----	----------	----------	-----------	-----	-----------------------	----------------	----------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------

**Figure 6. Changes in tumor immune infiltrate and gene expression profiling in RENCA aPD-1-R and aPD-L1-R models.** For all models, tumor pieces were implanted in naïve mice and when tumors reached 200 mm<sup>3</sup> tumors, flow cytometry analysis and RNAseq were performed. (A, B and C) Sunburst plots showing the proportion of CD45<sup>+</sup> immune infiltration in RENCA WT, aPD-1-R and aPD-L1-R respectively. Flow cytometry data is n=5 for tumors. Sunburst plots represent a pool of samples. (D) Heat map displaying the prediction of deregulated pathways due to the acquisition of aPD-1 or aPD-L1 resistance (pheatmap package for R version 1.0.12). Canonical pathways were filtered to those that had at least 1.5-fold z-score change and significant pvalue<0.05. The top five up and down regulated pathways for each model were selected and group. At least 51 pathways were significantly modulated (IPA, Qiagen). (E) Volcano plot of top differentially gene expression in aPD-1-R models. (F) Volcano plot of top differentially gene expression in aPD-L1-R models. Volcano plots were generated with ggplot2 package for R version 2\_3.3.5.

**Combination of aPD-1 or aPD-L1 antibodies with selected alternative immune checkpoint inhibitors considerably improves the antitumor effect.**

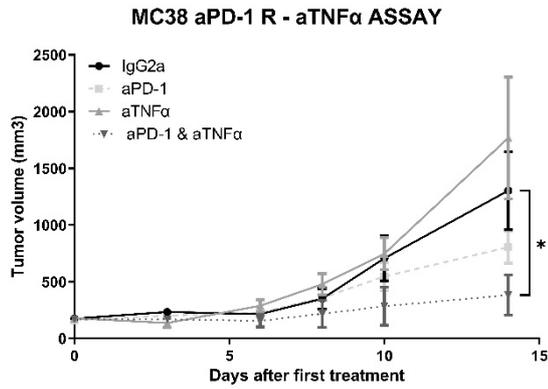
Based on the immunophenotypic data described above and literature data, we evaluated selected therapeutic combinations aiming to target specific immune subsets. Based on our data and those reported by Bertrand *et al.*, showing that aTNF $\alpha$  mAb could enhance aPD-1 responses in melanoma, we tested the combination of an aTNF $\alpha$  antibody with the aPD-1 mAb to boost the T cell response in MC38 aPD-1-R model (32). This combination resulted in a significant delay in tumor growth (p<0.05) (Fig 7A). Because this model is one of the most commonly used, we decided to test other combinations targeted myeloid suppressor cells. We combined an aCD47 with aPD-1 to target SIRP $\alpha$ -CD47 pathway, a “don’t eat me” signal phagocytosis checkpoint (33). This combination overcame therapeutic resistance to aPD-1 in MC38 aPD-1-R (p<0.05) (Fig 7B). Moreover, in accordance with the infiltration of neutrophil and secretion of NETs that we have detected in the MC38 aPD-1-R models, we combined aPD-1 with an anti-Ly6G antibodies, in order to deplete neutrophils and observed a significant regression of tumor volume with this combination (p<0.05) in comparison with the aPD-1 treatment alone (Fig 7C).

Because CD8<sup>+</sup> T cells are largely represented in RENCA aPD-1-R models, we chose to evaluate therapeutic combinations targeting alternative ICPs. Thus, we performed an *in vivo*

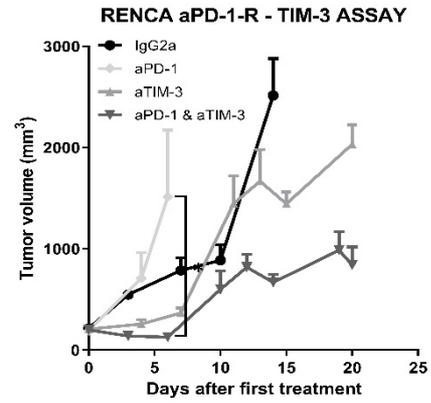
antitumor efficacy study with anti-TIM-3, anti-CTLA-4 and anti-LAG-3 mAbs in combination with aPD-1 in the aPD-1-R RENCA model (Fig 7D, 7E and 7F). We observed a modest anti-tumor effect of the anti-LAG-3 antibodies, whereas anti-TIM-3 and anti-CTLA-4 antibodies used as single agents did not show any efficacy in this resistant model. However, in combination with aPD-1, these three antibodies induced a significant delay in tumor growth in comparison with all other conditions ( $p < 0.05$ ). Moreover, we did not observe adverse toxic effects of these combinations (no effect on body weight or on animal well-being). Overall, these results suggest that resistance to aPD1 or aPD-L1 therapy may be circumvented with various combinations targeting other ICIs.

To determine whether Treg cell depletion could reverse the resistant phenotype, we administered an anti-CD25 antibody (34) in combination with the aPD-L1 antibody in the MC38 aPD-L1-R model. In this model, the aCD25 mAb alone or in combination with aPD-L1 induced a trend towards reduced tumor growth ( $p = 0.09$ ) (Fig 7G). This modest effect may be due to the fact that activated T cells also express CD25 and may have been depleted by the aCD25 mAb. Additionally, as we have previously shown that the MB49 WT model contained a large proportion of myeloid suppressor cells (35), we evaluated an aCSF1R antibody alone or in combination with aPD-1 in this model and we observed a modest trend towards reduced tumor growth with this combination ( $p = 0.1$ ) (Fig 7H).

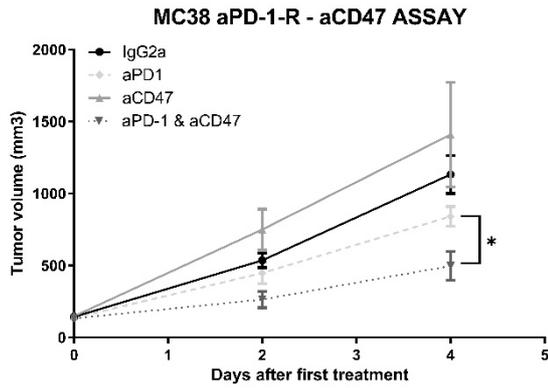
A



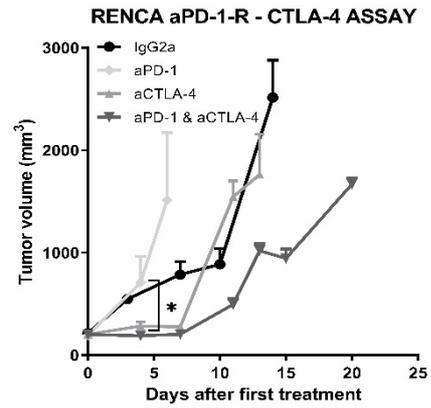
D



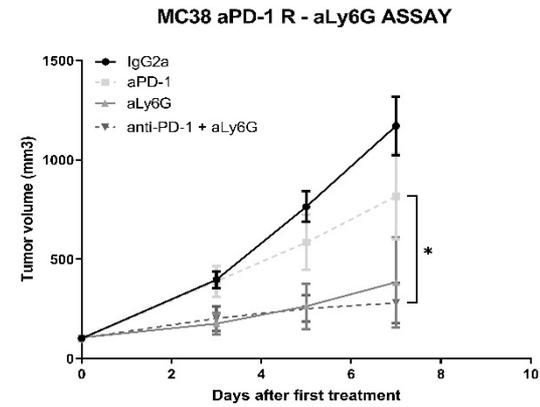
B



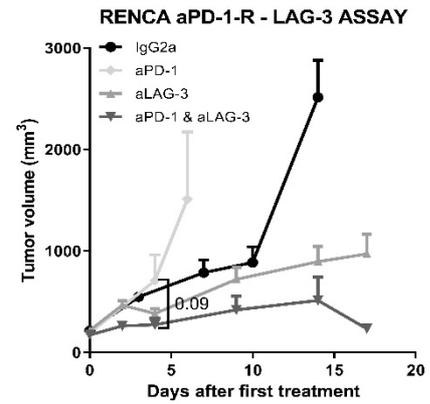
E



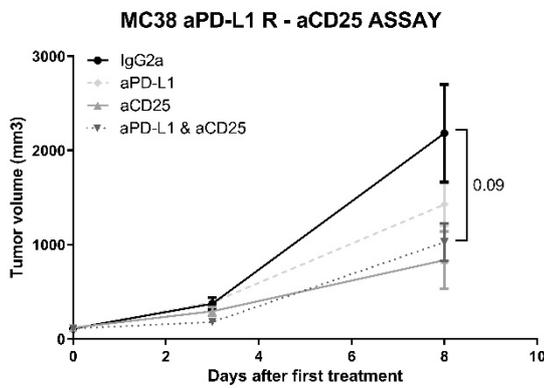
C



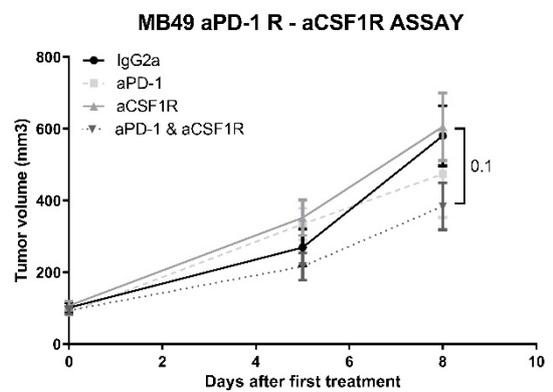
F



G



H



**Figure 7. Efficacy of therapeutic combinations *in vivo* in preclinical aPD-1-R aPD-L1-R models.**

For all experiments using resistant models, tumor fragments were implanted in naïve mice. When tumors reached 150 mm<sup>3</sup>, mice were randomized and treated for each treatment in IP with an IgG2a control (BioXCell, 12.5 mg/kg per week), aPD-1 (BioXCell, 12.5 mg/kg per week) or aPD-L1 (BioXCell, 12.5 mg/kg per week). (A) C57Bl/6 MC38 aPD-1-R model implanted in mice treated with anti-TNF $\alpha$  (BioXCell, 10 mg/kg per week), anti-TNF $\alpha$  + aPD-1. (B) C57Bl/6 MC38 aPD-1-R model implanted in mice treated with anti-CD47 (BioXCell, 20 mg/kg per week), anti-CD47 + aPD-1. (C) C57Bl/6 MC38 aPD-1-R model implanted in mice treated with anti-Ly6G (BioXCell, 2.5mg/kg once a day), anti-Ly6G + aPD-1. (D) BALB/C RENCA aPD-1-R model implanted in mice treated with anti-TIM-3 (BioXCell, 12.5 mg/kg twice a week), anti-TIM-3 + aPD-1. (E) BALB/C RENCA aPD-1-R model implanted in mice treated with anti-CTLA-4 (BioXCell, 5 mg/kg twice a week), anti-CTLA-4 + aPD-1. (F) BALB/C RENCA aPD-1-R model implanted in mice treated with anti-LAG-3 (BioXCell, 10 mg/kg twice a week), anti-LAG-3 + aPD-1. (G) C57Bl/6 MC38 aPD-L1-R model implanted in mice treated with anti-CD25 (BioXCell, 0.02 mg/kg per week) or anti-CD25 + aPD-1. (H) C57Bl/6 MB49 aPD-1-R model implanted in mice treated with anti-CSF1R (BioXCell, 20 mg/kg one day after aPD-1 and then every two days), anti-CSF1R + aPD-1. Data shown are mean tumor volume values and error bars are  $\pm$  SEM. n= 3 to 5 mice/group, \*: p<0.05, using Mann Whitney t-test.

**Discussion**

Developing models of acquired resistance to aPD-1 or aPD-L1 therapies is challenging as *in vitro* models poorly reproduce their antitumor potential. An important advantage of our *in vivo* resistant models is that the derived variants may be compared to their sensitive parental counterparts, providing insights into potential resistance mechanisms. This is not achievable with *de novo* resistant models to aPD-1 and aPD-L1 therapies, which, to our knowledge, represent the majority of murine syngeneic models. The availability of several resistant variants additionally allows seeking for common alterations, which are more likely to be mechanistically involved in resistance and can secondarily be validated by modifications of the parental models. Conversely, limitations of this approach include the fact that the tumors used were implanted subcutaneously rather than orthotopically, a factor that may affect the infiltration by the immune system and thus the development of resistance and the relevancy to clinical settings. Another caveat of our design is the use of rat anti-murine PD-1/PD-L1 antibodies, given the unavailability of commercially available murine antibodies against these targets. However, this strategy has allowed us to produce variants from several tumor types

that will be of great use to apprehend the immunological diversity of tumors, and thus better reproduce the situation encountered in humans.

To understand the role of tumor immune microenvironment alterations in acquired resistance to anti PD-1/L1 targeted therapies, we first analyzed the tumor immune microenvironment in syngeneic wild type and aPD-1 and/or aPD-L1 resistant models of colorectal cancer MC38, of bladder cancers MB49 and MBT2, of melanoma cancer TyrNras and of renal cell carcinoma RENCA.

A possible mechanism of acquired resistance to aPD-1/L1 therapies is the insufficient activation of cytotoxic T cells. To explore this hypothesis, we evaluated two therapeutic combinations with aPD-1 antibodies. Focusing on MC38 resistant models, we observed that immune infiltrates at basal state were different in the two resistant models. As MC38 aPD-1-R model displayed an upregulation of CD8<sup>+</sup> Tcm cells, we tested the combination of aPD-1 antibody with an aTNF $\alpha$ . In accordance with the report by Bertrand *et al.* that TNF $\alpha$  or TNFR blockade could enhance the activity of aPD-1-directed therapy in melanomas, we found that the combination of an aTNF $\alpha$  antibody with an aPD-1 antibody was able to circumvent resistance in the aPD-1-R MC38 tumor model (32). These results support the hypothesis that TNF-targeted agents used in combination with ICIs have the potential to revert some cases of resistance to aPD-1/PD-L1-targeted therapies (36). Another hypothesis may be that resistant tumors are enriched in Treg cells which hamper the antitumor response. Our results showed a significant increase in the content of FoxP3/CD4 cells in aPD-L1-R MC38 and MB49 models compared to their parental sensitive models, suggesting a role of regulatory T cells in the resistance phenotype. To determine whether Treg cells depletion could reverse the phenotype, we administered an anti-CD25 antibody (34), concomitantly or prior to aPD-L1 therapy in our MC38 aPD-L1-R model and observed a modest trend towards sensitization for the combination ( $p < 0.1$ ). The absence of a significant combinatorial effect may however be explained by the fact that anti CD25 antibodies are likely to deplete not only pre-existing Treg cells, but also aPD-L1-induced activated cytotoxic T cells. Moreover, the use of the PC-61 anti-CD25 antibody is controversial, since results obtained with this antibody have shown a failure to deplete intra-tumoral Treg cells (37).

The role of myeloid suppressor cells in the resistance to ICI remains poorly understood. Several approaches may be considered to circumvent resistance, including therapeutic modulation of myeloid checkpoints or depletion of protumor populations. CD47 expressed by tumor cells is a promising target since its interaction with SIRP $\alpha$  present on macrophages has been shown to inhibit tumor cell phagocytosis (38). Additionally, CD47/SIRP $\alpha$  may impact the activation of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells through dendritic cell antigen presentation (39,40). Using our MC38 aPD-1-R model, we found that combination of aPD-1 antibody with an aCD47 antibody indeed overcame the PD-1 resistance. In this same model we observed a significant increase in the intratumor neutrophil content which is remarkable since the MC38 model is known to lack neutrophils in the tumor microenvironment(21). Depletion of neutrophils using aLy6G in combination with aPD-1 was found to overcome resistance in the MC38 aPD-1-R model. In other cases, myeloid cells are largely represented before therapy and may yet increase in response to therapy (35). To modelize this situation we used the MB49 WT tumor in which we observed an increase of TAM and M-MDSC in the resistant models and administered an anti-CSF1R antibody in the MB49 aPD-1-R model to target type 2 macrophages in an attempt to restore the activity of aPD-1. With this combination, we observed a non-significant trend suggesting enhanced activity of the combination on tumor growth, in spite of the depletion of macrophages confirmed by flow cytometry (data not shown), possibly due to a compensatory increase of Treg cells (41,42).

Data from the literature support the hypothesis that upregulation of alternative ICPs is associated with resistance to aPD-1 therapy. Thommen *et al.* established a correlation between the expression of multiple ICPs on CD8 T cells and disease progression in patients with NSCLC (14). Koyama *et al.* observed ICP over-expression, notably of TIM-3, in T cells associated with adaptive resistance to aPD-1 (13). TIM-3 expression by tumor cells has been linked to a poor prognosis in liver cancer, melanoma, lung cancer and renal cancer (43,44). Moreover, cell lines expressing TIM-3 had stronger self-renewal capacities compared to cells with no TIM-3 expression (45). Although the TIM-3 ligand recognized by tumor cells remains unknown, recent studies have shown that TIM-3 engagement can activate the NF $\kappa$ B pathway (46), thereby contributing to acquired resistance through the acquisition of cancer stemness

properties (47). To determine the role of alternative ICP targeting in our resistant models, we evaluated the combination of anti-TIM-3, anti-CTLA-4 and anti-LAG-3 with the aPD-1 antibody in RENCA aPD-1-R cells, because of the large amount of CD8<sup>+</sup> T cells in this model. We observed a significant antitumor effect of all of these combinations in this resistant model, with a good tolerance of the combination regimen. Overall, these data support the combination of ICP-targeted therapies as a strategy in patients with resistant disease.

Knowledge regarding tumor cell molecular alterations associated with aPD-1 acquired resistance remains limited, with a major focus on the role of tumor mutation burden and neoantigenic depletion (48). Zaretsky *et al.* described mutations in Jak1 and Jak2 genes in resistant melanoma tumors (12), whereas Garcia-Diaz *et al.* reported that interferon signature enrichment enhanced PD-L1 and PD-L2 expression in melanoma cells (49). In order to identify molecular alterations mechanistically involved in resistance to aPD-1 and/or aPD-L1 targeted therapy, we performed a RNAseq study, comparing sensitive parental models and their resistant counterparts. We then determined common modifications of genes between aPD-1-R and aPD-L1-R tumors. This approach may be used to identify putative pathways and candidate genes involved in the *in vivo* resistance phenotype. In the MC38, MBT2 and TyrNras models, we observed alterations of the pathways already described as being modified in patients with disease progressing under ICI therapy, such as PTEN, INF $\gamma$ , PI3K / AKT or JAK1 / JAK2. However, this appears to be highly model-dependent, reflecting the heterogeneity observed in patients. In fact, models like MB49 and RENCA have little modifications of the expression profile, which suggests an environment with a low TMB and therefore less immunogenic. These could explain that despite a significant infiltration in the RENCA model of immune cells, they fail to destroy tumor cells because of a low availability of immunogenic neo-antigens.

Immune checkpoint targeted therapies have constituted paradigm-changing innovations in cancer therapy. Severe immune-related side effects, the limited proportion of treated patients who obtain a clinical benefit and finally high costs of these therapies all strongly support the identification of predictive markers of response as well as novel combination strategies with more potent antitumor activities. Our results infer that in some cases, combination with

alternative ICP-targeted therapies could provide means to circumvent acquired resistance to aPD-1/PD-L1 therapies. Larkin *et al.* have recently reported a greater than 60-month overall survival in patients with advanced melanoma receiving an ipilimumab/nivolumab combination regimen (6). The identification of novel potential biomarkers of response to ICP-targeted therapies could also contribute to a better stratification of responders. *In vivo* resistant models such as those described in this work may contribute to identify such potential biomarkers, which will then require validation in clinical series.

## **Conclusion**

Resistance to aPD-1 and aPD-L1 therapy is associated with several genetic alterations and/or modifications in the immune cell infiltrate. Our model library, which may be enriched in the future with several other variants developed using the same methodology, provides an innovative tool to better apprehend the complexity and diversity of resistance to ICI and test resistance reversal strategies.

## **Materials and Methods**

### **Mouse cell line cultures**

MC38 and RENCA cell lines were obtained from Kerfast (CVCL\_B288) and American Type Culture Collection (ATCC, CRL-2947) respectively. Alain Bergeron, Laval University, Canada, provided the MB49 and MBT2 cell lines and Julie Caramel, CRCL, France, provided the TyrNras cell line. All cell lines were negative for mycoplasma assays. Murine colon cancer MC38 cells were cultured in DMEM medium (Gibco™, 41966-029) with 10% fetal bovine serum (Gibco™, A3160802), 100 U/mL penicillin and streptomycin (Gibco™, 15140122). The murine renal cell carcinoma cell line RENCA and the murine bladder cancer cell lines MBT-2 and MB49 were cultured with RPMI medium (Gibco™, 21875-034) with 10% fetal bovine serum (Gibco™, A3160802), 100 U/mL penicillin and streptomycin (Gibco™, 15140122). Cells were incubated in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

### **Establishment of resistant models**

MC38 cells, MB49 cells and TyrNras cells were injected in 4-5 weeks female C57BL6 mice (Charles River Laboratory, 000664), RENCA cells were injected in 4-5 weeks female BALB/c mice (Charles River Laboratory, 000651), and MBT2 cells were injected in 4-5 weeks female C3H/HeNRj mice (Janvier Laboratory). In all cases,  $5 \cdot 10^6$  cells of exponentially growing cultures were diluted in 0.2 mL of PBS and injected subcutaneously into the left flank of 5 weeks mice female. The tumor volume was measured every three days (length x width) with a caliper. The tumor volume was determined using the formula:  $\frac{4}{3} \times \pi \times r^3$ . When the tumor volume reached  $150 \text{ mm}^3$ , mice were randomized in groups of five and the first treatment was administered to groups of 5-6 mice for tumor growth and flow cytometry analyses. To establish the resistant models, tumors obtained from mice with initial responses to aPD-1 (RMP1-14, BE014, BioXCell, RRID: AB\_10949053, 12.5 mg/kg per week) or aPD-L1 (10F.9G2, BE0101, BioXCell, RRID: AB\_10949073, 12.5 mg/kg per week) (Figure 1), were serially reimplanted subcutaneously into new groups of naive mice and treated once a week to maintain selection pressure. At each passage, three naïve mice were implanted with tumor fragments and treatment was initiated once the tumor reached  $150 \text{ mm}^3$ . The most aggressive tumor was selected for reimplantation. At least five passages were necessary to induce acquired resistance (Figure 1A). We will refer to sensitive models as wild type (WT) and to resistant models as aPD-1-R or aPD-L1-R for those resistant to aPD-1 and aPD-L1 mAbs, respectively. All mice were raised in an SPF environment with free access to standard food and water. Experimental procedures using C57Bl/6, Balb/C or C3H mice were submitted and approved by the Animal Ethics Committee CECCAPP of Lyon. We used the ARRIVE guideline when writing our publication(16).

### ***In vivo* cross-resistance assay**

These experiments were designed to determine whether tumors with resistance to aPD-1 were also cross-resistant to aPD-L1, and vice-versa. MC38 (C57Bl/6), MB49 (C57Bl/6), MBT2 (C3H) and RENCA (BALB/C) resistant tumors fragments were implanted subcutaneously into the right flank of mice. When tumors volume reached  $150 \text{ mm}^3$ , mice were randomized and

the first treatment was administered (n=4 to 6 mice per group). Mice implanted with aPD-1-R tumors were untreated or treated with aPD-L1 (10F.9G2, BE0101, BioXCell, RRID: AB\_10949073, 12.5 mg/kg per week, Intra-peritoneal (IP)), and mice implanted with aPD-L1-R tumors were untreated or treated with aPD-1 (RMP1-14, BE014, BioXCell, RRID: AB\_10949053, 12.5 mg/kg per week, IP).

### **Flow cytometry analysis**

Immunophenotyping (Aurora spectral Cytex) was performed when the tumor volume reached approximately 200 mm<sup>3</sup> and mouse tumor dissociation kits (130-096-730, Miltenyl Biotec) were used. To digest tumors, we used the gentle MACS Octo Dissociator (130-096-427, Miltenyl Biotec). After filtration through a 100 µm filter (130-110-917, Miltenyl Biotec) and wash, cells were stained with a viability dye marker (Zombie UV, Biolegend, 423108) and blocked with anti-CD16/32 antibody (Biolegend, 101320) according to the manufacturer's instructions. Cells were stained with the fluorescently labelled antibodies in the dark for 30 min at 4°C. After surface staining, cells were fixed and permeabilized using BD Cytotfix/Cytoperm kit (BD, 554714), then labeled with F4/80, FoxP3, Granzyme B, CD206 and T-bet in the dark for 30 min at 4 °C. Data were acquired on a Cytex® Aurora flow cytometer with SpectroFlo® Software (Cytex® Biosciences). FlowJo software (BD) was used for analyses and GraphPad Prism software was used for statistical analysis (ANOVA with Bonferroni post-test). Antibodies and gating strategies are described in Additional file 1: Table S1 and Additional file 2: Table S2, respectively.

### **RNAseq**

Due to availability at different periods, RNA sequencing was performed on two separate platforms. WT, aPD-1-R, aPD-L1-R MB49 tumors, WT, aPD-1-R, aPD-L1-R TyrNras tumors and WT, aPD-L1-R MC38 tumors were processed by the ProfileXpert platform with samples of 200 mm<sup>3</sup>. After dilaceration of samples, RNA was extracted using RNeasy mini kit (Qiagen Cat. No. 74104). Quality of samples was checked by Bioanalyzer 2100 (Agilent) and RNA was quantified by Nanodrop. Thereafter, five µg of RNA was enriched by NextFlex Rapid Directional mRNA-

Seq (Bio-Scientific) kit. Quality of samples were verified again by Bioanalyzer 2100 (Agilent) and quantified by qPCR. Samples were put on Flow Cell High Output. Amplification and sequencing were performed with Illumina NextSeq500: run Single Read 75 bp was performed for MC38 models and paired-end 2 x 75 cycles for MB49 models. For WT and aPD-1-R MC38 tumors, WT and aPD-L1-R MBT-2 tumors, and WT, aPD-1-R and aPD-L1-R RENCA tumors, the RNA sequencing was performed by Roche platform, with samples of 200 mm<sup>3</sup>. The Qiagen Tissue Lyser together with the RNeasy Mini Kit (Qiagen Cat. No. 74104) was used to extract RNA from tissue. Samples were randomized before sequencing library preparation and sequencing. Extracted RNA was of high quality (RIN 7.8 – 10) and 500 ng (as quantified using Agilent Bioanalyzer) of extracted total RNA was used for whole mRNA-sequencing library preparation. The protocol for Illumina TruSeq stranded mRNA library preparation (Illumina Cat. No. RS-122-2101) was followed. The yield and quality of RNA-sequencing libraries was assessed on the Agilent Bioanalyzer. Libraries were sequenced on the Illumina HiSeq4000 system, paired-end 2 x 51 cycles.

All RNASeq samples passed quality control in terms of number of reads per sample and read quality. For samples treated by ProfileXpert platform, trimming of single reads was performed using cutadapt v1.9.1 software. Then the reads were mapped using Tophat2 v2.1.1 software with default parameters on the genome *Mus musculus* GRCm38/mm10. Alignment rates to the mouse genome were above 95%. The Fragments Per Kilobases of exon per Million mapped reads (FPKM) values were then computed for each gene using Cufflinks v2.1.1 software as described by Trapnell, C. et al. (17). For samples treated by Roche platform, paired-end reads were aligned to the mouse genome (NCBIM37.67) using gsnap (18). Alignment rates to the mouse genome were above 80%. The reads per kilobase of transcript per million mapped reads (RPKM) values were then computed for each gene as described by Mortazavi et al (2008) using the gene composite length, that is, the sum of the length of all non-overlapping exon groups as normalization factor, using in-house tools implemented in Java (19). Differential gene expression between wild type and resistant models were computed using R scripts with limma package version 3.46.0 for a fold-change  $\geq 1.5$  and the p-value  $> 0.05$  (20). The canonical pathways were generated using ingenuity pathway analysis (QIAGEN Inc:

<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuitypathway-analysis>). Pathways significantly predicted to be up- or down-regulated (z score +/- 1.5 and pvalue<0.05) for each models are recapitulated in additional file 3: Table S3. For heatmap and volcano plot representation, we used package on R software pheatmap and ggplot2 package, respectively (<https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/index.html>).

### **Evaluation of therapeutic combinations in resistant models**

MB49 aPD-1-R, MC38 aPD-1-R and MC38 aPD-L1-R tumor fragments were implanted subcutaneously into the right flank of immunocompetent C57Bl/6 mice. RENCA aPD-1R tumor fragments were implanted subcutaneously into the right flank of immunocompetent BALB/C mice. When tumors volume reached 150 mm<sup>3</sup>, mice were randomized and the first treatment was administered (4 to 6 mice per group). Untreated groups received IgG2a as a control (clone 2A3, BE0089, BioXCell, RRID: AB\_1107769, 12.5 mg/kg per week, IP). In the MC38 aPD-1-R model, we tested 3 combinations with aPD-1 treatment: i) anti-TNF $\alpha$  antibody (clone XT3.11, BE0058, BioXCell, RRID: AB\_1107764, 10 mg/kg per week, IP), ii) anti-CD47 antibody (clone MIAP301, BE0270, BioXCell, RRID: AB\_2687793, 20 mg/kg twice a week, IP), and iii) aLy6G antibody (clone 1A8, BP0075-1, BioXCell, RRID:AB\_1107721, 2.5 mg/kg once daily, IP). We also combined anti-CSF1R antibody (clone AFS98, BE0213, BioXCell, RRID: AB\_2687699, 20 mg/kg one day after aPD-1 then every two days) with aPD-1 in the MB49 aPD-1-R model. Finally, we combined anti-CD25 antibody (clone PC-615.3, BE0012, BioXCell, RRID: AB\_1107619, 20  $\mu$ g/kg) with aPD-L1 to treat MC38 aPD-L1-R bearing mice. For RENCA aPD-1-R model, we combined anti-TIM-3 (clone RMT3-23, BE0115, BioXCell, RRID: AB\_10949464, 12.5 mg/kg twice a week), anti-LAG-3 (clone C9B7W, BE0174, BioXCell, RRID: AB\_10949602, 10 mg/kg twice a week) or anti-CTLA-4 (clone 9D9, BE0131, BioXCell, RRID: AB\_10950184, 5 mg/kg twice a week) with aPD-1.

### **Declarations:**

### **Ethics approval and consent to participate**

Experiments using C57Bl/6, C3H or BALB/C mice were submitted to and approved by the Animal Ethics Committee CECCAPP of Lyon.

### **Availability of data and material**

The authors declare that data and supplementary information files supporting the findings of this study are available. Further information and requests for resources and reagents should be directed to the lead contact, Charles Dumontet ([charles.dumontet@chu-lyon.fr](mailto:charles.dumontet@chu-lyon.fr)). RNAseq data are available with the bioproject accession number PRJNA637469 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA637469>).

### **Authors' Disclosures**

Christian Klein is a full-time employee of Roche and holds stock and patents with Roche. Fabian Birzele is full time employee of Roche. This work was supported in part by the Lyric Grant INCa-DGOS-4664. The National Association Research and Technology (ANRT) supported CG and MD for their PhD thesis (CIFRE funding) during which they both had a 3 years contract with Antineo.

### **Authors' contributions**

MD and CG designed and performed the experiments. PAC, DM, AT, AB, ELM, and NT assisted MD and CG with experiments. MD analyzed data. KC, AW and FB analyzed RNA seq data, AKC and CD advised with methods and theory of experiments. MD and CG wrote the manuscript in consultation with CD, CK, EK and LPJ, and CD supervised the project.

### **Acknowledgements**

We thank Alain Bergeron and François Radvanyi for providing the MB49 and MBT-2 cell lines and Julie Caramel for the TyrNRas model. Figures were created with BioRender.com.

Annabelle Bouchardon and Batoule Smatti performed immunohistochemistry studies in the CIQLE platform of University Claude Bernard Lyon 1. ProfileXpert, Lyon, France and Roche, Penzberg Germany performed genomic studies.

## References

1. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2015;372:311–9.
2. Balar AV, Galsky MD, Rosenberg JE, Powles T, Petrylak DP, Bellmunt J, et al. Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet*. Elsevier; 2017;389:67–76.
3. Cella D, Grünwald V, Escudier B, Hammers HJ, George S, Nathan P, et al. Patient-reported outcomes of patients with advanced renal cell carcinoma treated with nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib (CheckMate 214): a randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2019;20:297–310.
4. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leigh N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 2015;372:2018–28.
5. Kaufman HL, Kirkwood JM, Hodi FS, Agarwala S, Amatruda T, Bines SD, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumour immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2013;10:588–98.
6. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob J-J, Rutkowski P, Lao CD, et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 2019;381:1535–46.

7. McNeel DG, Bander NH, Beer TM, Drake CG, Fong L, Harrelson S, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of prostate carcinoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2016;4:92.
8. Nizam A, Aragon-Ching JB. Frontline immunotherapy treatment with nivolumab and ipilimumab in metastatic renal cell cancer: a new standard of care. *Cancer Biology & Therapy*. 2019;20:6–7.
9. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet*. 2016;387:1909–20.
10. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, et al. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol* [Internet]. 2017 [cited 2020 Jul 2];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5572324/>
11. Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature*. Nature Publishing Group; 2015;523:231–5.
12. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med*. 2016;375:819–29.
13. Koyama S, Akbay EA, Li YY, Herter-Sprie GS, Buczkowski KA, Richards WG, et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of

- alternative immune checkpoints. *Nature Communications*. Nature Publishing Group; 2016;7:1–9.
14. Thommen DS, Schreiner J, Müller P, Herzig P, Roller A, Belousov A, et al. Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors. *Cancer Immunol Res*. 2015;3:1344–55.
  15. Schoenfeld AJ, Hellmann MD. Acquired Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Cell*. 2020;37:443–55.
  16. Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol*. 2020;18:e3000411.
  17. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol*. 2010;28:511–5.
  18. Wu TD, Reeder J, Lawrence M, Becker G, Brauer MJ. GMAP and GSNAP for Genomic Sequence Alignment: Enhancements to Speed, Accuracy, and Functionality. In: Mathé E, Davis S, editors. *Statistical Genomics: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer; 2016 [cited 2020 Mar 30]. page 283–334. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3578-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3578-9_15)
  19. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*. Nature Publishing Group; 2008;5:621–8.

20. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:e47.
21. Taylor MA, Hughes AM, Walton J, Coenen-Stass AML, Magiera L, Mooney L, et al. Longitudinal immune characterization of syngeneic tumor models to enable model selection for immune oncology drug discovery. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.* 2019;7:328.
22. Reizis B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity.* 2019;50:37–50.
23. DeVito NC, Sturdivant M, Thievanthiran B, Xiao C, Plebanek MP, Salama AKS, et al. Pharmacological Wnt ligand inhibition overcomes key tumor-mediated resistance pathways to anti-PD-1 immunotherapy. *Cell Reports.* 2021;35:109071.
24. Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn J-I, Cheng P, et al. HIF-1 $\alpha$  regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Journal of Experimental Medicine.* 2010;207:2439–53.
25. Yang Z, Guo J, Weng L, Tang W, Jin S, Ma W. Myeloid-derived suppressor cells—new and exciting players in lung cancer. *Journal of Hematology & Oncology.* 2020;13:10.
26. Chiu DK-C, Tse AP-W, Xu IM-J, Di Cui J, Lai RK-H, Li LL, et al. Hypoxia inducible factor HIF-1 promotes myeloid-derived suppressor cells accumulation through ENTPD2/CD39L1 in hepatocellular carcinoma. *Nat Commun.* 2017;8:517.

27. Garris CS, Arlauckas SP, Kohler RH, Trefny MP, Garren S, Piot C, et al. Successful Anti-PD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN- $\gamma$  and IL-12. *Immunity*. 2018;49:1148-1161.e7.
28. Persad S, Dedhar S. The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2003;22:375–84.
29. Zheng C-C, Hu H-F, Hong P, Zhang Q-H, Xu WW, He Q-Y, et al. Significance of integrin-linked kinase (ILK) in tumorigenesis and its potential implication as a biomarker and therapeutic target for human cancer. *Am J Cancer Res*. 2019;9:186–97.
30. Oba T, Long MD, Keler T, Marsh HC, Minderman H, Abrams SI, et al. Overcoming primary and acquired resistance to anti-PD-L1 therapy by induction and activation of tumor-residing cDC1s. *Nat Commun* [Internet]. 2020 [cited 2021 May 17];11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7592056/>
31. Yu JW, Bhattacharya S, Yanamandra N, Kilian D, Shi H, Yadavilli S, et al. Tumor-immune profiling of murine syngeneic tumor models as a framework to guide mechanistic studies and predict therapy response in distinct tumor microenvironments. *PLoS One*. 2018;13:e0206223.
32. Bertrand F, Montfort A, Marcheteau E, Imbert C, Gilhodes J, Filleron T, et al. TNF $\alpha$  blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. *Nat Commun* [Internet]. 2017 [cited 2020 Jan 23];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5741628/>
33. Feng M, Jiang W, Kim BY, Zhang C, Fu Y-X, Weissman IL. Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2019;19:568–86.

34. Setiady YY, Coccia JA, Park PU. In vivo depletion of CD4+FOXP3+ Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by FcγR3+ phagocytes. *Eur J Immunol*. 2010;40:780–6.
35. Grasselly C, Denis M, Bourguignon A, Talhi N, Mathe D, Tourette A, et al. The Antitumor Activity of Combinations of Cytotoxic Chemotherapy and Immune Checkpoint Inhibitors Is Model-Dependent. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 17];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6190749/>
36. Fischer R, Kontermann RE, Pfizenmaier K. Selective Targeting of TNF Receptors as a Novel Therapeutic Approach. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. *Frontiers*; 2020 [cited 2021 Jun 25];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.00401/full>
37. Arce Vargas F, Furness AJS, Solomon I, Joshi K, Mekkaoui L, Lesko MH, et al. Fc-Optimized Anti-CD25 Depletes Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells and Synergizes with PD-1 Blockade to Eradicate Established Tumors. *Immunity*. 2017;46:577–86.
38. Willingham SB, Volkmer J-P, Gentles AJ, Sahoo D, Dalerba P, Mitra SS, et al. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *PNAS*. 2012;109:6662–7.
39. Tseng D, Volkmer J-P, Willingham SB, Contreras-Trujillo H, Fathman JW, Fernhoff NB, et al. Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:11103–8.
40. Liu X, Pu Y, Cron K, Deng L, Kline J, Frazier WA, et al. CD47 Blockade Triggers T cell-mediated Destruction of Immunogenic Tumors. *Nat Med*. 2015;21:1209–15.

41. Gyori D, Lim EL, Grant FM, Spensberger D, Roychoudhuri R, Shuttleworth SJ, et al. Compensation between CSF1R+ macrophages and Foxp3+ Treg cells drives resistance to tumor immunotherapy. *JCI Insight* [Internet]. [cited 2020 Jan 22];3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6124419/>
42. Ries CH, Cannarile MA, Hoves S, Benz J, Wartha K, Runza V, et al. Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer Cell*. 2014;25:846–59.
43. Zhang Y, Cai P, Liang T, Wang L, Hu L. TIM-3 is a potential prognostic marker for patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8:31705–13.
44. Zhou E, Huang Q, Wang J, Fang C, Yang L, Zhu M, et al. Up-regulation of Tim-3 is associated with poor prognosis of patients with colon cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:8018–27.
45. Komohara Y, Morita T, Annan DA, Horlad H, Ohnishi K, Yamada S, et al. The Coordinated Actions of TIM-3 on Cancer and Myeloid Cells in the Regulation of Tumorigenicity and Clinical Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinomas. *Cancer Immunol Res*. American Association for Cancer Research; 2015;3:999–1007.
46. Tomkowicz B, Walsh E, Cotty A, Verona R, Sabins N, Kaplan F, et al. TIM-3 Suppresses Anti-CD3/CD28-Induced TCR Activation and IL-2 Expression through the NFAT Signaling Pathway. *PLOS ONE*. Public Library of Science; 2015;10:e0140694.
47. Xia Y, Shen S, Verma IM. NF- $\kappa$ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res*. 2014;2:823–30.

48. Grasso CS, Giannakis M, Wells DK, Hamada T, Mu XJ, Quist M, et al. Genetic mechanisms of immune evasion in colorectal cancer. *Cancer Discov* [Internet]. 2018 [cited 2020 Jan 23]; Available from: <https://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/early/2018/03/06/2159-8290.CD-17-1327>
49. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA, et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep*. 2017;19:1189–201.

## Supplementary Figure

**Table 1. Antibody panels**

### Immune cells panel - Aurora spectral cytek

Antibody	Fluorochrome	Supplier	Cat number	Clone	RRID	Location
CD25	APC-R700	BD	565134	PC61	AB_2744344	extracellular
CD45	BUV395	BD	564279	30-F11	AB_2651134	extracellular
CD8	BUV496	BD	750024	53,6,7	AB_2874242	extracellular
I-A/I-E	BUV563	BD	748846	M5/114,15,2	AB_2873249	extracellular
CD172a	BUV661	BD	741593	P84	AB_2871002	extracellular
NKp46	BUV737	BD	612805	29A1,4	AB_2870131	extracellular
CD11c	BUV805	BD	749038	N418	AB_2873432	extracellular
CD38	BV650	BD	740489	HB7	AB_2740212	extracellular
CD19	BV750	BD	747332	1D3	AB_2872036	extracellular
CD64	BV786	BD	741024	X54-5/7,1	AB_2740644	extracellular
Ly6C	FITC	BD	553104	AL-21	AB_394628	extracellular
CD62L	BB515	BD	565261	MEL-14	AB_2739138	extracellular
CD206	PE/Dazzle594	Biolegend	141732	C068C2	AB_2565932	intracellular
PD-1	BV421	Biolegend	109121	RMP1-30	AB_2687080	extracellular
CD4	BV510	BD	563106	RM4-5	AB_2687550	extracellular
CD44	BV570	Biolegend	103037	IM7	AB_10900641	extracellular
F4/80	BV711	Biolegend	123147	BM8	AB_2564588	intracellular
T-bet	PE	Biolegend	644810	4B10	AB_2200542	intracellular
Ly6G	PercP-Cy5.5	Biolegend	127616	1A8	AB_1877271	extracellular

Viability Zombie	UV		Biolegend	423108			extracellular
CD3	AF532		Thermo	58-0032-82	17A2	AB_11217479	extracellular
Granzyme B	APC		Thermo	MHGB05	GB12	AB_10373420	intracellular
CD11b	eF450		Thermo	48-0112-82	M1/70	AB_1582236	extracellular
FoxP3	eF660		Thermo	50-5773-82	FJK-16s	AB_11218868	intracellular
CD49b	PE-Cy5		Thermo	15-5971-82	DX5	AB_2573070	extracellular
CD24	PercP-eF710		Thermo	46-0242-82	M1/69	AB_1834425	extracellular
SiglecH	SB600		Thermo	63-0333-82	eBio440c	AB_2784853	extracellular
PD-L1	PE-Cy7		Thermo	25-5982-82	MIH5	AB_2573509	extracellular
CD107a+	APC-e780		Thermo	47-1071-82	1D4B	AB_2848363	extracellular

### Supplementary Table 2 – gating strategy

Flow cytometry population	Cell Type
Dead / live	Viability
CD45+	Hematopoietic cells
CD45+CD49b+NKp46+	NK cells
CD45+ CD3+	All T-cells
CD45+CD3+CD4-CD8-CD49b+NKp46+	NKT cells
CD45+ CD3+ CD4+	Total CD4+ T-cells
CD45+ CD3+ CD4+ CD25+ FoxP3+	T regulatory cells
CD45+ CD3+ CD4+ CD25+ FoxP3+CD62L-CD44+	Treg Effector Memory cells
CD45+ CD3+ CD4+ CD25+ FoxP3+CD62L+CD44+	Treg Central Memory cells
CD45+ CD3+ CD4+ CD62L+CD44-	CD4+ non Treg Naïve cells
CD45+ CD3+ CD4+CD62L-CD44+	CD4+ non Treg Effector Memory cells
CD45+ CD3+ CD4+ CD62L+CD44+	CD4+ non Treg Central Memory cells
CD45+ CD3+ CD8+	Total CD8+ T-cells
CD45+ CD3+ CD8+ CD62L+CD44-	CD8+ Naïve cells
CD45+ CD3+ CD8+ CD62L-CD44+	CD8+ Effector Memory cells
CD45+ CD3+ CD8+ CD62L+CD44+	CD8+ Central Memory cells
Granzyme B	Cytotoxic T-cell marker
PD-1	T-cell Activation/exhaustion marker
PD-L1	Programmed death-ligand 1
CD45+CD19+CD11b-	B cells
CD45+CD19+CD11b+	B1 cells

CD45+CD11b <sup>int</sup> CD49b+NKp46 <sup>+</sup>	NK cells
CD45+ CD11b <sup>+</sup>	Myeloid cells
CD45+ CD11b+F4/80 <sup>+</sup>	Tumor-Associated-Macrophages (TAM)
CD45+ CD11b+F4/80 <sup>+</sup> MHCII-CD206 <sup>+</sup>	M2 like macrophages
CD45+ CD11b+F4/80 <sup>+</sup> MHCII+CD206 <sup>-</sup>	M1 like macrophages
CD45+CD11b+Ly6G <sup>hi</sup> Ly6C <sup>lo</sup>	PMN-MDSC
CD45+CD11b+Ly6G <sup>-</sup> Ly6C <sup>hi</sup>	M-MDSC
CD45+CD11b+Ly6G <sup>-</sup> Ly6C <sup>hi</sup>	MHC II- Sirpα <sup>-</sup> M-MDSC
CD45+CD11b+Ly6G <sup>-</sup> Ly6C <sup>hi</sup>	MHC II+ Sirpα <sup>-</sup> M-MDSC
CD45+CD11b+Ly6G <sup>-</sup> Ly6C <sup>hi</sup>	MHC II- Sirpα <sup>+</sup> M-MDSC
CD45+CD11b+Ly6G <sup>-</sup> Ly6C <sup>hi</sup>	MHC II+ Sirpα <sup>+</sup> M-MDSC
CD45+CD11b+CD11c+MHCII <sup>hi</sup>	Dendritic cells
CD45+CD11b-CD11c+MHCII <sup>med</sup> SiglecH	Plasmacytoid dendritic cells
CD64 <sup>+</sup>	Myeloid activation marker

**Supplementary Table 3 – Canonical Pathways**

Canonical Pathways	MC38 a-PD-1-R vs WT		MC38 a-PD-L1-R vs WT		MB49 a-PD-1-R vs WT		MB49 a-PD-L1-R vs WT		RENCA a-PD-1-R vs WT		RENCA a-PD-L1-R vs WT		TyrNras a-PD-1-R vs WT		TyrNras a-PD-L1-R vs WT		MBT2 a-PD-L1-R vs WT	
	z-score	pval	z-score	pval	z-score	pval	z-score	pval	z-score	pval	z-score	pval	z-score	pval	z-score	pval	z-score	pval
14-3-3-mediated Signaling	0	*	-1,604		-0,378	*	NA		NA		-0,378		2		0,277		2,887	*
3-phosphoinositide Biosynthesis	0,493		-0,365	*	-0,447		-1,633	*	NA		NA		0,632		2,959	*	0,943	
3-phosphoinositide Degradation	0,324	*	-0,192	*	0		-1,633	*	NA		NA		1		2,611	*	0,728	
4-1BB Signaling in T Lymphocytes	-1,633		NA		NA		NA		NA		NA		NA		NA		NA	
Acetone Degradation I (to Methylglyoxal)	NA		NA		NA		NA		NA		NA		NA		1,89	*	NA	
Acetyl-CoA Biosynthesis I (Pyruvate Dehydrogenase Complex)	1	*	NA		NA		NA		NA		NA		NA		NA		NA	
Actin Cytoskeleton Signaling	-0,885	*	-0,258		-2		NA		NA		-0,378		2,673	*	2,828	*	3,402	*
Actin Nucleation by ARP-WASP Complex	-0,905		-0,302	*	NA		NA		NA		NA		NA		0,707		2,496	*
Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors	0,577		-1,414		NA		NA		NA		NA		0,816	*	-1,291	*	1,387	*
Acute Myeloid Leukemia Signaling	1,706	*	-0,378		NA		NA		NA		NA		NA		1,134		2,84	*
Acute Phase Response Signaling	-1,061	*	-1,387		0	*	-1,342	*	NA		-1,134		1,633		0		2,858	*
Adrenomedullin signaling pathway	0,289	*	0,209		-0,447		NA		-1,134	*	-1,941	*	1,633		1,826	*	2,183	
Agrin Interactions at Neuromuscular Junction	-2,714		0		NA		NA		NA		NA		NA		1,265		2,309	*
Aldosterone Signaling in Epithelial Cells	1,225	*	0,333		0		NA		NA		-0,816		NA		0,535	*	2,53	*
AMPK Signaling	0,169	*	-1,095	*	-1		NA		NA		-2		NA		-0,229		2,309	
Amyloid Processing	0	*	1,342	*	NA		NA		NA		NA		NA		NA		0	
Amyotrophic Lateral Sclerosis Signaling	1,46		0,471	*	0	*	NA		NA		-1	*	NA		0,832	*	1,508	
Androgen Signaling	0,943	*	1,265		NA		NA		NA		-1,134		1,342		0		3	*
Angiotensin Signaling	-0,577		NA		NA		NA		NA		NA		NA		0		0,832	*
Antioxidant Action of Vitamin C	-0,943		1,732		0	*	NA		NA		0,378	*	NA		0,577		-1,508	
Antiproliferative Role of Somatostatin Receptor 2	1,807	*	-1		NA		NA		NA		NA		NA		0		3,317	*
Apelin Adipocyte Signaling Pathway	-1,069		0,5	*	NA		NA		NA		-1		NA		0,535		-1,342	
Apelin Cardiomyocyte Signaling Pathway	1,091		0,243	*	-1		NA		NA		-1		2,828	*	2		2,53	

Apelin Endothelial Signaling Pathway	0,962	*	-0,894	*	0	NA	NA	-1	NA	-1	3,153	*					
Apelin Liver Signaling Pathway	0,447		NA		NA	NA	NA	NA	NA	0	0,447	*					
Apoptosis Signaling	0		0,447	*	0,447	1,342	*	NA	0	2	0,655	*	-0,5	*			
April Mediated Signaling	-0,378		NA		-0,447	*	NA	NA	NA	0	0						
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	2,353	*	-0,333		NA	NA	NA	NA	0	*	1,155	*	-1,069	*			
ATM Signaling	-0,943		0,277		NA	NA	NA	NA	NA	0	-0,632	*					
Autophagy	0,135	*	-1,567	*	-0,816	NA	NA	-0,905	0	-0,962	1,606						
B Cell Activating Factor Signaling	-1,134		0		NA	NA	NA	NA	NA	0	1						
Basal Cell Carcinoma Signaling	1	*	0		NA	NA	-1,633	*	-1,342	NA	NA	0,447					
BER (Base Excision Repair) Pathway	2,524	*	0,447		NA	NA	NA	NA	NA	NA	-2						
BEX2 Signaling Pathway	0,894		-1		NA	1	*	NA	NA	0	0,707						
Bile Acid Biosynthesis, Neutral Pathway	NA		-2	*	NA												
Bladder Cancer Signaling	-1	*	NA		NA	NA	NA	NA	NA	0,378	2,449	*					
BMP signaling pathway	0	*	0,333		NA	NA	NA	-2	NA	0,577	1,667						
Breast Cancer Regulation by Stathmin1	1,863	*	-2,393	*	0,577	-1,89		-1,633	-1,414	*	0,816	-0,97	5,252	*			
Calcium Signaling	0,73		0,943		0,816	*	NA	NA	-1	1,387	*	1,89	*	2,673			
Calcium Transport I	1		NA		NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	*					
cAMP-mediated signaling	1,372		-0,192		0,447	NA	0	-1,155	NA	-0,169	*	-0,243					
Cardiac Hypertrophy Signaling	1,54	*	0,169	*	0,707	-2		NA	-1,732	*	2,111	1,616	3,536	*			
Cardiac Hypertrophy Signaling (Enhanced)	-0,088	*	-1,886	*	2,236	*	-2,111		-2,111	*	-2,646	*	1,414	0,465	*	3,098	*
Cardiac β-adrenergic Signaling	0	*	-0,775	*	1	NA	NA	-2,236	0,447	0	*	0,707					
Cardiomyocyte Differentiation via BMP Receptors	1		NA		NA												
CCR3 Signaling in Eosinophils	-0,408	*	-0,378		-0,447	-2		NA	-1,134	NA	-0,632	2	*				
CD27 Signaling in Lymphocytes	0		-0,378		NA	NA	NA	NA	NA	-0,378	1,134	*					
CD40 Signaling	0,243	*	-1,342		-1,342	*	NA	NA	NA	0	1,387	*					
CDK5 Signaling	0		-0,535		-0,447	-0,447	*	NA	-1,342	-0,378	-1	1,667					
CDP-diacylglycerol Biosynthesis I	1,732	*	1,134	*	NA												
Cell Cycle Control of Chromosomal Replication	2,183	*	-0,905	*	NA	NA	NA	0,816	*	NA	1,667	-2,53	*				
Cell Cycle Regulation by BTG Family Proteins	1,342		-1	*	NA												
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	-1,5	*	0		NA	NA	NA	NA	NA	0	0						
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	-1,291	*	-0,447		NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0,707	NA					
Ceramide Signaling	-1,213		0,277		NA	NA	NA	1	1	0,707	1,155	*					
Chemokine Signaling	-0,229		-0,632		NA	NA	NA	-0,816	NA	0,535	1,732	*					
Cholecystokinin/Gastrin-mediated Signaling	0,2		0,577		1,134	*	-2		NA	-0,378	2,236	-0,277	2,183	*			
Cholesterol Biosynthesis I	NA		2,449	*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2,333	*	NA				
Cholesterol Biosynthesis II (via 24,25-dihydrolanosterol)	NA		2,449	*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2,333	*	NA				
Cholesterol Biosynthesis III (via Desmosterol)	NA		2,449	*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2,333	*	NA				
Choline Biosynthesis III	1		NA		NA												
Chondroitin Sulfate Biosynthesis	0,775		2,111	*	NA	NA	NA	NA	1	1	NA						
Chondroitin Sulfate Biosynthesis (Late Stages)	0,535	*	1,897	*	NA	NA	NA	NA	1	0,816	NA						
Chondroitin Sulfate Degradation (Metazoa)	-1		NA		NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	*					
CNTF Signaling	1,291		-1,342		NA	NA	NA	NA	NA	NA	-1	2,714	*				

Coagulation System	-0,333		0		NA		NA		2	*	NA		0,447		NA	
Colanic Acid Building Blocks Biosynthesis	0		-1,342	*	NA											
Colorectal Cancer Metastasis Signaling	0,651	*	-1,061	*	-0,632		-1,89		-1,414	*	-2,357	*	1,633		0,365	3,395 *
Complement System	-0,447		-2,121	*	NA		NA		NA		0,447	*	NA		-3	* 1,633 *
Coronavirus Pathogenesis Pathway	-0,164		-0,192	*	0,333	*	NA		NA		-1,633		0,707		0,949	* 2,401 *
Corticotropin Releasing Hormone Signaling	1,257	*	1,147	*	1,342		NA		-1	*	-1,667		-0,378		0,816	* 1,387 *
Creatine-phosphate Biosynthesis	NA		1	* NA												
CREB Signaling in Neurons	1,212	*	-2,047	*	1,807		-1,633		-3		-2,466	*	1,877		0,478	5,907 *
Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	-2,183		-3,207	*	NA		NA		NA		0		2,236		-3,13	* 3,051 *
CSDE1 Signaling Pathway	1		-1,342		NA		-0,302	* NA								
CXCR4 Signaling	0,928		-0,688	*	0	*	-2		NA		-0,378		1,89		0,471	3,128 *
Cyclins and Cell Cycle Regulation	1,886	*	0	*	NA		1	-2,236								
Death Receptor Signaling	-1,46	*	-1,698	*	0,447		NA		NA		NA		0,632	*	-1,512	* 0,577 *
Dermatan Sulfate Biosynthesis	1		2,111	*	NA		NA		NA		NA		1		0,632	1
Differential Regulation of Cytokine Production in Intestinal Epithelial Cells by IL-17A and IL-17F	NA		-2,646	*	NA		NA	NA								
Differential Regulation of Cytokine Production in Macrophages and T Helper Cells by IL-17A and IL-17F	NA		-2,236	*	NA		NA	NA								
Dilated Cardiomyopathy Signaling Pathway	0,174	*	0,905		0		NA		NA		-1,342	*	-3,771	*	-1,567	* -0,577
D-myo-inositol (1,4,5,6)-Tetrakisphosphate Biosynthesis	0,174	*	0,192	*	0		-1,633	*	NA		NA		1		3,053	* 0,258
D-myo-inositol (3,4,5,6)-tetrakisphosphate Biosynthesis	0,174	*	0,192	*	0		-1,633	*	NA		NA		1		3,053	* 0,258
D-myo-inositol-5-phosphate Metabolism	0,649	*	-0,192	*	0		-1,633	*	NA		-0,447		1,265		2,828	* 0,258
Dopamine Degradation	NA		-0,816	*	NA		NA	NA								
Dopamine-DARPP32 Feedback in cAMP Signaling	1,826		0,378	*	1,342		NA		NA		-1,265	*	-1,134		0,186	* 2,111
EGF Signaling	-0,277		-0,447		0	*	NA		NA		NA		NA		NA	2,333 *
Eicosanoid Signaling	0,707	*	NA		NA		NA		NA		0		NA		NA	0,816 *
EIF2 Signaling	-2,475		-1		-0,447		-2		NA		-1		NA		-0,277	-1,8 *
Endocannabinoid Cancer Inhibition Pathway	-0,649	*	-1,633	*	0		NA		NA		0,816		NA		-0,655	-0,775
Endocannabinoid Developing Neuron Pathway	1,826	*	-0,535		NA		1,155	3 *								
Endocannabinoid Neuronal Synapse Pathway	2,414	*	0,626	*	0		NA		NA		0	*	0,816		0	* 0,302
Endometrial Cancer Signaling	0,905		NA		1,342	2,121 *										
Endoplasmic Reticulum Stress Pathway	0,816		NA		1,134	* NA										
Endothelin-1 Signaling	1,021	*	-1,134	*	0	*	-2		NA		-1,155		0,447		-0,845	* 2,502 *
eNOS Signaling	1,095		-0,218	*	NA		NA		NA		-2,449		NA		0,471	2,496
Ephrin B Signaling	-0,229	*	-0,333		NA		-0,378	1,667 *								
Ephrin Receptor Signaling	2,082	*	-0,258	*	NA		0	2,858 *								
Epithelial Adherens Junction Signaling	-2,292	*	-0,243		-2		1,342	*	NA		0		1,897		0,728	-0,894 *
ERB2-ERBB3 Signaling	-0,775		-1		0	*	NA		NA		NA		NA		0,816	3,317 *
ERBB Signaling	-0,928	*	1,265		0		NA		NA		NA		NA		0	1,698 *
ERBB4 Signaling	0,775		-0,447		NA		-0,447	3,317 *								
ERK/MAPK Signaling	-0,295	*	-1,706	*	0,333	*	-0,378	*	NA		-1,265		0,707		-0,192	2,985 *
ERK5 Signaling	1,043	*	-0,577	*	0		NA		NA		NA		0	*	-0,277	1,414
Erythropoietin Signaling Pathway	0,617	*	1,091		0	*	NA		NA		-1,134		-1,89		0,816	2,353 *

Estrogen Receptor Signaling	1,476	*	0,16		-0,378		-2,449		-2		-1,279	*	1,291		2,546	*	1,441	*
Estrogen-Dependent Breast Cancer Signaling	0		-1,342		NA		NA		NA		-2		NA		1		2,887	*
Estrogen-mediated S-phase Entry	2,53	*	0	*	NA		NA		NA		NA		NA		2,236		NA	
Ethanol Degradation II	0		-1,134	*	NA		NA		NA		NA		NA		NA		2,449	*
Ethanol Degradation IV	1		-1	*	NA		NA		NA		NA		NA		NA		2,236	*
Factors Promoting Cardiogenesis in Vertebrates	1,155	*	1,069		NA		NA		-2,121	*	-1,667		1,508	*	1,8	*	1,941	
FAT10 Cancer Signaling Pathway	-1,604	*	-2,333	*	NA		NA		NA		NA		NA		0		1,134	*
FAT10 Signaling Pathway	-0,447	*	-2,236		NA		NA		NA		NA		NA		-2		NA	
Fatty Acid Activation	-1,134	*	-1	*	NA		NA		NA		NA		NA		-1		NA	
Fatty Acid $\alpha$ -oxidation	0		-0,816	*	NA		NA		NA		NA		NA		NA		1	*
Fatty Acid $\beta$ -oxidation I	-2,111	*	-1,134	*	NA		NA		NA		NA		NA		0		0	
Fc Epsilon RI Signaling	0,928	*	-1,155		-0,447		-2		NA		-0,447		NA		-1,265		2,683	*
Fc $\gamma$ RIIB Signaling in B Lymphocytes	1		-2,121		NA		NA		NA		NA	*	NA		0,447		1,897	*
Fcy Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes	0,2	*	-1,5	*	-1,342	*	NA		NA		NA		NA		-0,775		3,71	*
Ferroptosis Signaling Pathway	-0,316	*	-0,209	*	NA		-0,447	*	NA		0		1		0	*	3,606	
FGF Signaling	1	*	-0,378		0		NA		NA		NA		NA		0		2,496	*
FLT3 Signaling in Hematopoietic Progenitor Cells	1,528	*	-0,632		NA		NA		NA		NA		NA		-0,577		2,183	*
fMLP Signaling in Neutrophils	1,225	*	-1,291	*	0,707	*	NA		NA		-1,414		-1		-0,535		3,273	*
Folate Transformations I	2		NA		NA		NA		NA									
G Beta Gamma Signaling	1,219	*	0,229	*	-1		NA		NA		-1,134		0,816		1,043	*	2,84	*
G $\beta$ i Signaling	1,528		-1,069	*	NA		NA		NA		0,378		NA		-0,535		1	*
G $\beta$ q Signaling	2,197	*	0	*	0,333	*	-2		NA		-0,707		NA		-2,496		3,153	*
G $\beta$ s Signaling	1,569	*	1,069	*	NA		NA		NA		NA		NA		1	*	1,155	*
GDNF Family Ligand-Receptor Interactions	0,447	*	-1,342		NA		-2	*	NA		0		2		0,816		2,496	*
Glioblastoma Multiforme Signaling	0,309	*	-1		0,378	*	-1,633	*	-2,646	*	-2,309	*	2,449		2,496		2,668	*
Glioma Invasiveness Signaling	0,535		-0,333		-1		-2,236	*	NA		0,447		NA		0,816		2,309	*
Glioma Signaling	0,392	*	0		0	*	NA		NA		-1,633	*	NA		0,632		2,673	*
Glutathione-mediated Detoxification	-1,508	*	0		NA		NA		NA		-2,236	*	NA		0,378		-1	
Glycogen Degradation III	NA		-0,447	*	NA		NA		NA		NA		NA		NA		NA	
GM-CSF Signaling	0		-2,121		NA		NA		NA		NA		NA		-0,302		3,051	*
GNRH Signaling	0,603	*	0		0,816		NA		NA		-1,414	*	NA		1,342		2,858	*
GP6 Signaling Pathway	-0,539	*	-0,832		NA		2	*	-2,236	*	-3,606	*	0,632	*	-1		2,558	*
GPCR-Mediated Integration of Enteroendocrine Signaling Exemplified by an L Cell	-2		1,155	*	NA		NA		NA		0		NA		0,535	*	1	
GPCR-Mediated Nutrient Sensing in Enteroendocrine Cells	1,461	*	0,471	*	NA		NA		NA		-0,632	*	0,816		1,225	*	2,53	
Granzyme B Signaling	0	*	1		NA		NA		NA		NA		NA		NA		NA	
Growth Hormone Signaling	1,147	*	0,333		-0,447	*	NA		NA		-1		NA		-1,265		3	*
Guanosine Nucleotides Degradation III	-0,447		NA		NA		0		NA									
Gustation Pathway	-0,539		-1,091		NA		NA		-1,342	*	-1,698	*	1,941		0,898		2,714	
G $\alpha$ 12/13 Signaling	-0,626		-1,897		0,816	*	-1		NA		NA		1,667	*	1,342		3,207	*
Heparan Sulfate Biosynthesis	0,688		1,941	*	NA		NA		NA		NA		1,342		0,302		NA	
Heparan Sulfate Biosynthesis (Late Stages)	0,471		1,732	*	NA		NA		NA		NA		1,342		0,333		NA	
Hepatic Fibrosis Signaling Pathway	0,626	*	-1,54	*	1,387	*	-1,508	*	-1,414	*	-1,698	*	3,53	*	0,14	*	3,857	*

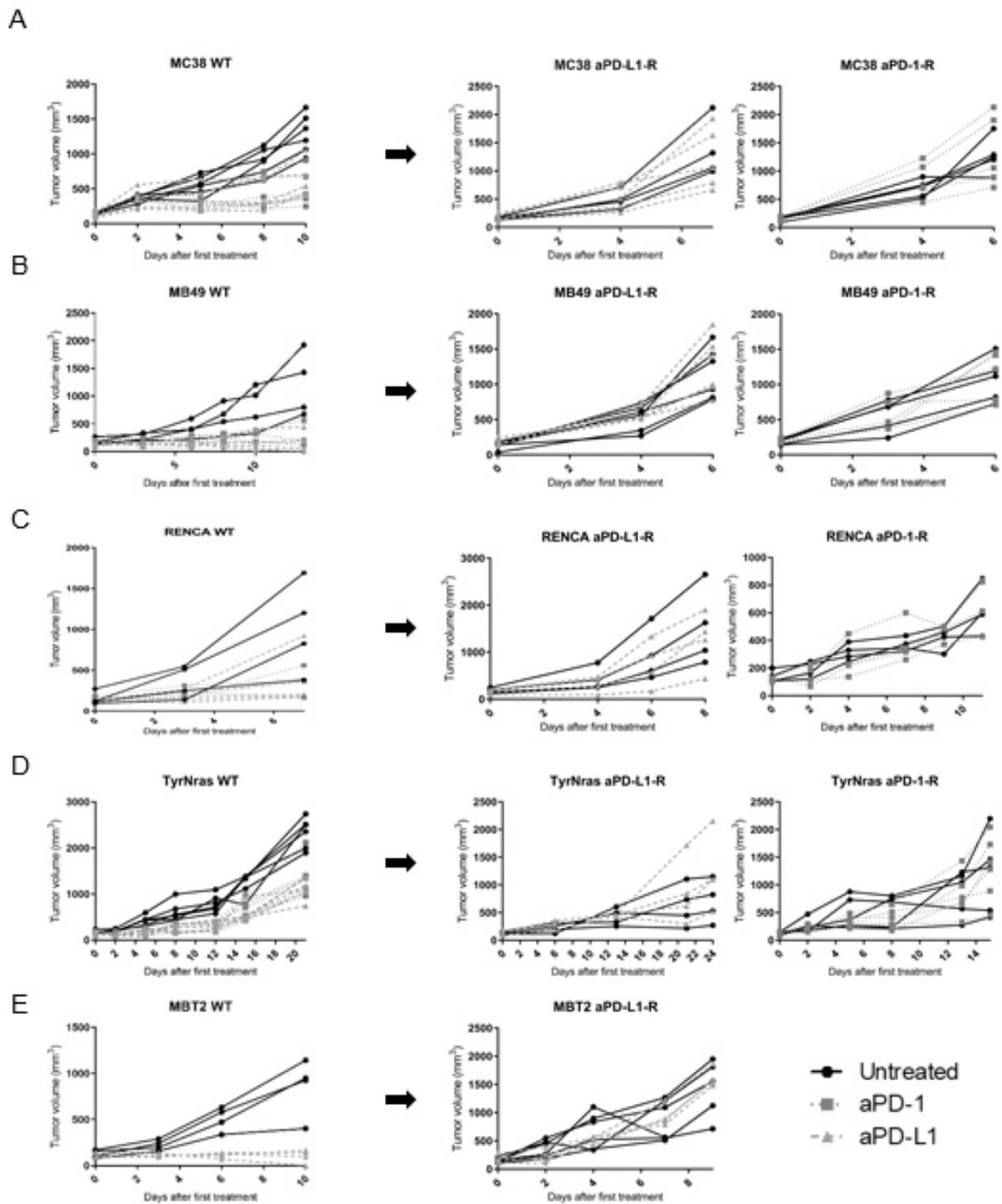
HER-2 Signaling in Breast Cancer	0,137	*	0,816		1,604	*	-0,447		NA		0		1		-0,6		1,177	*
HGF Signaling	0,365	*	0		0,447	*	NA		NA		NA		NA		0		3,9	*
HIF1? Signaling	0	*	0		0		-2,449	*	-1		-1,604	*	1,134		-0,378		2,694	*
HIPPO signaling	-0,218	*	0	*	NA		NA		NA		0		1		NA		1,342	
Histamine Degradation	NA		-1,342	*	NA													
Histidine Degradation III	NA		-0,447	*														
Histidine Degradation VI	-1		NA															
HMGBl Signaling	-0,392		-1,46	*	0	*	-0,816	*	NA		0		NA		-0,832		2,5	*
HOTAIR Regulatory Pathway	1,021	*	0,258		0	*	-1,633	*	-1,633	*	-0,258	*	1,633		1,964		1,043	*
Huntington's Disease Signaling	1,897	*	1,225	*	0,447		NA		NA		-1		-1,342		-1,279	*	2,183	*
Hypoxia Signaling in the Cardiovascular System	0,707		NA		2,121	*	1,342											
IGF-1 Signaling	1,46	*	-0,905		-1	*	-2	*	NA		-2		NA		1,414		2,496	*
IL-1 Signaling	-0,632	*	-0,577	*	0		NA		NA		NA		NA		0,816		2,333	*
IL-15 Production	0	*	-0,277		NA		NA		NA		-0,378		1,134		-2,236		1,897	
IL-17 Signaling	-1,372		-2,2	*	0		NA		NA		-0,707		1,134		-1,633		2,183	
IL-17A Signaling in Airway Cells	0,333		-1,342		-0,447	*	NA		NA		NA		NA		-0,816		0,378	
IL-2 Signaling	0		-2,449		-1,342	*	NA		NA		NA		NA		0		3,162	*
IL-22 Signaling	NA		1,633	*														
IL-23 Signaling Pathway	-0,333		-1,89		NA		-1		1,134	*								
IL-3 Signaling	-0,229		-1,134		0,447	*	NA		NA		NA		NA		-1,414		3,153	*
IL-6 Signaling	0	*	-1,069		0		-1,342	*	NA		-0,816		2,53	*	0,943		3,545	*
IL-7 Signaling Pathway	0,229	*	-1		-2		NA		NA		0		NA		-0,905		1,897	*
IL-8 Signaling	1,852	*	-1,567	*	0		-2		NA		-1,342		1,134		-0,943		2,746	*
IL-9 Signaling	0,905	*	-0,816	*	NA		2,646	*										
ILK Signaling	1,298	*	-1,095	*	0		-1		-1		-1,414		3,5	*	2,556	*	1,698	*
Induction of Apoptosis by HIV1	-0,728	*	0	*	0	*	NA		NA		NA		1,342		0,302		-1	*
Inflammasome pathway	-1		-2,449	*	NA		-2		1,89	*								
Inhibition of ARE-Mediated mRNA Degradation Pathway	-3,182	*	-2,4	*	-1,342		NA		NA		-1,342		1,89		0		1,897	
Inhibition of Matrix Metalloproteases	-0,277	*	-0,447		NA		NA		NA		-1,414	*	NA		-1,342		1,134	*
iNOS Signaling	-1,633		-1,414	*	0	*	NA		NA		NA		NA		-0,816		1,89	*
Insulin Receptor Signaling	1,622	*	1,807		-0,447		-1,342	*	NA		-0,447		NA		0,5		0,277	
Insulin Secretion Signaling Pathway	2,853	*	0,667	*	-1,134		-1,342		NA		-1,508		0,378		0,905	*	1,029	*
Integrin Signaling	0,566	*	-0,784	*	0,378		-1,342		NA		-2,236		2,828		1,89		3,651	*
Interferon Signaling	-1,414		-2,449		NA		NA		NA		NA		2		-3,051	*	2,236	
Isoleucine Degradation I	0		NA		NA		NA		NA		-1	*	NA		NA		NA	
JAK/STAT Signaling	1,091	*	-1,667		-2		NA		NA		NA		NA		-0,905		3	*
Kinetochores Metaphase Signaling Pathway	1,4	*	-0,302		-0,378	*	NA		NA		1		NA		-0,775		-2,887	*
Leptin Signaling in Obesity	1,508	*	NA		2													
Leucine Degradation I	-1		NA															
Leukocyte Extravasation Signaling	0,302	*	-0,557	*	-0,816		-1		NA		1,508		0,447		1,095	*	3,651	*
Leukotriene Biosynthesis	-1	*	NA															
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	-0,655	*	-0,302	*	0,447		NA		0,447	*	0,632	*	-0,447	*	0,577	*	0	*

LPS-stimulated MAPK Signaling	-0,243		-0,378		0	*	NA		NA		NA		NA		0		3,5	*
LXR/RXR Activation	2,449	*	0,535	*	NA		NA		-2,236	*	-1,265	*	-0,632	*	-0,408	*	0	
Lymphotoxin β Receptor Signaling	-0,302		-1,633		NA		-0,378		1,134									
Macropinocytosis Signaling	0,943	*	-0,447		NA		-0,447		3,464	*								
Melanocyte Development and Pigmentation Signaling	1,46		-0,905		NA		NA		NA		-0,816		NA		1,732		2,138	*
Melanoma Signaling	0,905		NA		2,646													
Melatonin Signaling	1,043	*	0	*	NA		NA		NA		-1,342		NA		-0,277	*	2,646	
Mevalonate Pathway I	NA		2	*	NA		2,236	*	NA									
MIF Regulation of Innate Immunity	0		NA		-0,447	*	NA		NA		NA		NA		0		0,333	*
MIF-mediated Glucocorticoid Regulation	0,378		NA		-0,447	*	NA		0,378	*								
Mitochondrial L-carnitine Shuttle Pathway	-1,667	*	-1,342	*	NA		-1		NA									
Mitotic Roles of Polo-Like Kinase	2,53		1		NA		1,633		-2,449	*								
Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency	0,667	*	0		NA		-1	*	NA		NA		NA		0,632		2	*
MSP-RON Signaling In Cancer Cells Pathway	0,174	*	-0,728		-0,816		-1		NA		-0,816		1,342		0,577		2,324	
MSP-RON Signaling In Macrophages Pathway	0,447		0,655	*	-1		-1		NA		NA		1		1,789		2,183	*
mTOR Signaling	1,257		-0,209	*	-0,816		-1,342		NA		-0,447		NA		-0,277		2,668	*
MYC Mediated Apoptosis Signaling	-0,775	*	-1,732	*	NA		NA		NA		0		NA		0,277	*	1,342	
NAD biosynthesis II (from tryptophan)	-0,816	*	NA															
NAD Phosphorylation and Dephosphorylation	0,447		NA		1	*												
NAD Salvage Pathway II	0,302	*	NA		2		0,447	*										
NAD Signaling Pathway	-1,342	*	-1,964	*	NA		-2		NA		-2,236		0,378		-0,928	*	1,291	
Natural Killer Cell Signaling	-1,732	*	-2,191	*	-0,447		-2,236		NA		0,816		1,155		-2	*	2,722	*
Necroptosis Signaling Pathway	-0,48	*	-2,558	*	0		NA		NA		-0,378		1		-1,8		0	*
NER (Nucleotide Excision Repair, Enhanced Pathway)	1,46	*	0		-1		0	*	NA		2		NA		2,646		-2	
Netrin Signaling	-0,728		0		NA		NA		NA		-0,707	*	0,447		1,291	*	NA	
Neuregulin Signaling	-0,2	*	2,121		1,342	*	NA		NA		NA		NA		-0,302	*	1,941	*
Neuroinflammation Signaling Pathway	0,14		-4,621	*	-0,333		0,816		NA		-0,302		2,673		-3,286	*	4,218	*
Neuropathic Pain Signaling In Dorsal Horn Neurons	0,378	*	0,277		0	*	NA		NA		-1,414	*	NA		0,943		2,714	
Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	0		-0,258	*	NA		NA		NA		-1,134	*	2,449		-2,84	*	1	
Neurotrophin/TRK Signaling	1,342	*	-1,342		NA	*	-1	*	NA		NA		NA		0		3	
NF-ΰB Activation by Viruses	-1,5		-0,707		-0,447	*	NA		NA		NA		NA		-1		3,742	*
NGF Signaling	1,3	*	-0,535		0,447		NA		NA		0		NA		0,302		2,84	*
Nicotine Degradation II	0		1,342		NA		NA		-2	*	-2,646	*	NA		1,134		NA	
Nitric Oxide Signaling in the Cardiovascular System	1,177	*	0,5	*	0		NA		NA		-1,633	*	-1		-0,447	*	2,111	
nNOS Signaling in Neurons	1		NA		-1,633	*	NA											
Non-Small Cell Lung Cancer Signaling	-0,728	*	NA		NA		NA		NA		-1		NA		0,447		1,897	*
Notch Signaling	-1,155	*	0,447		NA		1	*										
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	0,365	*	0,707		1		-2		NA		NA		NA		1,265		3,207	
Oncostatin M Signaling	-1,732		NA		NA		-2	*	NA		NA		NA		-0,816		2,53	*
Opioid Signaling Pathway	1,871	*	0,686	*	1,265		NA		-2		-0,5	*	0		0,845	*	2,414	*
Osteoarthritis Pathway	-1,549	*	-1,257	*	-0,447		NA		NA		-0,905	*	0		-0,898	*	0,577	*
Ovarian Cancer Signaling	0	*	-1,508		NA		NA		NA		-2,236	*	NA		1		2,333	*

P2Y Purigenic Receptor Signaling Pathway	1,461	*	-0,229	*	NA	NA	NA	-1,414	NA	1,5	3,638	*						
p38 MAPK Signaling	-0,73	*	-2,524	*	1,633	*	NA	-0,447	1,667	*	-0,447	*	1,5	*				
p53 Signaling	0,2	*	2,236		NA	NA	NA	NA	NA	-1,508		-0,632						
p70S6K Signaling	0,378		-2,041	*	-1	-1	NA	-1,667	NA	0,832		3,464						
PAK Signaling	-1,091		-0,333		NA	NA	NA	NA	2,449		2,138	*	1,941	*				
Pancreatic Adenocarcinoma Signaling	-0,626	*	-0,302	*	NA	NA	NA	NA	NA	0		0,277	*					
Paxillin Signaling	-1,414		-0,816		NA	NA	NA	NA	2		1,941	*	2,309	*				
PCP (Planar Cell Polarity) Pathway	0,426	*	1,342		NA	NA	-2,449	*	-2,646	*	NA	2,646		0,378				
PD-1, PD-L1 cancer immunotherapy pathway	-1,225	*	3	*	1	*	NA	NA	0,816	-1,134		2,985	*	-2,53				
PDGF Signaling	-1,043	*	-2,646		NA	-2	*	NA	NA	NA	-0,333		3,742	*				
PEDF Signaling	0,243		-1,897		-1	*	-1	*	NA	-2	NA	-1		2,496	*			
PFKFB4 Signaling Pathway	0,832		-0,816		NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,265	*	2,236					
Phagosome Formation	0,174		-3,534	*	1,604		-1,89		-2,646		-1,715		2,466		-1,584	*	6,567	*
Phosphatidylglycerol Biosynthesis II (Non-plastidic)	1,732	*	1,134	*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA				
Phospholipases	1,213		-0,707	*	NA	NA	NA	NA	-0,816	*	NA	-0,378		0,447				
PI3K Signaling in B Lymphocytes	0	*	-2,5		0,707	*	NA	NA	-1,667		1,633		0,408	*	3,962	*		
PI3K/AKT Signaling	0,186	*	-0,943	*	-1,414	*	-0,447	*	NA	0	*	NA	0,577		0,832	*		
PPAR Signaling	1,671	*	0,577		0		2	*	NA	0		-1,89		-0,277		-2,357	*	
PPARα/RXRα Activation	-0,617	*	0		NA		2,236		NA	0,816	NA	-0,853		-1,528	*			
Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	-0,845		-2,191	*	0,302	*	0		NA	-1,414	1		-2,294		4,2	*		
Prolactin Signaling	1,043	*	-0,378		-1		NA	NA	NA	NA	-0,905		4,123	*				
Protein Kinase A Signaling	0	*	0,469		0,775	*	-1	*	-1		-1,604		-0,832	*	-0,739	*	0,493	*
PTEN Signaling	-0,316	*	0,258		0,816	*	1,633	*	NA	0	NA	0		-2,683	*			
Purine Nucleotides De Novo Biosynthesis II	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-2,236	*			
Putrescine Degradation III	NA		-1,134	*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA				
Pyridoxal 5'-phosphate Salvage Pathway	1,342	*	-0,302	*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,378		0					
Pyrimidine Deoxyribonucleotides De Novo Biosynthesis I	-0,333	*	NA		NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,707	*	NA					
Pyrimidine Ribonucleotides De Novo Biosynthesis	-0,632		NA		NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,632	*	NA					
Pyrimidine Ribonucleotides Interconversion	-0,632	*	NA		NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,632	*	NA					
RAC Signaling	-1,043	*	0,535	*	NA	NA	NA	0,447	-0,816		0		3,153	*				
RAN Signaling	3	*	NA		NA	NA	NA	2	*	NA	2		NA					
RANK Signaling in Osteoclasts	-0,447		-1		0,447	*	NA	NA	-1	NA	0,378		2,714	*				
Reelin Signaling in Neurons	1,768	*	0		-2		NA	NA	0	NA	0,535		1,698	*				
Regulation of Actin-based Motility by Rho	0,243		0,277	*	NA	NA	NA	NA	1,667	*	2,183	*	1,291	*				
Regulation of Cellular Mechanics by Calpain Protease	-0,905		-0,333	*	NA	-1	*	NA	NA	NA	0,378	*	2,646	*				
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	0,5		-0,632		NA	-1		NA	NA	NA	0,816		2,828	*				
Regulation Of The Epithelial Mesenchymal Transition By Growth Factors Pathway	-0,384	*	-1,279		NA	-2		NA	-1,134		1,89		-0,392		3,838	*		
Regulation Of The Epithelial Mesenchymal Transition In Development Pathway	0,333	*	0,333		NA	0		-1,89	*	-2,236		NA		2,449		1,265	*	
Relaxin Signaling	1,706	*	0,632		-0,447	*	NA	NA	NA	NA	2,53	*	1,941	*				
Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	NA		NA		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		0,447					
Renal Cell Carcinoma Signaling	-0,243	*	NA		NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0,447		2,714	*				

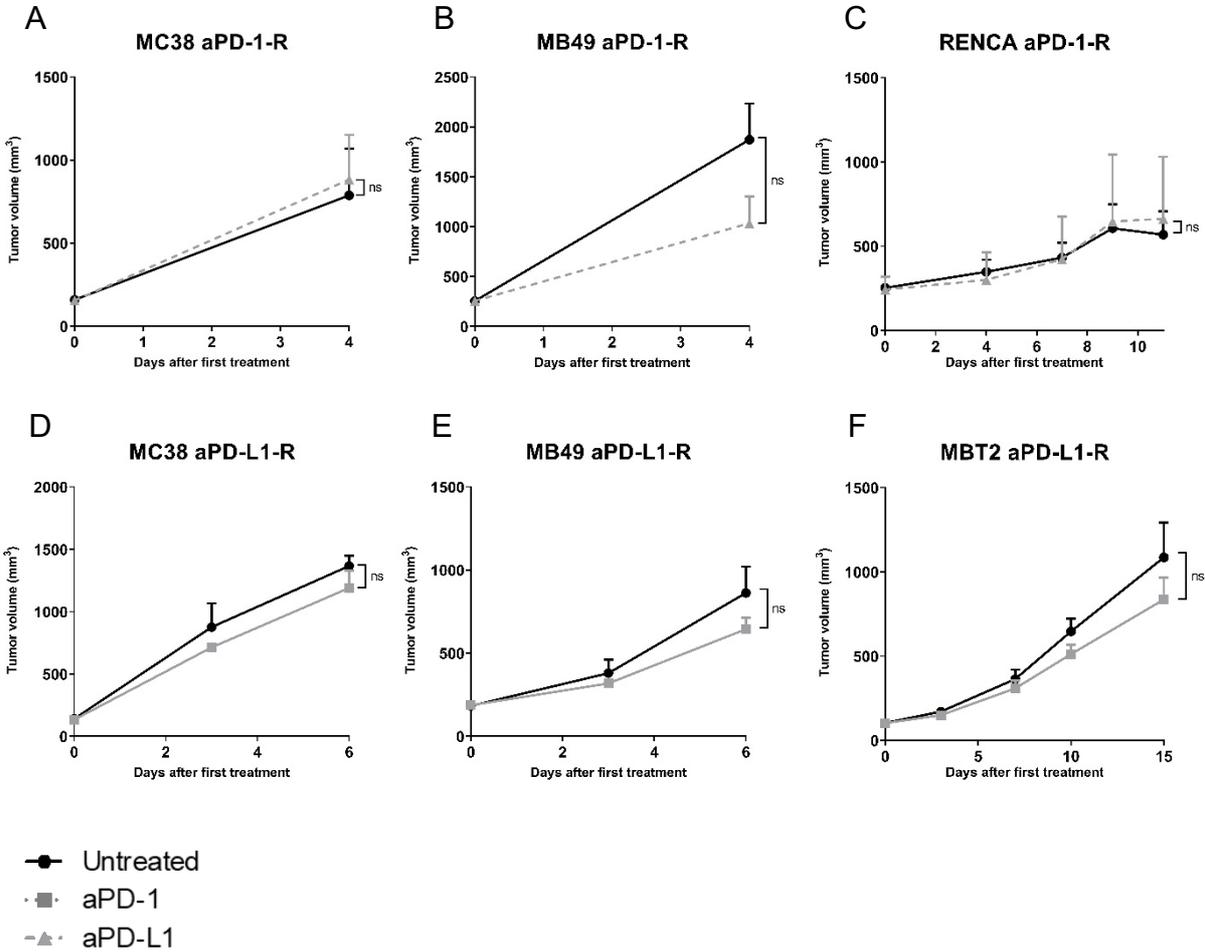
Renin-Angiotensin Signaling	-0,962	*	-1,069		0,447		NA		NA		0		NA		0,5		3,441	*
Retinoate Biosynthesis I	0		0,378	*	NA		1,134		NA									
Retinoic acid Mediated Apoptosis Signaling	-1,387		-1,342		NA		-2,138	*	1,342									
Retinol Biosynthesis	-0,632		-0,378	*	NA		-0,378		NA									
RHOA Signaling	0,507	*	0,5		NA		NA		NA		NA		0,632	*	1,877	*	1,069	*
RHOGDI Signaling	0,343	*	-0,535	*	NA		NA		NA		NA		-1,732	*	-0,962	*	-1,414	*
Role of BRCA1 in DNA Damage Response	-0,5	*	-0,333		NA		1,342		0,378	*								
Role of CHK Proteins in Cell Cycle Checkpoint Control	0,577	*	0	*	NA		-1		1									
Role of Hypercytokinemia/hyperchemokemia in the Pathogenesis of Influenza	-2,53		-3,207	*	NA		NA		NA		NA		2,828	*	-4,082	*	2,496	*
Role of MAPK Signaling in Inhibiting the Pathogenesis of Influenza	0,894		-1,265		0,707	*	NA		NA		0,447		NA		-1,667		-0,277	*
Role of MAPK Signaling in Promoting the Pathogenesis of Influenza	-0,18	*	-0,378		0,378	*	-2,449	*	NA		-1		NA		0		1,213	*
Role of NANOG in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency	-0,535	*	-0,447		NA		-0,447		2,53	*								
Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy	1,069	*	0,2	*	0,707	*	NA		-1		-1,5	*	0,707		1,616	*	3,4	*
Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses	0,243	*	-2,683	*	-0,447		NA		NA		0,447		NA		-2,828	*	3,838	*
Role of PI3K/AKT Signaling in the Pathogenesis of Influenza	0,333		-1,89		-0,447	*	NA		NA		NA		NA		-0,816		1,134	*
Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response	-0,218		-3		-0,447		NA		NA		NA		0,816		-2,858	*	2,132	*
Role of WNT/GSK-3? Signaling in the Pathogenesis of Influenza	0,243	*	0		NA		NA		-2,236	*	-2		NA		2		0	
Salvage Pathways of Pyrimidine Ribonucleotides	0,73	*	-0,277		NA		NA		NA		NA		1		0,5		-0,816	
Semaphorin Neuronal Repulsive Signaling Pathway	-0,447	*	2		NA		NA		NA		0,816		1,667		1,347	*	-2,4	*
Senescence Pathway	1,162	*	0,905	*	1,265		-2,121	*	NA		-1,604	*	0,632		-0,164	*	3,651	*
Signaling by Rho Family GTPases	0,447	*	0	*	-0,816		NA		NA		NA		2,5	*	1,461	*	2,043	*
Sirtuin Signaling Pathway	1,069	*	-0,426		0,378		NA		-1		-0,258	*	1,414		-0,522		-0,243	
Small Cell Lung Cancer Signaling	0,258	*	-1,414		NA		NA		NA		-0,447		NA		-0,378		0,816	*
Sonic Hedgehog Signaling	1,155	*	1,342	*	NA		0		NA									
Sperm Motility	0,365	*	1,069	*	1,342	*	NA		NA		-1,732	*	NA		-0,229	*	1,387	*
Sphingosine-1-phosphate Signaling	1,091		-0,688	*	-0,447		NA		NA		0		1		-0,277		0,832	*
STAT3 Pathway	0	*	-0,577	*	-1,633	*	-2	*	NA		-0,707	*	NA		1,155		1,964	*
Stearate Biosynthesis I (Animals)	-1,069	*	-2,111	*	NA		-1	*	0,447									
Sumoylation Pathway	-1,789	*	-1,807	*	0,447	*	NA		NA		NA		0,447		-0,277		-1,069	*
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	1		3,162	*	NA		NA		NA		-2,646	*	NA		3,357	*	NA	
Superpathway of Geranylgeranyldiphosphate Biosynthesis I (via Mevalonate)	NA		2		NA		NA		NA		-2	*	NA		2,449	*	NA	
Superpathway of Inositol Phosphate Compounds	0,729	*	-0,845	*	-0,447		-1,633	*	NA		-1,414		0,905		2,92	*	1,147	
Superpathway of Methionine Degradation	0		NA		NA		NA		NA		0	*	NA		1		-2,449	*
Superpathway of Serine and Glycine Biosynthesis I	1	*	NA															
Synaptic Long Term Depression	0,457	*	0	*	0,707		-1,342	*	NA		-1,291	*	0,333		1,183	*	1,698	
Synaptic Long Term Potentiation	1,372	*	-0,218	*	0,816		-1		NA		-0,707		NA		0,378	*	2,887	
Synaptogenesis Signaling Pathway	0,426	*	1,48		-2,121		-1,89		NA		-1,069		0,832		1,474	*	3,053	*
Telomerase Signaling	-0,471		-1,732	*	-0,816	*	-1	*	NA		-0,378		NA		-0,302		2,333	
Tetrahydrofolate Salvage from 5,10-methylenetetrahydrofolate	NA		-2	*														

TGFβ Signaling	-0,2	*	1		NA	-2	*	NA		NA		1,265		1,667					
Th1 Pathway	-1,569		-3,71	*	NA			NA		NA		2,236		-3,53	*	2,324	*		
Th2 Pathway	-2,746		-1,789	*	-1			NA		NA		2		-2,065	*	1,414	*		
The Visual Cycle	-0,378		0	*	NA			NA		NA		1				NA			
Thrombin Signaling	1,372	*	-0,447	*	0,378			-1,342		NA		-0,632		NA		0,447		3,128	*
Thrombopoietin Signaling	0,688	*	-0,447		NA			NA		NA		NA		NA		-0,333		3,873	*
Thyroid Cancer Signaling	2,041	*	-1		0	*		-1	*	NA		NA		NA		1,134		3,162	
TNFR1 Signaling	-2,309		-1,897	*	NA			NA		NA		2		-0,302	*	0,577	*		
TNFR2 Signaling	-2,121		0		NA			NA		NA		2	*	1,342		0,707	*		
Toll-like Receptor Signaling	0,302		-1,89	*	NA			NA		NA		2		-1,89		2,111	*		
TREM1 Signaling	-0,577		-3	*	NA			NA		NA		0,447		0,447		-3,5	*	3,771	*
Triacylglycerol Biosynthesis	1,342	*	0	*	NA			NA		NA		NA		NA		1		NA	
Triacylglycerol Degradation	-0,832		-0,333	*	NA			NA		NA		NA		NA		-1,134		NA	
tRNA Charging	3,5	*	-1,342		NA			NA		NA		1		NA		1		-3	*
Tryptophan Degradation III (Eukaryotic)	-0,378	*	0		NA			NA											
Tryptophan Degradation X (Mammalian, via Tryptamine)	NA		-1,134	*	NA			NA		2									
Tumor Microenvironment Pathway	-1,633	*	-1,225	*	-0,447			-2,646	*	NA		0,258	*	1,667		1,134		2,268	*
Tumoricidal Function of Hepatic Natural Killer Cells	0,447		-0,378	*	NA			NA		NA		NA		NA		-0,378	*	NA	
TWEAK Signaling	0,302	*	-0,816		0	*		NA		NA		NA		NA		0,333	*	-1,134	*
Type II Diabetes Mellitus Signaling	-1,706	*	-1,155	*	0	*		NA		NA		1		1		-1,265		2,714	
Unfolded protein response	1,508		0,447		NA			NA		NA		NA		NA		1,069	*	0	
Urate Biosynthesis/Inosine phosphate Degradation 5'	0,447		NA		NA			NA		0	*								
UVA-Induced MAPK Signaling	0,243	*	-2,449		NA			NA		NA		-1,134		NA		0,302	*	2,333	*
UVB-Induced MAPK Signaling	1,069	*	1,134		NA			NA		NA		NA		NA		-1		1,667	*
UVC-Induced MAPK Signaling	-0,577		1		NA			NA		NA		NA		NA		0		2,333	*
Valine Degradation I	-0,378	*	0	*	NA			NA											
VDR/RXR Activation	-1,213	*	-1,667	*	NA			NA		NA		1		1	*	-0,632	*	0	*
VEGF Family Ligand-Receptor Interactions	1,342		-0,378		-0,447	*		-2	*	NA		-1,342		NA		-0,378		2,496	*
VEGF Signaling	0,229		-2,121		NA			NA		NA		2,236		2,53		1,897	*		
Vitamin-C Transport	-0,378	*	NA		NA			NA		NA		0	*	-1	*	-0,816	*	NA	
White Adipose Tissue Browning Pathway	0,174	*	1,698		0,816	*		NA		NA		-1,897	*	0,632		1,826	*	1,604	
WNT/?-catenin Signaling	1,021	*	-1,147		NA			0,447	*	-2,121	*	-1,667		1,897		1		0,5	
WNT/Ca+ pathway	2,294	*	0		NA			NA		NA		-1,633	*	NA		1,414		NA	
Xenobiotic Metabolism AHR Signaling Pathway	-0,447		-2,111		NA			NA		NA		-1,134	*	-1,633		0		-0,632	
Xenobiotic Metabolism General Signaling Pathway	-0,324	*	-0,905		-0,816	*		-2		NA		-1,414		-0,816		0,728		3,273	*
Xenobiotic Metabolism PXR Signaling Pathway	-0,438	*	-0,192	*	-0,816			-2		NA		-0,632		-0,577		0,354	*	0,258	
α-Adrenergic Signaling	0,277	*	0	*	NA			NA		NA		NA		NA		0,905	*	3	*
γ-glutamyl Cycle	-0,333	*	NA		NA			NA											
γ-linolenate Biosynthesis II (Animals)	-0,333	*	-0,447	*	NA			NA		NA		NA		NA		-1		NA	

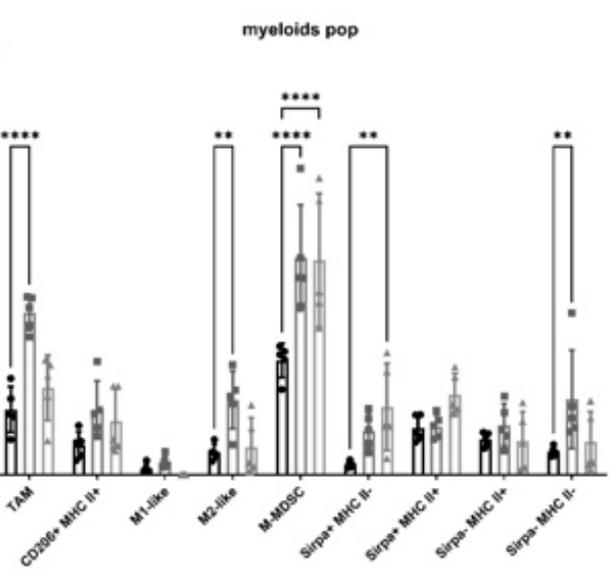
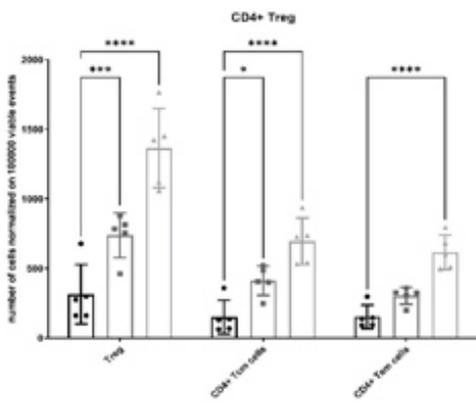
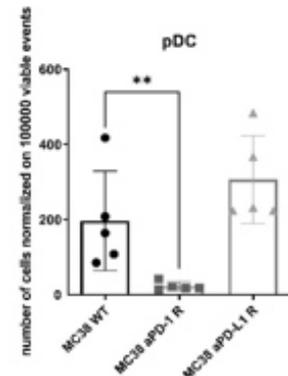
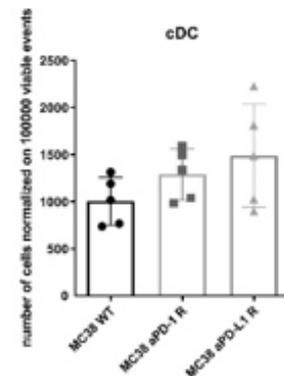
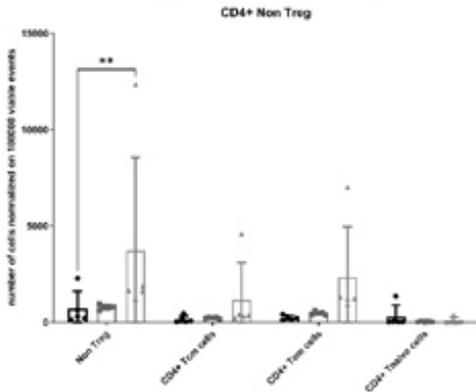
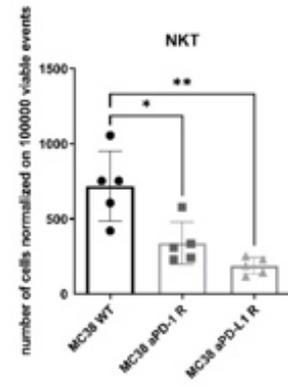
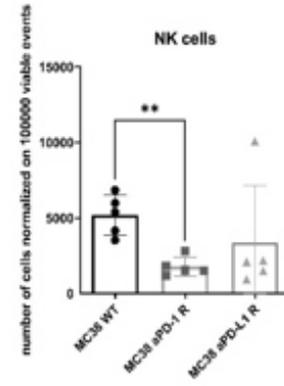
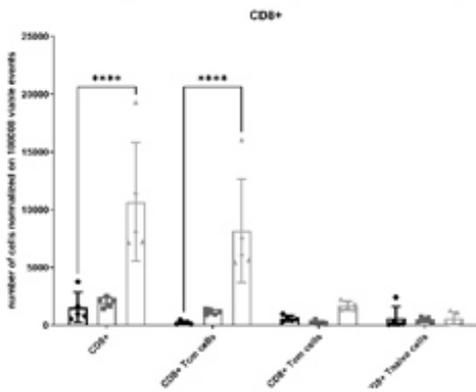
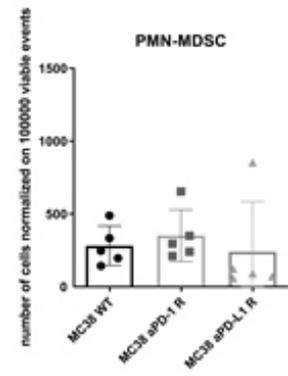
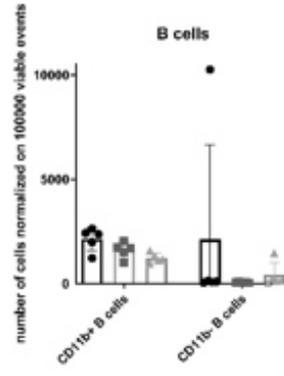
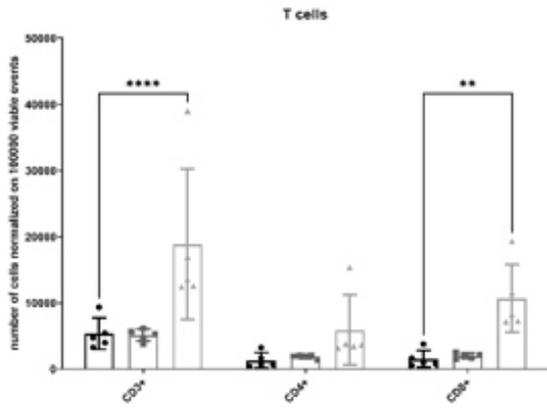


**Figure S1. Individual data for wild type and resistant models.** For all models when tumors reached 150 mm<sup>3</sup>, mice were randomized and treated with aPD-1 (BioXCell, 12.5 mg/kg per week) or aPD-L1 (BioXCell, 12.5 mg/kg per week). (B) MC38, colorectal cancer. (C) MB49,

bladder cancer. (D) RENCA, kidney cancer. (E) TyrNras, melanoma cancer. (F) MBT2, bladder cancer. Data shown are mean tumor volume values, n=4 or 6 mice/group.

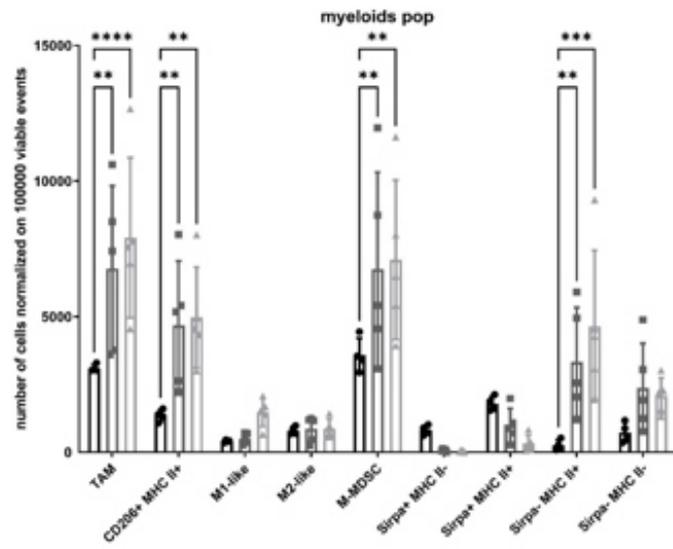
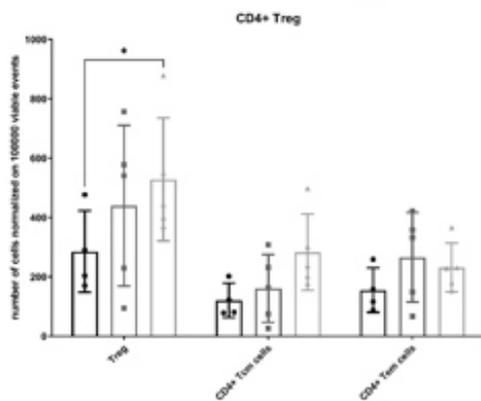
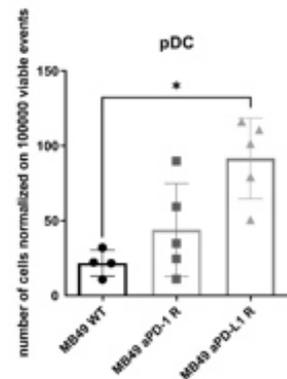
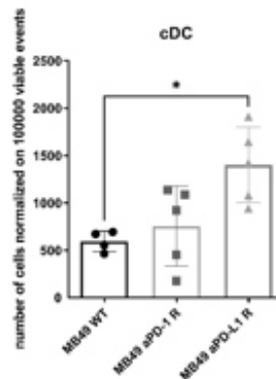
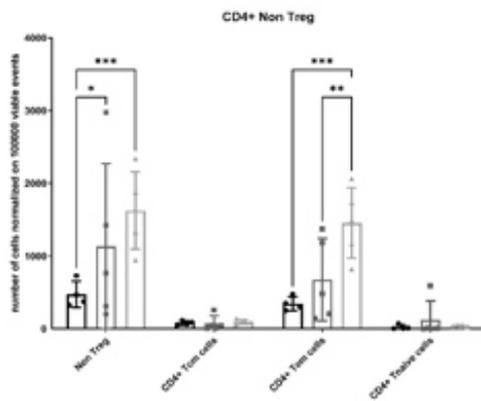
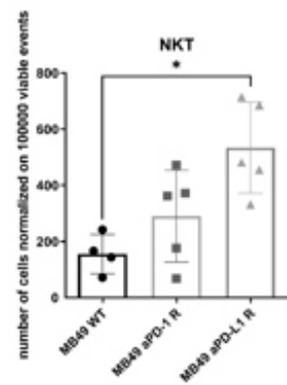
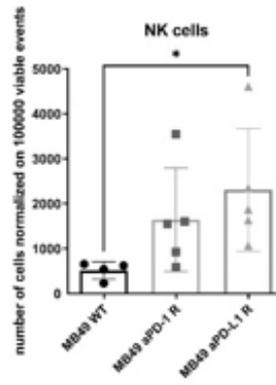
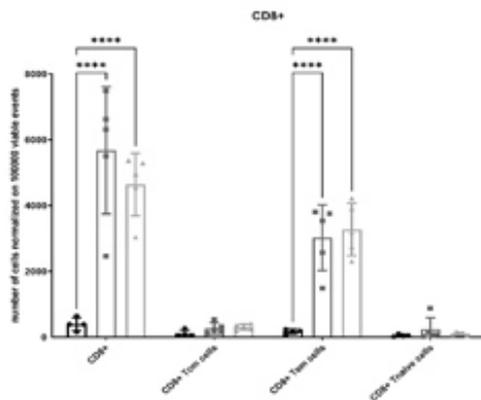
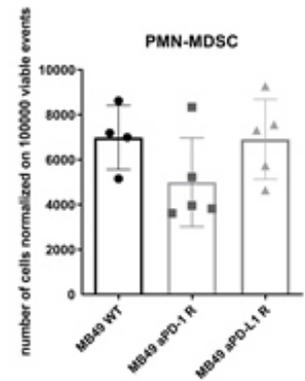
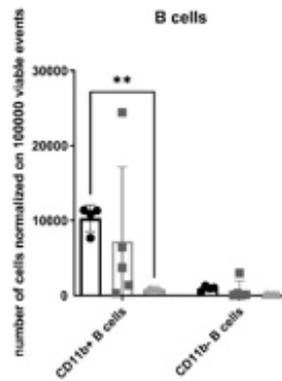
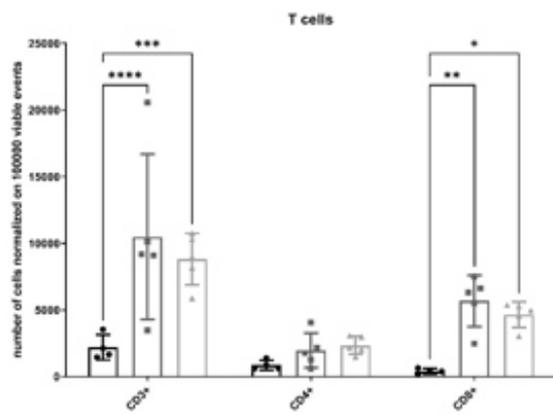


**Figure S2. In vivo cross-resistance assay with aPD-1 or aPD-L1 antibodies.** (A) aPD-1-R tumors were implanted in naïve mice and treated with aPD-L1 (BioXCell, 12.5 mg/kg per week). (B) aPD-L1-R tumors were implanted in naïve mice and treated with aPD-1 (BioXCell, 12.5 mg/kg per week). Data shown are mean tumor volume values and error bars are ± SEM n=4 to 6 mice/group, ns, not significant using Mann Whitney t-test.



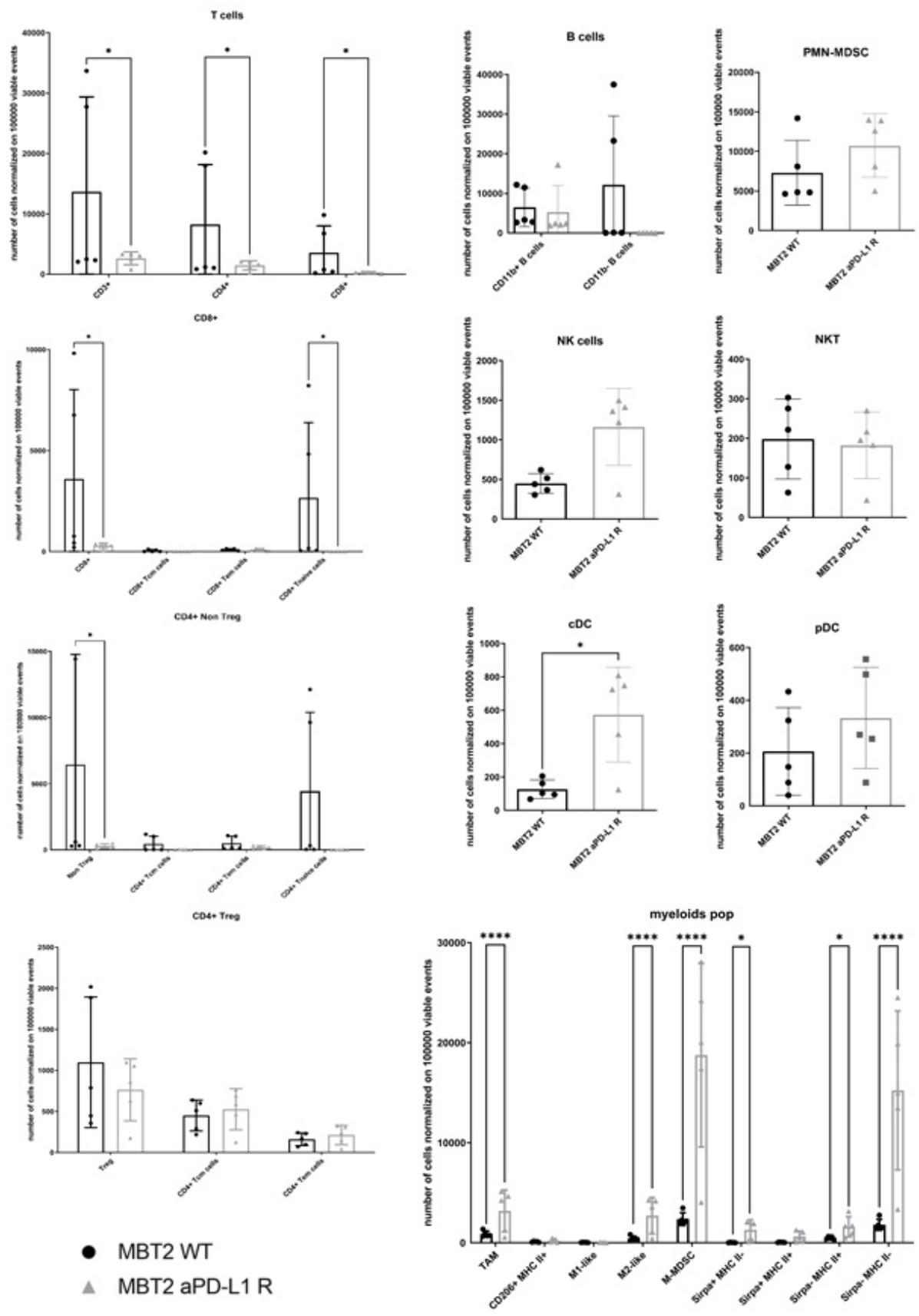
- MC38 WT
- MC38 aPD-1 R
- ▲ MC38 aPD-L1 R

**Figure S3. Alterations in immune cell infiltrate after the acquisition of resistance to aPD-1 and aPD-L1 in MC38 tumors.** For all models, tumor pieces were implanted in naïve mice and when tumors reached 200 mm<sup>3</sup> tumors, flow cytometry analysis was performed. Histograms for each immune population were performed after normalization of the number of cells in 100,000 viable events. For T cells, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> non Treg, CD4<sup>+</sup> Treg and myeloid populations, significant decreases and increases were assessed by a two-way ANOVA statistical test, with Bonferroni post-hoc test. For B cells, PMN-MDSC, NK cells, NKT, cDC and pDC significant decreases and increases were assessed by Mann-Whitney t-test. n=5 tumors per group. \*: p<0.05 \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001, \*\*\*\*: p<0.0001.

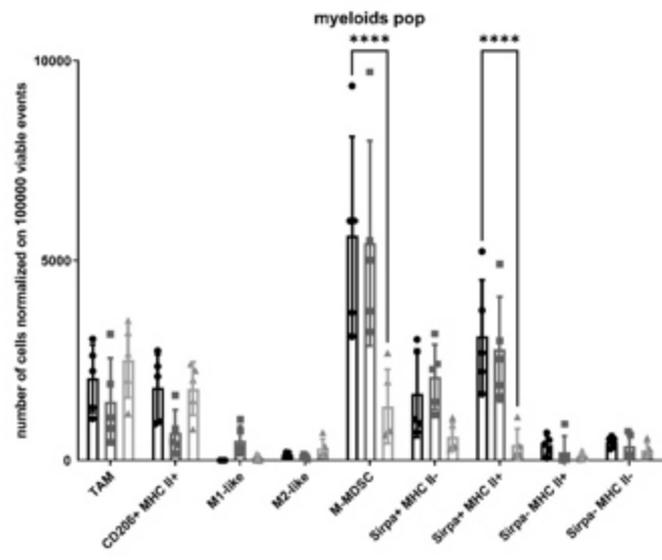
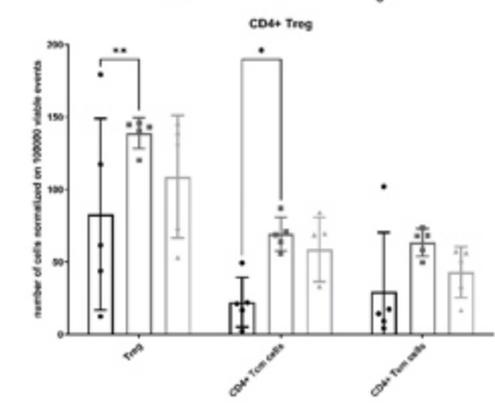
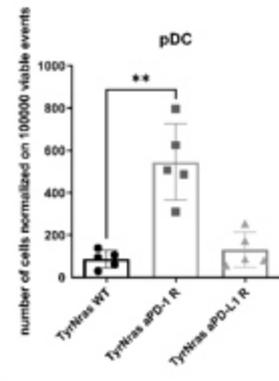
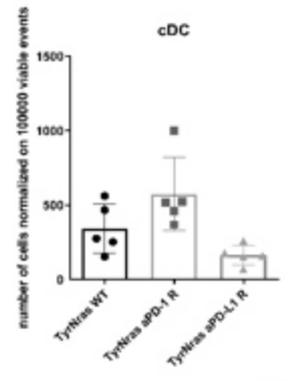
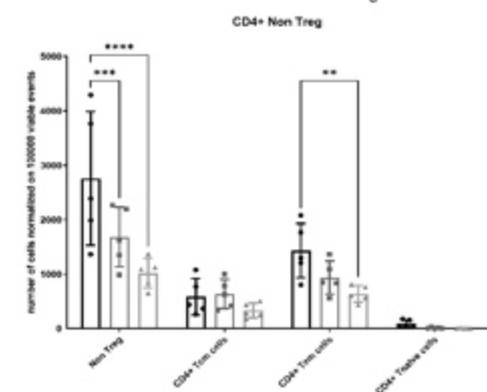
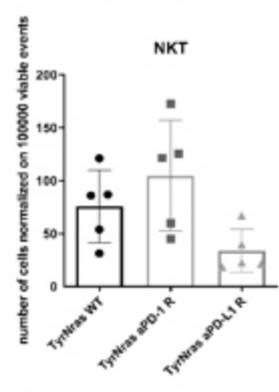
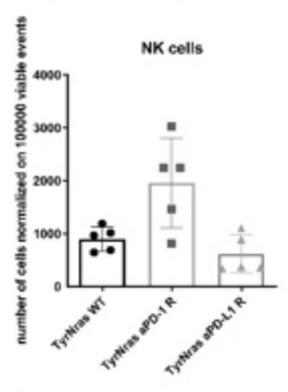
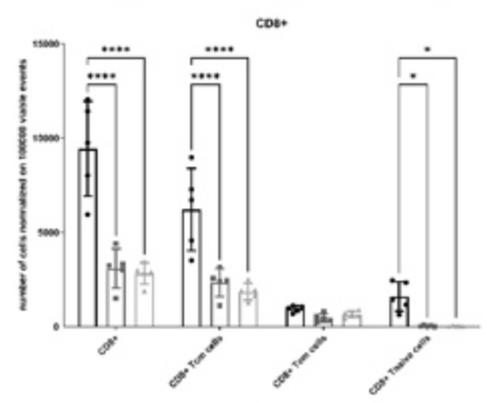
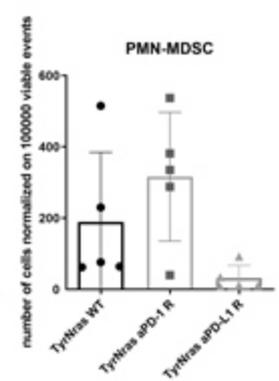
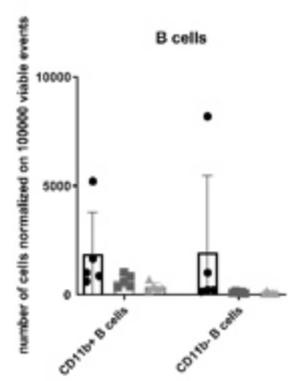
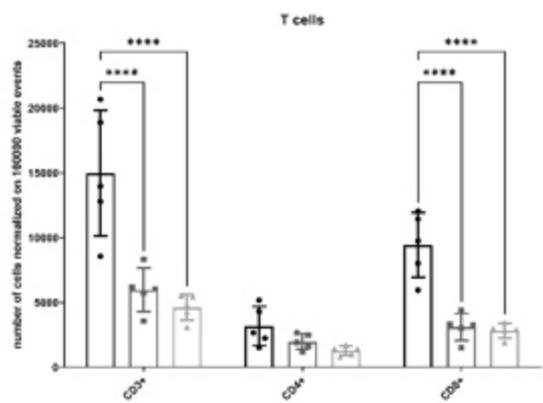


- MB49 WT
- MB49 aPD-1 R
- ▲ MB49 aPD-L1 R

**Figure S4. Alterations in immune cell infiltrate after the acquisition of resistance to aPD-1 and aPD-L1 in MB49 tumors.** For all models, tumor pieces were implanted in naïve mice and when tumors reached 200 mm<sup>3</sup> tumors, flow cytometry analysis was performed. Histograms for each immune population were performed after normalization of the number of cells in 100,000 viable events. For T cells, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> non Treg, CD4<sup>+</sup> Treg and myeloid populations, significant decreases and increases were assessed by a two-way ANOVA statistical test, with Bonferroni post-hoc test. For B cells, PMN-MDSC, NK cells, NKT, cDC and pDC significant decreases and increases were assessed by Mann-Whitney t-test. n=5 tumors per group. \*: p<0.05 \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001, \*\*\*\*: p<0.0001.

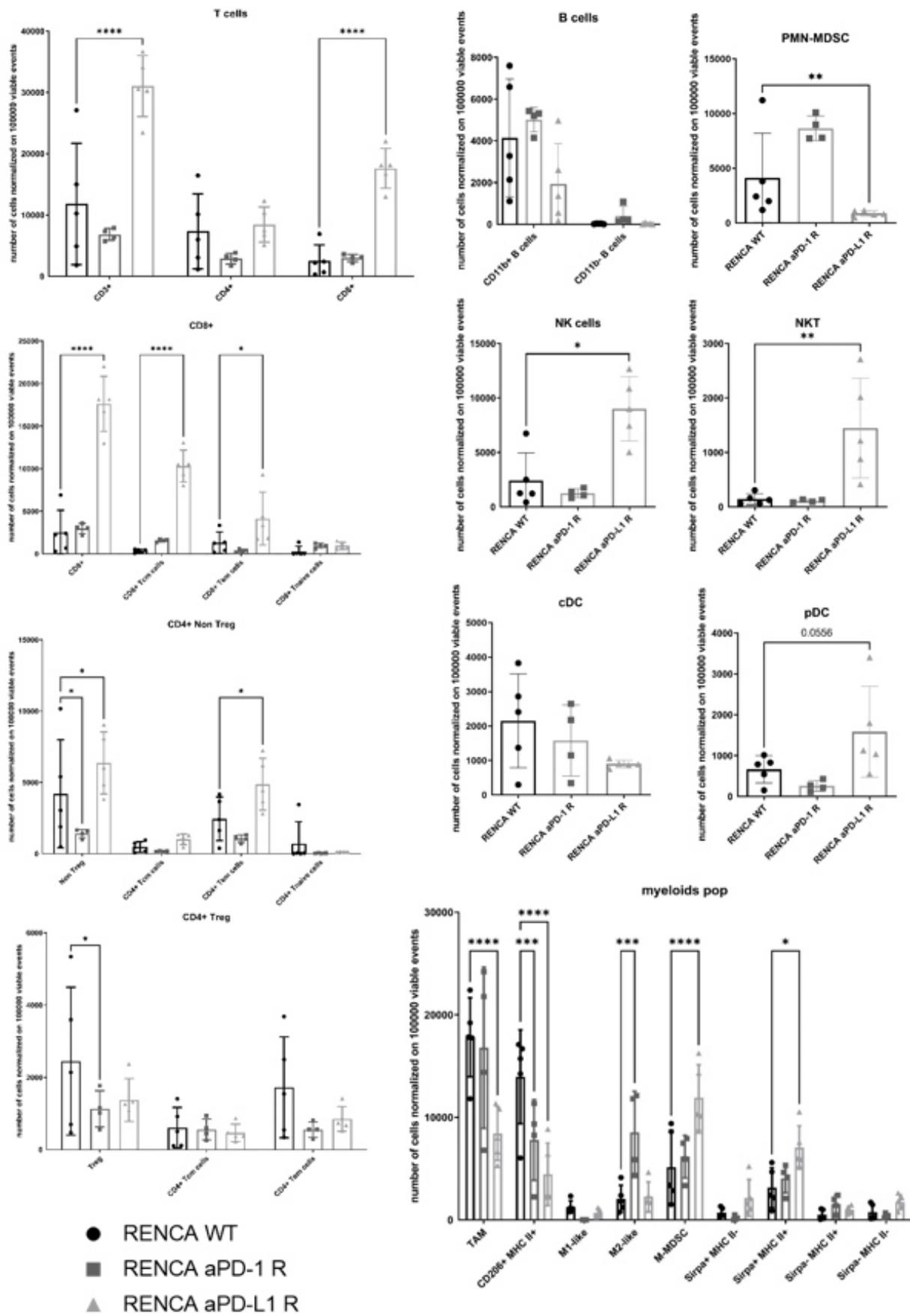


**Figure S5. Alterations in immune cell infiltrate after the acquisition of resistance to aPD-L1 in MBT2 tumors.** For all models, tumor pieces were implanted in naïve mice and when tumors reached 200 mm<sup>3</sup> tumors, flow cytometry analysis was performed. Histograms for each immune population were performed after normalization of the number of cells in 100,000 viable events. For T cells, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> non Treg, CD4<sup>+</sup> Treg and myeloid populations, significant decreases and increases were assessed by a two-way ANOVA statistical test, with Bonferroni post-hoc test. For B cells, PMN-MDSC, NK cells, NKT, cDC and pDC significant decreases and increases were assessed by Mann-Whitney t-test. n=5 tumors per group. \*: p<0.05 \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001, \*\*\*\*: p<0.0001.

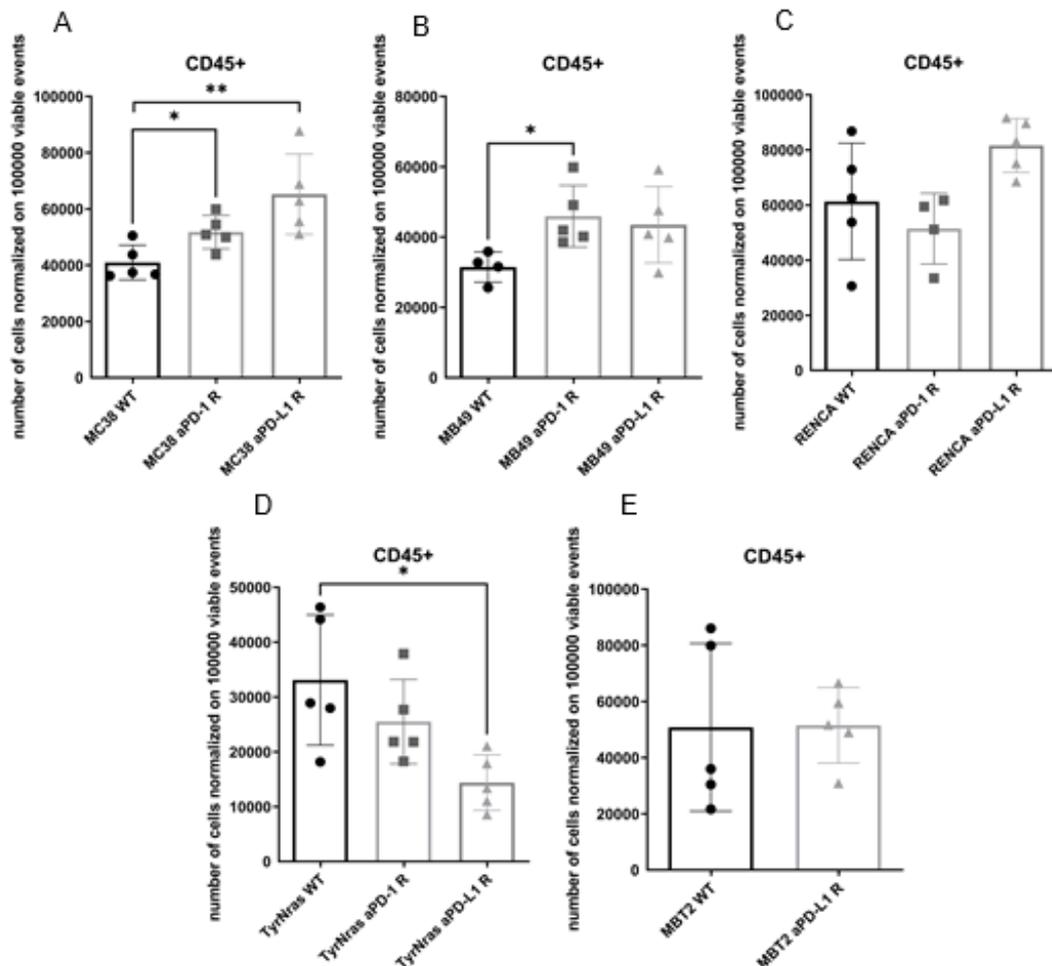


- TyrNras WT
- TyrNras aPD-1 R
- ▲ TyrNras aPD-L1 R

**Figure S6. Alterations in immune cell infiltrate after the acquisition of resistance to aPD-1 and aPD-L1 in TyrNras tumors.** For all models, tumor pieces were implanted in naïve mice and when tumors reached 200 mm<sup>3</sup> tumors, flow cytometry analysis was performed. Histograms for each immune population were performed after normalization of the number of cells in 100,000 viable events. For T cells, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> non Treg, CD4<sup>+</sup> Treg and myeloid populations, significant decreases and increases were assessed by a two-way ANOVA statistical test, with Bonferroni post-hoc test. For B cells, PMN-MDSC, NK cells, NKT, cDC and pDC significant decreases and increases were assessed by Mann-Whitney t-test. n=5 tumors per group. \*: p<0.05 \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001, \*\*\*\*: p<0.0001.



**Figure S7. Alterations in immune cell infiltrate after the acquisition of resistance to aPD-1 and aPD-L1 in RENCA tumors.** For all models, tumor pieces were implanted in naïve mice and when tumors reached 200 mm<sup>3</sup> tumors, flow cytometry analysis was performed. Histograms for each immune population were performed after normalization of the number of cells in 100,000 viable events. For T cells, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> non Treg, CD4<sup>+</sup> Treg and myeloid populations, significant decreases and increases were assessed by a two-way ANOVA statistical test, with Bonferroni post-hoc test. For B cells, PMN-MDSC, NK cells, NKT, cDC and pDC significant decreases and increases were assessed by Mann-Whitney t-test. n=5 tumors per group. \*: p<0.05 \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001, \*\*\*\*: p<0.0001.



**Figure S8. CD45<sup>+</sup> leucocytes immune cell infiltrate after the acquisition for all resistance tumor models.** For all models, tumor pieces were implanted in naïve mice and when tumors reached 200 mm<sup>3</sup> tumors, flow cytometry analysis was performed. Histograms for each immune population were performed after normalization of the number of cells in 100,000 viable events. (A) MC38 models, (B) MB49 models, (C) RENCA models, (D) TyrNras models, (E) MBT2 models. Significant decreases and increases were assessed by Mann-Whitney t-test. n=5 tumors per group. \*: p<0.05 \*\*: p<0.01.

### 3. Conclusion

Dans cet article, nous avons développé et caractérisé des modèles précliniques de résistance acquise aux anti-PD-1 et anti-PD-L1 pour 4 sous-types de cancers différents à l'aide de 5 lignées syngéniques (MC38, MB49, MBT2, TyrNras et RENCA). Cet article a eu pour objectif de décrire, de manière approfondie, le microenvironnement immunitaire tumoral de chaque modèle ainsi que les altérations génétiques. Ces résultats ont démontré que le microenvironnement immunitaire tumoral était « modèle dépendant ». De même, les voies de signalisations dérégulées sont propres à chaque modèle. Également, les mécanismes de résistances sous-jacents peuvent être contournés à l'aide de combinaisons thérapeutiques ciblant les cellules immunitaires régulées à la hausse, dans les modèles résistants par rapport aux modèles sensibles.

L'utilisation de différents sous-types permet de faire un parallèle avec l'hétérogénéité tumorale qui existe chez l'Homme. En effet, les mécanismes de résistance sous-jacents sont certainement très nombreux et probablement très différents en fonction du sous-type tumoral. De ce fait, un modèle comme MC38 connu pour avoir un fort TMB et un modèle comme MB49 avec très peu de gènes différentiellement altérés n'engendreront probablement pas les mêmes mécanismes pour résister aux ICIs.

Ces différents modèles ne doivent donc pas être utilisés de manière uniforme. En fonction de la problématique, le choix du modèle sera primordial. Notamment, comme évoqué dans l'introduction, de nombreux essais de combinaisons thérapeutiques avec anti-PD-1 ou anti-PD-L1 sont en cours. Ces modèles, ayant un fort pouvoir prédictif, peuvent aider à mieux cibler quelle combinaison aura le plus de chance de fonctionner et sous quelles indications.

Également, nous avons choisi de faire un immunophénotypage de nos modèles à l'état basal. Il serait intéressant d'effectuer une étude longitudinale avec des points de prélèvements à des temps plus tardifs et post traitements. Ceci permettrait de mieux cibler quelles cellules immunitaires sont prédominantes tout au long du développement et par conséquent quelle thérapie serait la plus susceptible de fonctionner pour contrer la résistance aux ICIs. Entre

autres, nous avons testé un anticorps ciblant le TNF $\alpha$  mais beaucoup de thérapies prometteuses ciblant les récepteurs de la superfamille de TNF sont également à l'étude. De ces thérapies, nous pouvons citer des anticorps ciblant GITR qui permettent une polarisation des lymphocytes T CD4 en Th1<sup>453,454</sup> et OX40 et 4-1BB, qui activent les lymphocytes<sup>455</sup>. Celles-ci étant déjà en essai clinique, une preuve de concept sur nos modèles résistants pourrait être un argument fort pour tester ces combinaisons sur des patients réfractaires.

S'agissant des limites que nous pouvons soulever, la stabilité des modèles en fait partie. Ces modèles ont été créés sur plusieurs années : depuis 2017, il est bien évidemment difficile de penser que les modèles utilisés aujourd'hui puissent être identiques à ceux de 2017. Notre laboratoire a consciencieusement congelé des morceaux de tumeurs à force de passage. Il serait donc intéressant, dans une future expérience, d'étudier si un changement phénotypique a opéré durant ces années et dans quelle mesure. De plus, notre laboratoire a fait l'effort de génotyper récemment toutes les lignées cellulaires que nous possédons. Si l'étude du changement phénotypique révèle une dérive importante, il est tout à fait possible de recréer des modèles résistants. En effet, si nous souhaitons à terme commercialiser nos modèles, il faudra que nous puissions être en mesure de savoir quel type de changement phénotypique et génétique nos modèles détiennent à l'instant t.

Un autre point sur lequel nous pouvons faire un focus est notre technique de maintien très particulière des modèles étant donné qu'elle s'effectue *in vivo*. En effet, l'une des expériences que nous avons réalisées, d'un point de vue purement technique, a consisté à récupérer des tumeurs résistantes qui, une fois broyées, dissociées, transformées en suspension cellulaire et réinjectées chez la souris, ont retrouvé une sensibilité partielle aux ICIs. De ce constat, une explication pourrait être que la structure soutienne la résistance. Il serait intéressant, dans des futures investigations, de tester le *stiffness* de nos tumeurs, qui pourrait être en lien direct avec la résistance aux ICIs. En effet, de nombreuses recherches se sont intéressées à comprendre l'impact des composants de la matrice extracellulaire sur le raidissement tumoral<sup>456,457</sup>. Une récente étude a démontré que la migration des lymphocytes T et l'anti-PD-

1 étaient plus efficace suite à l'inhibition de la lysyl oxidase (LOX) qui stabilise les fibres de collagène<sup>458</sup>.

Nos modèles confirment également l'importance des voies déjà décrites comme impliquées dans la résistance secondaire tel que PTEN, IFN $\gamma$  ou encore JAK/STAT. Cependant, celles-ci ne sont pas altérées dans l'ensemble des modèles. Ceci nous incite donc à croire que les autres voies que nous avons détectées comme sur ou sous-exprimées dans nos modèles pourraient également soutenir la résistance aux ICIs. L'implication de ces différentes voies mériterait d'être étudiée en profondeur dans un futur proche.

## Chapitre III. Résultats

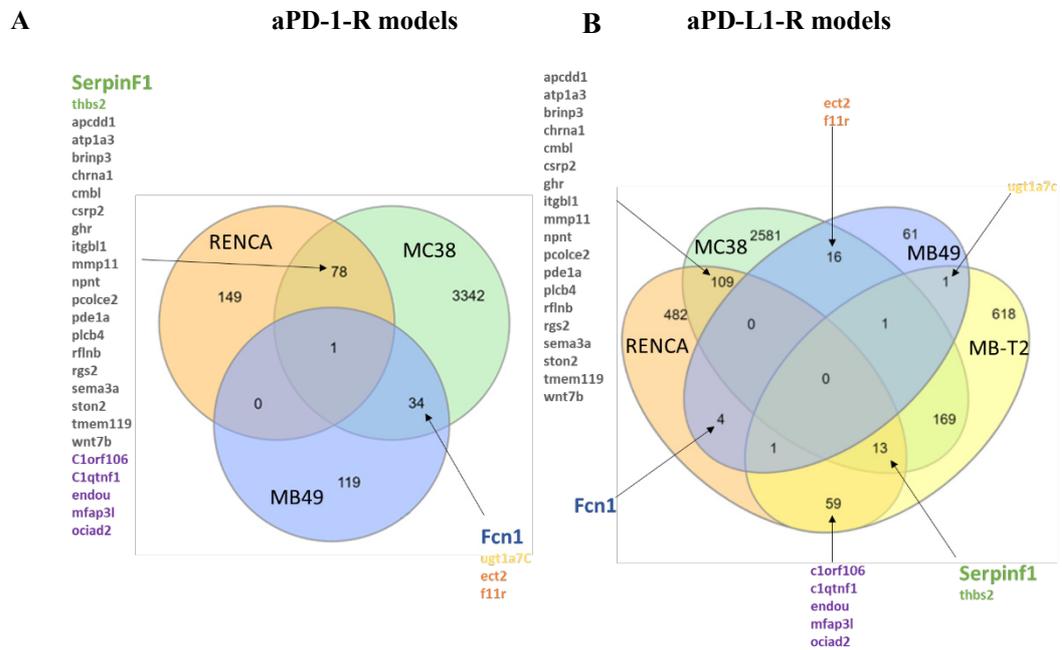
### Identification d'un gène *SERPINF1* impliqué dans la résistance à l'anti-PD-1

#### 1. Introduction

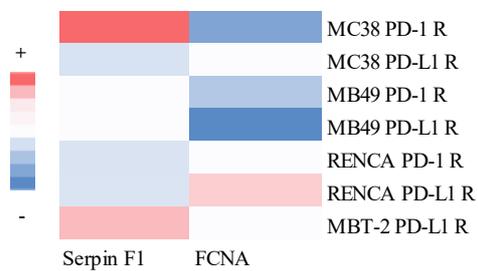
Suite à la caractérisation des modèles dans l'article précédemment discuté, nous avons cherché à comprendre quel mécanisme pouvait être impliqué dans cette résistance. Pour déceler les mécanismes de résistance sous-jacents, nous nous sommes focalisés sur l'analyse des RNAseq. L'objectif de cette étude a été d'identifier des gènes, ou des voies de signalisation, impliqués dans le phénotype de résistance. Les buts de cette démarche sont de proposer un nouveau biomarqueur utilisable chez les patients, et d'obtenir des pistes pour tester de nouvelles alternatives thérapeutiques.

Cette étude s'est effectuée en plusieurs temps. Au début de ma thèse, nous avions à notre disposition le RNAseq de 4 des 5 modèles, à savoir MC38, MB49, MBT2 et RENCA. Le modèle TyrNras n'a été séquencé que récemment. De ce fait, nous avons d'abord identifié plusieurs gènes en commun dans les 4 premiers modèles à l'aide des diagrammes de Venn (Figure 37A et 37B). De cette première analyse nous nous sommes concentrés sur *SERPINF1*, *FCNA* et *UGT1a7c*. Rapidement, pour des problèmes techniques, nous avons abandonné l'étude d'*UGT1a7c* pour nous focaliser sur les deux autres précédemment cités. De plus, nous avons choisi de nous concentrer sur l'étude de ces gènes dans un des modèles à savoir MC38. En effet, cette lignée est très souvent utilisée dans notre laboratoire ce qui nous permet d'avoir un recul sur le moindre changement de la pousse tumorale. Il est à noter que cette lignée est extrêmement utilisée dans la communauté scientifique. Ceci nous a semblé être un bon point de départ pour essayer de comprendre l'éventuelle implication de ces gènes dans le mécanisme de résistance aux ICIs. Après avoir validé leurs expressions protéiques dans MC38

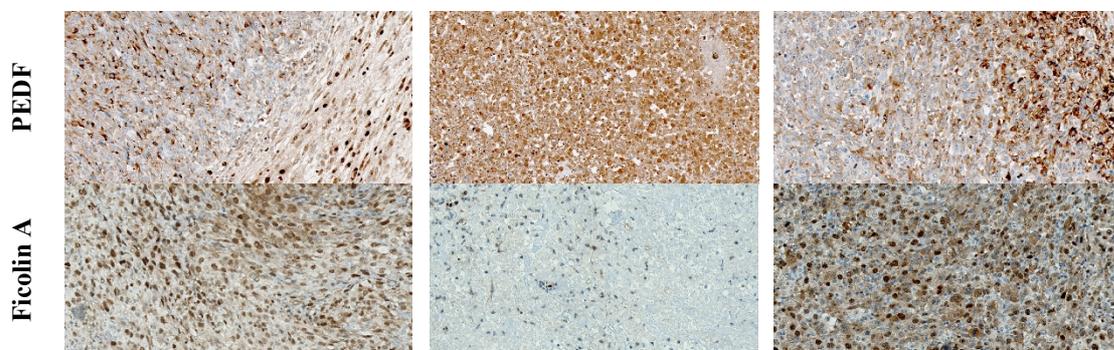
pour confirmer le RNAseq (Figure 37C et 37D), nous avons voulu vérifier leurs implications fonctionnelles en modifiant leurs expressions dans les lignées parentales.



**C RNAseq**



**D MC38 Wild Type MC38 aPD-1-R MC38 aPD-L1-R**



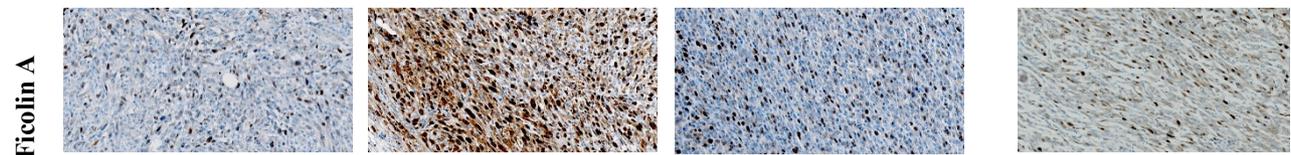
**Figure 37. Identification des gènes altérés *SERPINF1* et *FCNA* dans les modèles aPD-1-R et aPD-L1-R par analyse du RNAseq.** Diagramme de Venn de la modulation de l'expression des gènes partagés avec en (A) les modèles résistants à l'anti-PD-1, MC38, MB49 et RENCA et (B) les modèles résistants à l'anti-PD-L1 MC38, MB49, MBT2 et RENCA avec une p.value<0,05 et un *fold change* de  $\pm 1,5$ . Les gènes *SERPINF1* et *FCNA* ont été identifiés comme gènes d'intérêts. (C) *Heatmap* de la modulation d'expression de *SERPINF1* et de *FCNA* par rapport à l'expression des modèles WT (D) Immunohistochimie de PEDF et de la Ficolin A dans les tumeurs MC38 WT, MC38 aPD-1-R et MC38 aPD-L1-R.

Tout d'abord concernant *FCNA*, nous avons réalisé des lignées sur ou sous-exprimant ce gène à l'aide d'une transfection d'un vecteur pcDNA3.1-*FCNA* ou de la technique CRISPR/Cas9, respectivement.

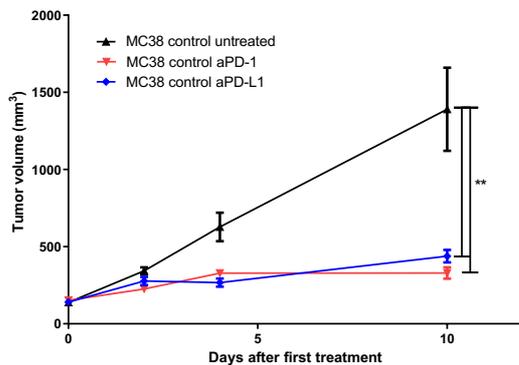
Après vérification par immunohistochimie de l'altération de l'expression de la *FCNA* dans les lignées correspondantes MC38 (Figure 38A), nous avons testé la sensibilité de ces lignées aux ICIs. Il est tout d'abord important de noter que les lignées contrôles sont partiellement sensibles aux ICIs comme attendu (Figure 38B, 38C). Ensuite pour les lignées avec *FCNA* modulé, nous avons observé que lorsque ce gène est surexprimé, la sensibilité aux ICIs ne diffère pas du modèle WT (Figure 38D) alors qu'en absence de celui-ci, MC38 n'est plus sensible aux ICIs (Figure 38E). Cette observation est en corrélation avec le modèle MC38 résistant à l'anti-PD-1 qui sous-exprime *FCNA*.

A MC38 pcDNA3.1 empty MC38 *FCN1*<sup>+</sup>

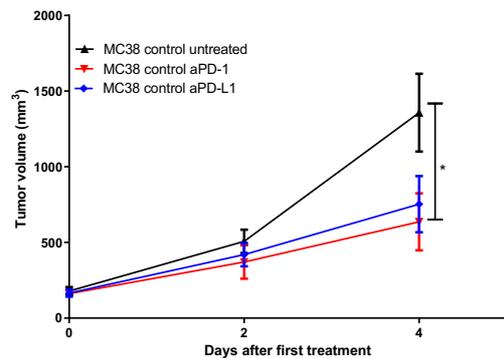
MC38 CRISPR/Cas9 empty MC38 *FCN1*<sup>-</sup>



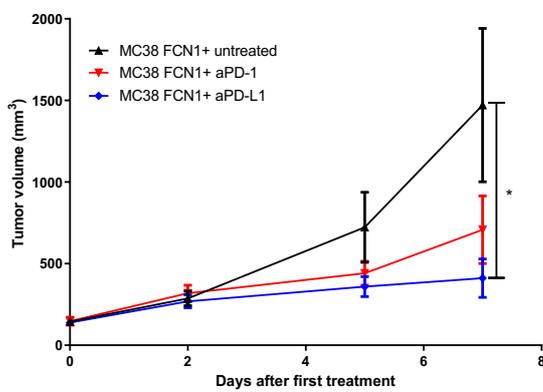
B MC38 Control pcDNA3.1+



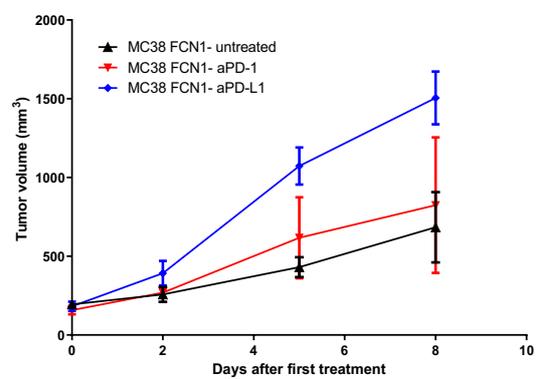
C MC38 Control CRISPR/Cas9



D MC38 *FCN1*<sup>+</sup>



E MC38 *FCN1*<sup>-</sup>



**Figure 38. Profil de sensibilité à l'anti-PD-1 et l'anti-PD-L1 observé lors de la modulation de l'expression du gène *FCNA*.** (A) Analyse IHC pour la Ficolin-A dans des tumeurs représentatives MC38 contrôle, MC38 *FCN1*<sup>+</sup> et MC38 *FCN1*<sup>-</sup>. Pour chaque expérience *in vivo*, les lignées cellulaires ont été injectées par voie sous-cutanée dans des souris naïves, lorsque les tumeurs ont atteint 150 mm<sup>3</sup>, les souris ont été randomisées et traitées avec anti-PD-1 (BioXCell, 12,5 mg/kg 1 fois par semaine) ou anti-PD-L1 (BioXCell, 12,5 mg/kg 1 fois par semaine). (B) Lignées cellulaires MC38 Contrôle pcDNA3.1+ (C) Lignées cellulaires MC38 Contrôle CRISPR/Cas9 (D) Lignées cellulaires MC38 *FCN1*<sup>+</sup> (E) Lignées cellulaires MC38 *FCN1*<sup>-</sup> Les données présentées sont des valeurs moyennes de volume tumoral et les barres d'erreur  $\pm$  SEM. n=4 ou 5 souris/groupe, \* : p<0,05 \*\* : p<0,01, t-test de Mann Whitney.

Bien que *FCNA* mériterait une étude approfondie de son fonctionnement et de son implication éventuelle dans les mécanismes de résistance aux ICIs, nous nous sommes par la suite focalisés sur l'étude du gène *SERPINF1* uniquement. En effet, nous avons réalisé la même expérience pour le gène *SERPINF1* : les résultats fulgurants obtenus nous ont amené à consacrer nos efforts sur l'étude de la *SERPINF1*. De plus, les récents résultats du RNAseq du

modèle TyrNras nous ont permis d'établir une liste de 11 gènes ayant leurs expressions modulées, en fonction de leurs modèles WT, dans au moins 2 modèles appariés (aPD-1/aPD-L1) et un modèle supplémentaire. Le gène *FCNA* ne fait pas partie de cette liste contrairement au gène *SERPINF1*.

L'étude de ce gène a permis la production d'un article en cours de finalisation avec des données en cours de production. Nos premiers résultats indiquent que la surexpression de la *SERPINF1* semble être fortement corrélée à un mécanisme de résistance aux ICI.

*SERPINF1* code pour la protéine PEDF. Cette glycoprotéine endogène de 50 kDa codée par le gène sérine clade F1 des inhibiteurs de protéases (*SERPINF1*) est un membre de la superfamille des inhibiteurs de protéases à sérine ; elle a d'abord été isolée de cellules épithéliales pigmentaires de la rétine fœtale humaine. Cette protéine est décrite comme multifonctionnelle. Son implication dans le développement du cancer est controversée. De nombreuses études décrivent un rôle anti-tumoral grâce à sa fonction anti-angiogénique et anti-métastatique<sup>459-463</sup>. Cependant, PEDF peut aussi avoir un rôle pro-tumoral. Il a été démontré que PEDF pouvait induire une résistance à l'insuline en modifiant le métabolisme cellulaire; son augmentation a également été associée à un mauvais pronostic dans le cancer de l'œsophage, le cancer touchant les cellules souches de gliome et le cancer hépatocellulaire<sup>464,465</sup>. Une étude a montré que son rôle dual pouvait être lié à sa localisation extra ou intracellulaire, cela engendrant par conséquent différentes fonctions. Ils ont identifié que l'action de PEDF en intracellulaire causait l'accumulation d'acides gras libres, tandis que l'action de PEDF en extracellulaire permettrait une inhibition de l'angiogénese<sup>466</sup>. Les mécanismes moléculaires par lesquels PEDF exerce ses fonctions sont mal connus. Les partenaires à ce jour identifiés sont ATGL (phospholipase adipeuse triglycéride lipase), le récepteur de la laminine, LRP6 co-récepteur de la voie WNT, les récepteurs PLXDC1/PLXDC2, des composants de la matrice extracellulaire tels que les protéoglycanes héparine/héparane sulfate, les collagènes et l'hyaluronane et afin une ATPase-F1<sup>467</sup>.

Dans nos travaux, nous avons tout d'abord confirmé le rôle fonctionnel de la *SERPINF1* à l'aide de deux modèles MC38 et MBT2. En effet, en sous exprimant ce gène, suite au traitement

avec l'anti-PD-1, nous avons obtenu une rémission complète des tumeurs dans le modèle MC38 ainsi qu'une réponse partielle dans le modèle MBT2 normalement insensible à cette thérapie. A l'inverse une surexpression de la *SERPINF1* dans le modèle MC38 a induit un phénotype de résistance à l'anti-PD-1.

Nous avons ensuite cherché à montrer que le rôle de la *SERPINF1* et donc de PEDF, dans le modèle MC38 résistant à l'anti-PD-1 était lié à la voie de synthèse des lipides. Nous avons identifié une augmentation de la quantité d'ATGL (partenaire de PEDF) dans le modèle MC38 résistant à l'anti-PD-1. Puis, nous avons mesuré la quantité d'acides gras dans chacune des tumeurs issues des lignées cellulaires modifiées MC38 et effectué un marquage *red oil*. Ces expériences semblent indiquer une augmentation de la quantité d'acides gras dans les cellules tumorales lorsque la *SERPINF1* est augmentée.

L'objectif a ensuite été de relier cette augmentation de la quantité de lipides à la résistance acquise à l'anti-PD-1 dans le modèle MC38. L'idée a été de comprendre comment cela pouvait jouer un rôle sur la résistance à l'ICI. Nous avons donc effectué un immunophénotypage de nos tumeurs. Cette expérience a révélé que la population immunitaire lymphocytaire T CD8+ était affectée par la présence ou non de la *SERPINF1*. En effet, une corrélation inversée de la présence de CD8+ et de l'absence de la *SERPINF1* a été mesurée. Nous avons donc par la suite testé un inhibiteur de la synthèse lipidique, l'Orlistat sur le modèle MC38 aPD-1-R. L'Orlistat est un inhibiteur de l'ATGL. La combinaison avec l'anti-PD-1 a montré une réversion de la résistance.

Cet article est en cours de finalisation et devrait être soumis dans *Cancer Research*, en début d'année 2022.

## 2. Article

### **Enhanced *SERPINF1* dependent fatty acid metabolism induces anti-PD1 acquired resistance.**

#### **Authors**

Morgane Denis<sup>1, 2</sup>, Chloé Grasselly<sup>1, 2</sup>, Anne Wierinckx<sup>1</sup>, Pierre-Antoine Choffour<sup>2</sup>, Doriane Mathé<sup>2</sup>, Anne Tourette<sup>2</sup>, Fabian Birzele<sup>5</sup>, Elsa Kress<sup>2</sup>, Abdelkamel Chettab<sup>1</sup>, Lars Petter Jordheim<sup>1</sup>, Christian Klein<sup>4</sup>, Eva-Laure Matera<sup>1</sup>, Charles Dumontet<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup>Anticancer Antibodies, CRCL, INSERM U1052, CNRS UMR 5286, CLB, UCBL, Lyon, France

<sup>2</sup>Antineo, Lyon, France

<sup>3</sup>Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>4</sup>Roche Innovation Center Zurich, Schlieren, Switzerland

<sup>5</sup>Roche Pharma Research & Early Development, Pharmaceutical Sciences, Roche Innovation Center Basel, Basel, Switzerland

#### **Corresponding Author**

Pr. Charles Dumontet

CRCL, INSERM U1052-CNRS UMR 5286

8 avenue Rockefeller

69008, Lyon, France.

Phone: 33 4 78 77 72 36

Email: charles.dumontet@chu-lyon.fr

## **Abstract**

To understand the underlying mechanisms of resistance to anti-PD-1/PD-L1 antibodies, we developed five *in vivo* models of resistance to anti-PD-1 and/or PD-L1 antibodies, and compared these to their wild type sensitive counterparts. Based on RNAseq data, we determined 11 genes altered in at least five out of nine models and chose to focus on *SERPINF1*. We modified the level of expression of *SERPINF1* in MC38 cells and observed acquired resistance to anti-PD-1 antibodies when *SERPINF1* was overexpressed while *SERPINF1* knockout became ultrasensitive to these antibodies. We determined that *SERPINF1* promotes free fatty acid production that was associated with downregulation of CD8+ T cell activation. Additionally resistance in MC38 aPD-1-R could be overcome with an anti-FFA production blockade by Orlistat administration in combination with anti-PD-1 therapy. This suggested CD8+ T cells reactivation and permit to counteract the resistance acquired by the tumor. Therefore, combination therapies designed using our models can overcome acquired resistance to anti-PD-1 therapy.

## **Keywords**

Preclinical models, Drug resistance, Immune checkpoint inhibitor, PD-1, PD-L1, Oncology, Tumor microenvironment

## Introduction

Immune Checkpoint Immunotherapy (ICI) targeting Programmed Death 1 (PD-1) and Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) have made a breakthrough in the management of patients in many different types of cancer including melanoma, non-small cell lung cancer (NSCLC), Hodgkin's disease, bladder cancer, prostate carcinoma and renal cell carcinoma<sup>1-9</sup>. However, restoring T cell anti-tumor function does not allow an effective response in all cases and overcoming primary or secondary resistance remains an issue. Understanding the underlying mechanisms would respond to a therapeutic flaw, to date, few explanations are known. The innate resistance related to the  $\beta$ -catenin or JAK1/2 mutations, causing a total loss of interferon response, related to acquire resistance, do not allow enough to release therapeutic alternatives<sup>10-12</sup>.

Thus, we have developed robust *in vivo* variants derived from sensitive models in order to mimic an acquired resistance in the patient.

We performed expression gene profiling of sensitive and resistant models in an effort to identify genes of interest with an altered expression in resistant tumors. From these analyses, we identified *SERPINF1* with altered expression in most of our resistant tumor models. *SERPINF1* code for a serine proteinase inhibitor, Pigment epithelium-derived factor (PEDF)<sup>13</sup>. PEDF is a multifunctional protein with neuroprotection, anti-angiogenic or lipid metabolism roles<sup>14-16</sup>. Many studies have shown that proliferation and migration were inhibited in presence of *SERPINF1* in melanoma, pancreatic or breast cancer<sup>17-19</sup>. An another hand, others publication have demonstrated the invers effect in glioma stem cells, hepatocellular carcinomas or in Esophageal Squamous Cell Carcinoma<sup>20-22</sup>. Recent study has also suggested that PEDF may enhanced the suppressive phenotype of Treg<sup>23</sup>. Thus, the role of PEDF is unclear. Moreover, PEDF function may depend to on its location. Secretion of PEDF may have direct anti-tumoral role through anti-angiogenic function while intracellular PEDF function may have pro-tumoral role thought FFA accumulation<sup>24</sup>.

In particular, PEDF is known to link ATGL, a protein that catalyze the first hydrolysis reaction of TAG to DAG<sup>15,25</sup>. There is growing evidence that a lipid-rich tumor microenvironment can control the immunosuppressive nature of immune cells. Notably, Immunosuppressive phenotype of TAM correlated with the up regulation of unsaturated fatty acids<sup>26</sup>. In particular, a link between the anti-PD-1 treatment and the metabolic reprogramming of T cells has shown that this treatment induces a glycolysis metabolism but that it also promotes lipolysis and FAO. These may explain the long lifespan of T cells<sup>27</sup>. However, if the balance tilts in favor of lipid rather than carbohydrate metabolism, T cells can shift to an exhausted and regulatory characters<sup>28-31</sup>. Therefore, we wanted to understand if a link exists between the overexpression of PEDF, following the acquisition of resistance to ICI and an increased lipid load in our tumors. To go further on the basis of the molecular understanding of the impact of lipid pathways, we hypothesis that this lipogenic environment lead the conversion of activated to quiescent state of CD8 + T cells even if anti-PD-1 is present.

To confirm the functional role of this gene in resistance to ICIs, we developed variants of MC38 colorectal model with altered levels of PEDF expression, evaluated their sensitivity to ICIs and explored the impact on the immune microenvironment.

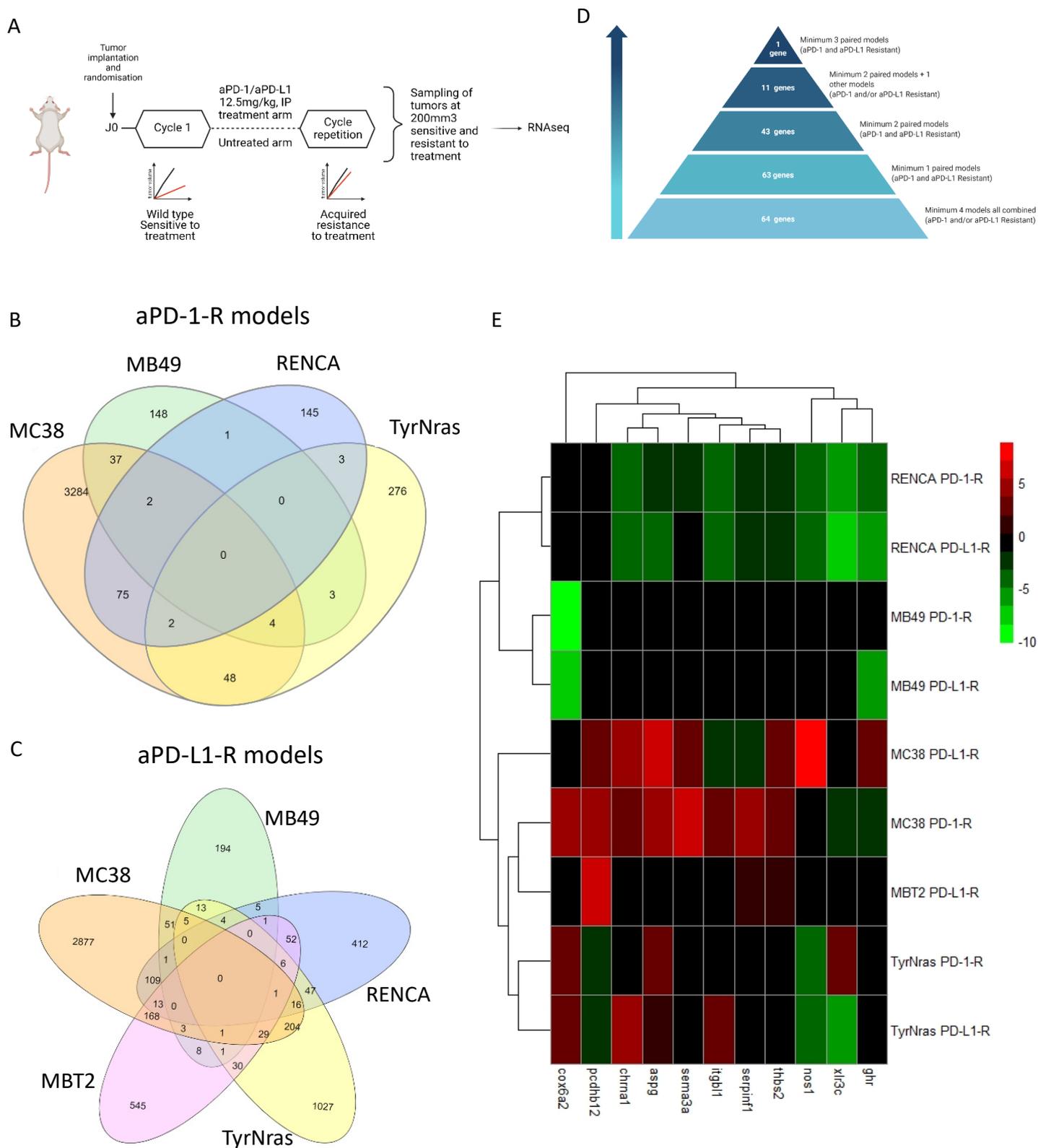
## **Results**

### **Identification of genes implicated in the resistance phenotype**

To study the acquired resistance mechanisms to anti-PD-1/PD-L1, we have created a robust *in vivo* model. In fact, we have selected cell lines, as known, MC38 (colorectal cancer), MB49 and MBT2 (bladder cancer), TyrNras (melanoma) and RENCA (kidney cancer) that are primarily partially sensitive and upon sensitization to treatments have become completely resistant (Figure 1A). The regimens used were aPD-1 (RMP1-14, BioXCell) or aPD-L1 (10F.9G2, BioXCell), at 12.5 mg/kg, administered by intraperitoneal once weekly, initiated when tumor volume reached 200 mm<sup>3</sup>. We will refer to sensitive models as wild type (WT) and to resistant models as aPD-1-R or aPD-L1-R for those resistant to aPD-1 and aPD-L1 mAbs, respectively. This first step allowed use to investigated the modifications of gene

expression, to compare wild type versus resistant established tumors, in different tumor types. Using RNAseq analysis, we identified genes commonly altered in several aPD-1-R and aPD-L1-R models at basal state. We chose to performed Venn diagram between aPD-1 resistant models (four models MC38, MB49, RENCA and TyrNras) and between aPD-L1 resistant models (five models MC38, MB49, RENCA, TyrNras and MBT2) (Figure 1B, 1C, respectively). After analysis, we identified 11 genes commonly altered in minimum 2 paired models and one other models (such as MC38 aPD-1-R and aPD-L1-R and RENCA aPD-1-R and aPD-L1-R and MBT2 aPD-L1-R) (Figure 1D, 1E).

One of them, *SERPINF1* gene encodes for the pleiotropic PEDF protein<sup>32-34</sup>. We processed analysis to determine which pathways are preferentially activated by PEDF up-regulation in our models. We discovered that one of this; lipolysis pathways associated with FFA production are up regulated. PEDF may link ATGL (PNPLA2) and catalyze the first hydrolysis reaction of TAGs to DAG. Moreover, overexpression of PEDF was associated with the inhibition of AMPK activity, in particular in obesity-associated insulin resistance case<sup>35-37</sup>. Notably the up-regulation of ACLY and FASN and the down regulation of CPT1a supported FFA de novo production link to PEDF up-regulation and AMPK blockade. To understand the implication of these genes we chose to focus on the MC38 model as it is a very robust immune-oncology model and is well described in the literature. In addition, the TMB of this model is very high, which implies that our resistance should not be induced by mechanisms already known such as low immunogenicity or a defect in neo-antigen presentation.

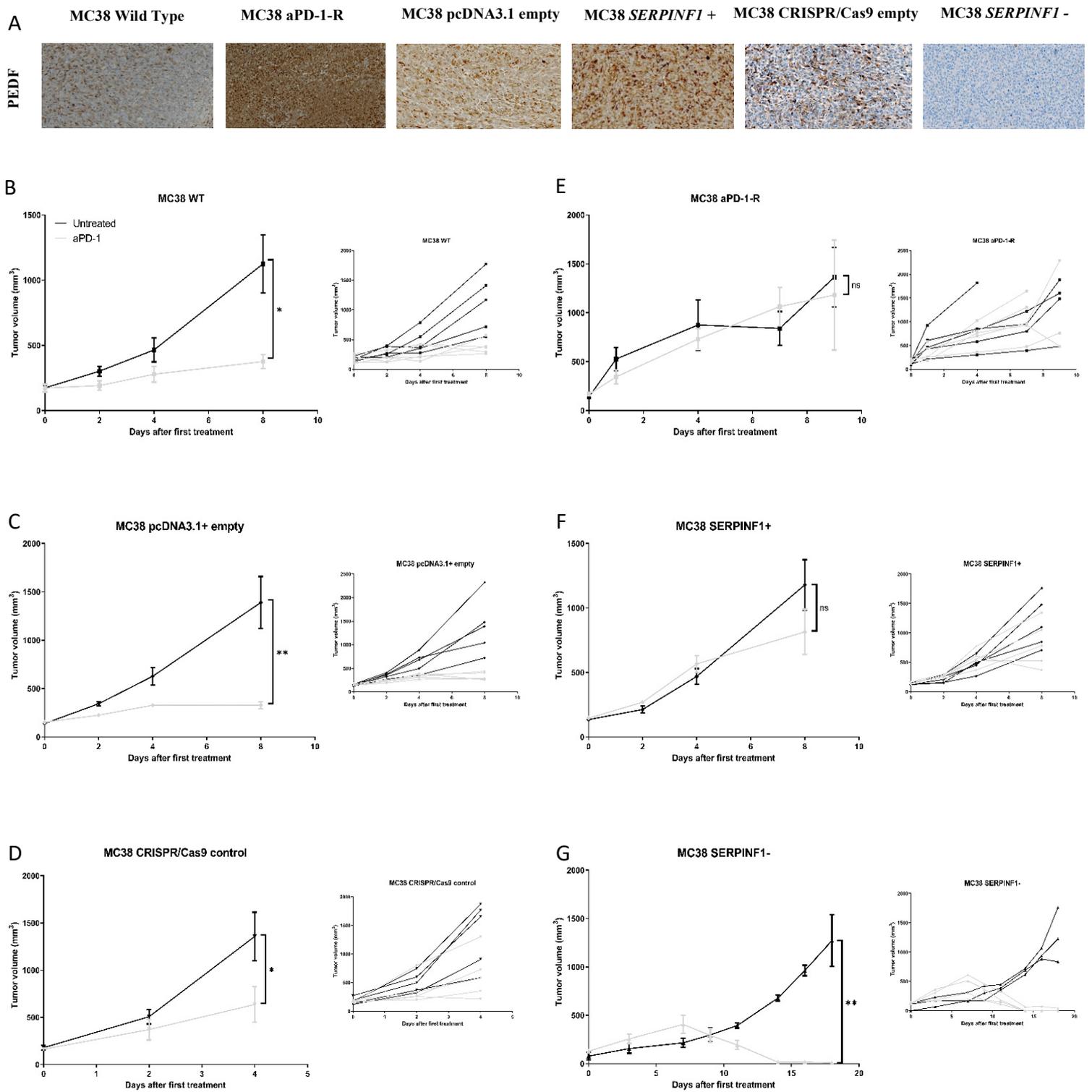


**Figure 1. Identification of altered genes in aPD-1-R and aPD-L1-R models by RNA sequencing analysis.** (A) Study overview, (B) Venn diagram representation of gene modulation shared with aPD-1 resistant colorectal cancer (MC38), renal cell carcinoma (RENCA) and bladder cancer (MB49) and melanoma cancer (TyrNras), (C) Venn diagram representation of gene modulation shared with aPD-L1 resistant colorectal cancer (MC38), renal cell carcinoma (RENCA), bladder

cancer (MB49) and bladder cancer (MBT-2) and melanoma cancer (TyrNras), with a consideration of  $p < 0.05$  and a fold-change  $\pm 1$ , (D) Explanation of our methods to discover which genes were possibly implicated in the acquired resistance to aPD-1 therapy, (E) RNAseq modulation compared with wild-type expression were shown on a heatmap with the fold change of the expression of the most promising genes in each model.

### **Altered *SERPINF1* expression level impact on the sensitivity to aPD-1 and aPD-L1 treatments**

To confirm protein levels, we performed an immunohistochemically analysis of PEDF expression in established tumors of MC38 WT and resistant model (Figure 2A). PEDF content was found to be strongly increased in the aPD-1-R MC38 model which confirmed RNAseq analysis. To explore the impact of altered *SERPINF1* expression on sensitivity to ICIs, we modulated the expression of this gene by transfecting the MC38 WT cells with a pcDNA3.1+ construct empty or containing the full cDNAs and using CRISPR/Cas9 technology to knock out *SERPINF1* in two models the MC38 and MBT2 models. MC38 and MBT2 cell lines were transfected with control vectors and used as controls (see Material and Methods). Immunohistochemistry was used to confirm altered protein content in the MC38 and MBT2 tumors derived from these variants (Figure 2A and supplementary data Figure S1A). First, we tested tumorigenesis of our cell lines *in vivo*. Interestingly, tumor growth has delay when *SERPINF1* was downregulated. We then tested these models for sensitivity to aPD-1 and aPD-L1 therapies. Importantly, the two control cell lines behaved similarly to WT counterpart regarding response to therapies (Figures 2B, 2C, 2D and supplementary data FigureS1B, S1C). Over-expression of PEDF was associated with a loss of sensitivity to aPD-1 therapy and is similar with our MC38 aPD-1-R models (Figure 2E, 2F). This observation is consistent with the fact that PEDF content is increased in the MC38 aPD-1-R model. Interestingly, knockdown of PEDF was associated with sensitivity enhancing to aPD-1 therapy; associated with complete remissions in MC38 models (Figure 2G). Concerning, MBT2, we obtained a partial response thought aPD-1 even though this cell line was classically resistance to aPD-1 (Figure S1D, S1E). Together, these results suggest that overexpression of *SERPINF1* induced resistance to aPD-1 therapy.



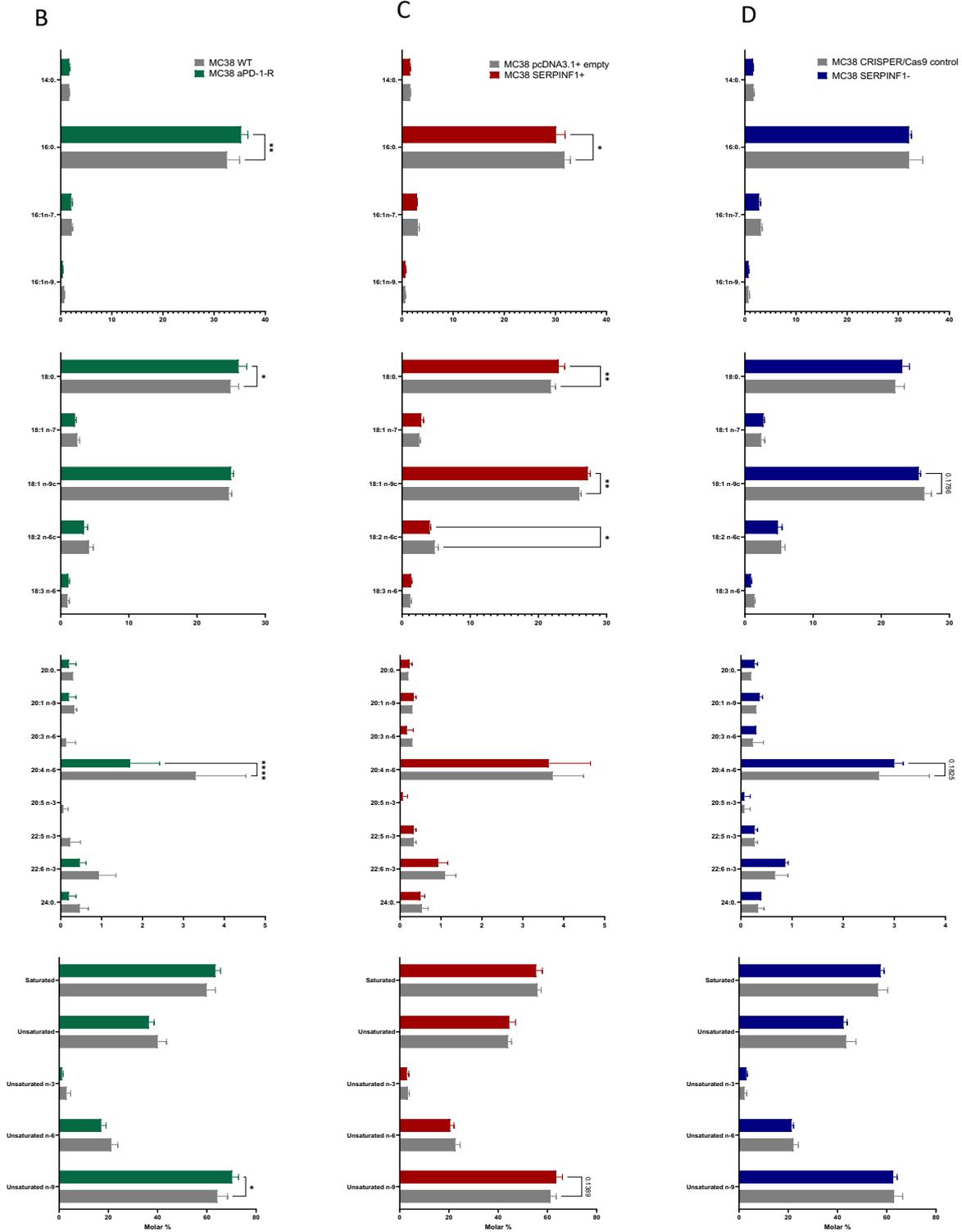
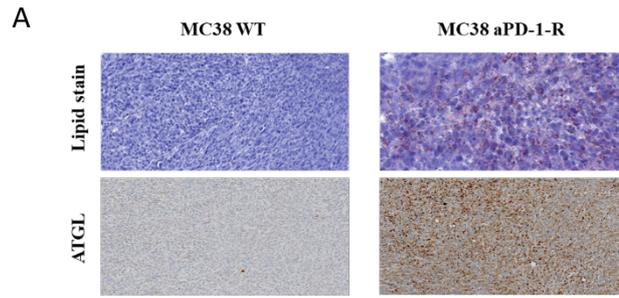
**Figure 2. Altered sensitivity profiles observed upon modulation of the expression *SERPINF1* gene support his implication in aPD-1 acquired resistance.** (A) IHC analysis for PEDF in representative MC38 WT, MC38 aPD-1-R, MC38 *SERPINF1*+, MC38 *SERPINF1*- and control tumors. For each *in vivo* experiment, tumor fragments were injected in mice and when tumors reached 150 mm<sup>3</sup>, mice were randomized and treated with aPD-1 (BioXCell, 12.5 mg/kg per week), (B) MC38 WT cell line, (C) MC38 pcDNA3.1+ empty cell line, (D) MC38 CRISPR/Cas9

control cell line, (E) MC38 aPD-1-R model, (F) MC38 *SERPINF1*+ cell line, (G) MC38 *SERPINF1*- cell line. Data shown are mean tumor volume values and error bars are  $\pm$  SEM. n=3 or 5 mice/group, \*: p<0.05 \*\*: p<0.01, using Mann Whitney t-test.

### **Resistance of aPD-1 and *SERPINF1* overexpression induced preferentially accumulation of SFA and MUFAs.**

To understand the involvement of *SERPINF1* in the process of anti-PD-1 resistance, we studied lipid accumulation in our models. A simple confirmation by red oil labeling was carried out to demonstrate the accumulation of lipid in our model MC38 aPD-1-R and as well as a labeling of ATGL, a lipase that bind PEDF and essential for the production of fatty acid (Figure 3A). In fact, in the sensitive models lipid droplet was not detected while in the resistant models many islands of tumor cells gorged with lipid droplets are present.

We then performed a quantification based on gas chromatography detection of fatty acids present in our various tumors. This assay revealed a preferential increase in SFA and MUFA in the anti-PD-1 resistant models (MC38 aPD-1-R and MC38 *SERPINF1* +) compared to the corresponding sensitive model (MC38 WT and MC38 pcDNA3.1 + empty). Interestingly, in the MC38 *SERPINF1*- model, an inversion of the fatty acids preferentially present, namely PUFAs to the detriment of SFAs and MUFAs, was detected. All these data confirmed an effect of *SERPINF1* in the FA composition in the tumor (Figure 3B, 3C, 3D). To go further, we wanted to know how this FA accumulation might affect in the immune microenvironment and possibly lead resistance to aPD-1 therapy.

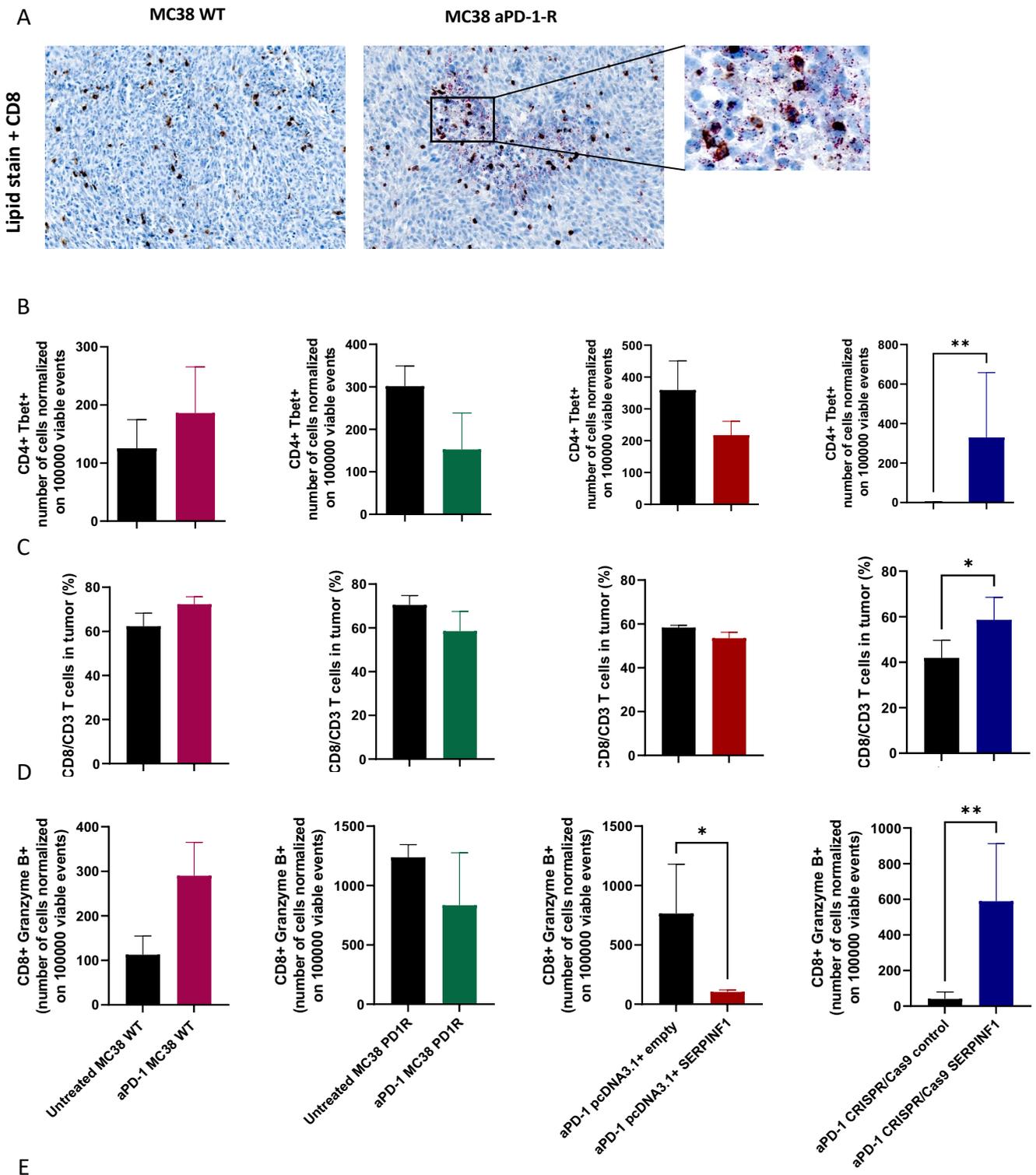


**Figure 3. SFU and MUFAs preferentially accumulate into tumor with aPD-1 resistance.** Tumor were collected when volume reached 200 mm<sup>3</sup>. (A) Representative pictures of ORO and ATGL staining in MC38 WT and aPD-1-R models, (B-D) Histogram represented FA composition on tumor in molar percentage (nmol/g), (B) MC38 WT and MC38 aPD-1-R models, (C) MC38 pcDNA3.1 empty and *SERPINF1*+, (D) MC38 CRISPR/Cas9 control and *SERPINF1*-. Significant decreases and increases were assessed by a two-way ANOVA statistical test, with Bonferroni post-hoc test, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*\*: p<0.0001, n = 3 tumors per group.

**Absence of *SERPINF1* expression boosts CD8+ T cells activation while its upregulation decreases them.**

Two complementary experiments were performed. The first was the co-staining of ORO and CD8 labelling by immunohistochemistry. We detected that CD8+ T cells have a sparse distribution in the MC38 WT model while for MC38 aPD-1-R model CD8+ T cells were preferentially accumulated in the islands of tumor cells gorged with lipid droplets (Figure 4A). These results suggest that resistant phenotypes are associated with several alterations in the tumor immune infiltrates. Given the major effect of altered *SERPINF1* expression on the sensitivity of MC38 cells to aPD-1 therapy, we analyzed the immune infiltrate in the MC38 *SERPINF1* variants treated with aPD-1. Therefore, we performed flow cytometry for all models to understand if the CD8+ T cells status were similar between resistant models (MC38 aPD-1-R and MC38 *SERPINF1*+). The immune infiltrates of the tumor microenvironment were characterized 24h after a second weekly treatment of the selecting antibody. First, we observed Th1 status CD4+ T cells activation using the T-Bet marker. In the two sensitive models, namely MC38 WT and MC38 *SERPINF1*- an increase in this subpopulation is observed while resistant models followed a downward trend (Figure 4B). Moreover, the proportion and the activity (granzymeB+) of infiltrated CD8+ T cells was decreased in the MC38 *SERPINF1*+ and MC38 aPD-1-R models while in the MC38 *SERPINF1*- and MC38 WT models was increased (Figure 4C, 4D). These results indicate that overexpression of *SERPINF1* promote an immunosuppressive microenvironment. Moreover, these results suggest that *SERPINF1* may it deleterious for the maintenance of anti-tumor immunity supported by CD8+ T cells and Th1 CD4+ T cells responses.

To understand if the resistance was support by the accumulation of FA and CD8+ T cells inactivation, we choose to combine an anti-FA synthesis that target ATGL with aPD-1 antibody in MC38 aPD-1-R models. This combination overcame therapeutic resistance to aPD-1 in MC38 aPD-1-R ( $p < 0.01$ ) and improved survival compared with untreated group (Figure 4E).



**Figure 4. *SERPINF1* inhibition enhance cytotoxic lymphocyte responses.** (A) Tumor were collected when volume reached 200 mm<sup>3</sup>. Representative pictures of ORO and CD8+ staining were showed, (B-D) Flow cytometry analysis was performed 24h after the second weekly treatment administration for each MC38 models. All histogram represented population after normalization of the number of positive cells in 100.000 viable events, (B) Quantification of CD4+ Tbet+ T cells, (C) Quantification of percentage of ratio CD3+/CD8+, (D) Quantification of CD8+ GranzymeB+ T cells. n = 4-5 tumors per group, (E) *In vivo* experiment tumor fragments of MC38 aPD-1-R models were injected in mice and when tumors reached 150 mm<sup>3</sup>, mice were randomized divided in subgroup of treatment, Untreated, treated with aPD-1 (BioXCell, 12.5 mg/kg per week), Orlistat (Roche, 240 mg/kg/day) or combination. Data shown are mean tumor volume values and error bars are  $\pm$  SEM. n=5 mice/group. Significant decreases and increases were assessed by a Mann-Whitney t-test, \*: p<0.05 and \*\*: p<0.01.

## Discussion

Understanding the mechanisms of resistance to ICIs is the current major challenge. In this study, with *in vivo* tumor models with adaptive resistance to aPD-1 and aPD-L1 therapies, we discovered a potential mechanism that involves the *SERPINF1* gene.

Knowledge regarding tumor cell molecular alterations associated with aPD-1 acquired resistance remains limited, with a major focus on the role of tumor mutation burden and neoantigenic antigens<sup>38</sup>. Zaretsky *et al.* described mutations in Jak1 and Jak2 genes in resistant melanoma tumors<sup>12</sup>. Garcia-Diaz *et al.* reported that interferon signature enrichment enhanced PD-L1 and PD-L2 expression in melanoma cells<sup>39</sup>. In order to identify molecular alterations mechanistically involved in aPD-1 and/or aPD-L1 resistance targeted therapy, we performed an RNAseq study, to compare sensitive parental models and their resistant counterparts. We determined common modifications of genes between aPD-1-R and aPD-L1-R tumors. This approach allowed us to identify putative candidate genes involved in the *in vivo* resistance phenotype.

*SERPINF1* codes for pigment epithelium derived factor (PEDF), which is essentially a secreted protein is reported to inhibit cancer cell proliferation and increase apoptosis via the FAS/FASL pathway as well as reducing VEGF expression by cancer cells<sup>40</sup>. To our knowledge, the impact of PEDF on sensitivity to ICP therapy has not yet been explored. In our models, *SERPINF1* was

found to be over-expressed both at the transcriptional and protein level in MC38 aPD-1-R model. Conversely, *SERPINF1* was under-expressed in the resistant variants derived from the three other tumor models, possibly linked to the differences in tumor types (kidney, bladder and colorectal cancers). To validate *SERPINF1* as a candidate gene involved in resistance to therapy in the MC38 model we developed variants with up or down regulation of *SERPINF1*. We found that the MC38 variant, which over-expressed PEDF, was resistance to aPD-1 targeted therapy. Additionally, the *SERPINF1* KO model appeared to be highly sensitive to aPD-1 antibody with complete remission in some of mice while the models transfected with the control vectors displayed partial response at best like the MC38 WT model. These results suggest that PEDF may be mechanistically involved in the acquisition of a resistance phenotype to ICIs, in particular to aPD-1 based therapy.

Overexpression of PEDF has been reported to be associated with altered AMPK activity, in particular obesity-associated insulin resistance<sup>35-37</sup>. Interestingly, RNAseq analysis of our resistant MC38 models was compatible with enhanced resistance to insulin while the fatty acid oxidation pathway was under-expressed. In the MC38 aPD-1-R model we identified that the transcription of *FASN*, *ACLY* was increased while that of *CPT1a* was decreased<sup>41</sup>. We hypothesize that PEDF over-expression in resistant cancer cells is associated with *de novo* lipogenesis<sup>24</sup>. Therefore, the proportions of fatty acids were changing depending on whether the model was resistant to aPD-1 or not and depending on *SERPINF1* expression. Interestingly, we found that the preferentially increased fatty acids in the aPD-1 resistant models were SFU and MUFA. These are in agreement with a recent study which showed the beneficial anti-tumor effect of PUFAs in contrast to SFUs and MUFAs<sup>42</sup>. This allows cells enhanced flexibility to distribute free fatty acids (FFAs) in different biosynthetic pathways and generate a diverse pool of lipid species with distinct functions. Beyond contribution to the energy pool, which is undeniably advantageous for cancer cells, notably if SFU and MUFA are produced, FFA can be released in the microenvironment, inducing an inflammatory microenvironment. This in turn might increase the pool of pro-tumor cells such as myeloid derived suppressor cells and TAM and blocked CD8+ T cells activation<sup>26,43</sup>. We observed a co-localization of lipid droplets and CD8 + staining in resistant model. Moreover, flow cytometry experiment confirmed that the

proportion and activities of CD8 + T cells supported by the Th1 response were related to the presence or absence of *SERPINF1*.

The binding of PD-L1 to PD-1 causes the metabolic reprogramming of cytotoxic CD8+ cells from aerobic glycolysis to free fatty acid oxidation (FAO), thereby inducing a phenotypic conversion of effector T cells into exhausted cells<sup>28,31</sup>. Since PD-1 binding has been shown to activate FAO, we hypothesize that excess of FFA induced by excess PEDF might lead the polarization of CD8+ T cells and prevent their activation<sup>27,30</sup>. Consistent with our hypothesis, we obtained durable tumor responses when we combine an anti-FA with anti-PD-1 in MC38 aPD-1-R models.

In conclusion, our work supports the role of *SERPINF1* as possible candidate genes involved in resistance to ICIs and support the testing of these rational combinatorial strategy in patients with anti-PD-1 resistance.

## **Materials and Methods**

### **Mouse cell line cultures**

MC38 and RENCA cell line were obtained from Kerastat and American Type Culture Collection (ATCC) respectively. Alain Bergeron, Laval University, Canada, provided MB49 and MB-T2 cell line. Julie Caramel, CRCL, France provided us TyrNras cell line. All cell lines were negative for mycoplasma assays. Murine colon cancer MC38 cells and TyrNras were cultured in DMEM medium with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and streptomycin. The murine renal cell carcinoma cell line RENCA and the murine bladder cancer cell lines MBT-2 and MB49 were cultured with RPMI medium with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and streptomycin. Cells were incubated in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

### **Establishment of resistant models**

For the methods, referred to the publication (ref). Basically, after implantation of 5.10<sup>6</sup> cells subcutaneously of MC38 cells and MB49 cells in C57BL6 mice, RENCA cells in BALB/c mice and MBT-2 cells in C3H mice (Charles River Laboratories), when the tumor volume reached 150 mm<sup>3</sup>, mice were randomized and the first treatment was administered aPD-1 (RMP1-14, BioXCell, 12.5 mg/kg per week) or aPD-L1 (10F.9G2, BioXCell, 12.5 mg/kg per week). Tumor

volume was measured every three days (length x width) with a caliper and determined using the formula:  $\frac{4}{3} \times \pi \times r^3$ . To establish the resistant models, tumors obtained from mice with initial responses to therapies were serially reimplanted subcutaneously into new groups of naive mice and treated once a week to maintain selection pressure. All mice were raised in an SPF environment with free access to standard food and water. The Animal Ethics Committee of the University Claude Bernard of Lyon approved this study.

### **RNAseq**

For the detail method, referred to the publication (ref). Briefly, RNA sequencing was performed on two separate platforms. WT, aPD-1-R, aPD-L1-R MB49 tumors, WT, aPD-1-R, aPD-L1-R TyrNras tumors and WT, aPD-L1-R MC38 tumors were processed by the ProfileXpert platform, for WT and aPD-1-R MC38 tumors, WT and aPD-L1-R MBT-2 tumors, and WT, aPD-1-R and aPD-L1-R RENCA tumors, the RNA sequencing was performed by Roche platform, with samples of 200 mg<sup>3</sup>. For both after dilaceration of samples, RNA was extracted using RNeasy mini kit (Qiagen Cat. No. 74104). All RNAseq samples passed quality control in terms of number of reads per sample and read quality.

Differential gene expression between wild type and resistant models were processing with fold-change  $\geq 1$  and the p-value  $> 0.05$ . Venn diagrams were performed<sup>45</sup>. For heatmap representation, we used package on R software pheatmap (<https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/index.html>).

The canonical pathways of *SERPINF1* were generated using ingenuity pathway analysis (QIAGEN Inc: <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuitypathway-analysis>). All pathways significantly predicted up or down regulated (zscore +/- 1.5 and pvalue<0.05).

FASTQ data are available with the bioproject accession number PRJNA637469 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA637469>).

### Modification of candidate genes in the MC38 model

*SERPINF1* knockout MC38 cells and MBT2 cells were generated using CRISPR/Cas9 technology. Oligonucleotides were inserted into pLentiCRISPRv2-puro plasmid (Addgene, Cambridge, MA, USA) using BsmBI (ThermoFisher-Fermentas). Targeting and control sequences are as follows:

KO *SERPINF1*-F: CAGTCCAGAGGAGTAGCACCGTTTT

KO *SERPINF1*-R: GGTGCTACTCCTCTGGACT

KO Non target Control-F: AACGGTAGCGTACCCGTGAA

KO Non target Control-R: TTCACGGGTACGCTACCGTT

Virus were produced using HEK 293T cells. After 24 h incubation, medium was changed and supernatant collected twice with 24 h intervals. Supernatant was filtered using 0.45 µm filter. MC38 and MBT2 (60% confluency) were incubated in lentivirus containing medium with polybrene (10 µg/mL; Sigma-Aldrich, H9268-10G) during six hours. After forty-eight hours following infection, puromycin (Sigma-Aldrich, P9620) was added at 2,5 µg/mL and 4µg/mL respectively.

To obtain MC38 variants with stable over-expression of candidate gene, cells were transfected with pcDNA3.1+ plasmid containing cDNAs of *SERPINF1* sequence (ThermoFisher). At day one, cells were added to obtain 70% of confluence in flacon T25. 5µg of corresponding pcDNA3.1+ plasmid was added with lipofectamine (Invitrogen, 11668030) during six hours. On day four, geneticin (Life technologies, 10131-027) at 1 mg/ml concentration was used to select transfected MC38 cells. Empty plasmid was used as negative control.

### **Immunocytochemistry**

After fixing, MC38 wild type and variant tumors are dehydrated and impregnated in the LEICA ASP300 machine. After inclusion, samples are cut to 3 µm and mounted on a slide Superfrost +. Roche DAB Map Kit (Roche, 760-124) is used on a Roche Discovery XT machine, after unmasking with a buffer, *SERPINF1* (R&D, AF1149), ATGL (Cell Signaling, 2138), CD8a (Invitrogen, 14-0808-82) antibodies were diluted at 1/500, 1/200 and 1/200 respectively, and incubated 60 min at 37 °C. After, slides were incubated with secondary antibody 32 min at 37 °C, for *SERPINF1* we used rabbit Anti-Goat IgG Antibody Biotinylated (Vector, BA5000) at 1/300 and for ATGL and CD8a, we used rabbit Anti-Rat IgG Antibody Biotinylated (Vector, BA4001) at 1/100 and 1/200 respectively. For oil red staining, after fixing with isopropanol 60%, oil red solution was adding during 15min. Slides were rinse with isopropanol 60% and water. Harris hematoxyline was added during 1min and slides were rinse with water. Zeiss ZEN

blue edition software was used to create representative images, if necessary, brightness and contrast were adjusted.

### **Lipids extraction and analyses of free fatty acids**

Mouse tumors were crushed and weighted. After the addition of appropriate internal standards, total lipids were extracted twice with ethanol/chloroform (1:2, v/v). The organic phases were dried under nitrogen. Lipid classes were then separated by solid phase extracted (SPE, NH<sub>2</sub> 3CC (500MG)). Total lipids were placed on aminopropyl columns, previously activated with 8mL of hexane. Each lipids classes were eluted using different solvents: 20mL chloroform for neutral lipids and 5mL diethyl ether/acetic acid (98:2, v/v) for free fatty acids (FFA). The fraction of FFA were dried under nitrogen and derived with boron trifluoride in methanol (14%) (Sigma, ref: B1252). Transmethylation was carried out at 100°C in screw-capped tubes for 1hour. The derivatized fatty acid methyl esters were then extracted twice with isooctane and analyzed by gas chromatography using an HP6890 instrument equipped with a fused silica capillary BPX70 SGE column (60 x 0.25 mm). The vector gas was hydrogen. Temperatures of the flame ionization detector and the split/splitless injector were set at 250 °C and 230 °C, respectively.

### **Flow cytometry analysis**

The tumors were collected and mouse tumor dissociation kit (130-096-730, Miltenyl Biotec) were used. To digest tumors, gentle MACS Octo Dissociator (130-096-427, Miltenyl Biotec) were used. After filtration with filter 100 µm (130-110-917, Miltenyl Biotec) and wash, cell surfaces were stained with the fluorescently labelled antibodies in the dark for 30 min at 4 °C. After surface staining, cells were fixed and permeabilized using BD Cytofix/Cytoperm kit (BD, 554714) and then labeled with FoxP3, Granzyme B, T-bet according to the panels (lymphoid or myeloid panel) in the dark for 30 min at 4 °C. Flow cytometry experiment was performed 24 h after the second treatment for all MC38 models. Samples were acquired on the FortessaX20 flow cytometer with BD FACS Diva software (BD Bioscience). FlowJo software (BD) was used for analyses and GraphPad Prism software was used for statistical analysis (Two-ways ANOVA with Bonferroni post-test). For the lymphoid panel, after discrimination

with viability dye and CD45+ we analyzed t-Bethi CD4 helper T cells, CD25hi CD4 regulatory T cells, CD44low CD8 naïve T cells, CD44hi/GranzymeB+CD8 effector T cells and CD44hi/PD-1hi/GranzymeB- CD8 exhaustive T cells. For the myeloid panel we analyzed, after discrimination with viability dye, CD45+ and CD11b+, Ly6Chi/Ly6Ghi granulocyte, Ly6Chi/Ly6Glow/MHC-IIlow inflammatory monocyte, Ly6Chi/Ly6Glow/MHC-IIhi immature macrophage and tumor associated macrophage (TAM) Ly6Clow/Ly6Glow/MHC-IIlow/hi. The results were expressed post normalization on 100,000 events taking into account viable cells only.

### **Therapeutic combinations of resistant models**

MC38 aPD-1-R tumor fragments were implanted subcutaneously into the right flank of immunocompetent C57Bl/6 mice. When tumors volume reached 150 mm<sup>3</sup>, mice were randomized and the first treatment was administered (5 mice per group). We combined orlistat (Roche, 240 mg/kg/day, intraperitoneal) with aPD-1(RMP1-14, BioXCell, 12.5 mg/kg per week, intraperitoneal) to treat MC38 aPD-1-R.

### **CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING**

Further information and requests for resources and reagents should be directed to the lead contact, Charles Dumontet ([charles.dumontet@chu-lyon.fr](mailto:charles.dumontet@chu-lyon.fr))

### **Acknowledgment**

We acknowledge Alain Bergeron and François Radvanyi for providing MB49 and MBT-2 cell lines and Julie Caramel for providing TyrNras cell lines.

This work was supported in part by the Lyric Grant INCa-DGOS-4664.MD and CG were supported by the National Association Research and Technology (ANRT).

Immunohistochemistry studies were performed in the CIQLE platform of University Claude Bernard Lyon 1. Genomic studies were performed by ProfileXpert, Lyon, France and Roche, Penzberg, Germany. Cell sorting and Single cells were performed in the flow cytometry plateforme of CRCL and in cancer of genomic plateforme of CLB respectively.

## Author Contributions

MD and CG designed and performed the experiments. PAC, DM, AT, AB, ELM, and NT assisted MD with experiments. MD analyzed data. AW, AKC and FB analyzed RNAseq data. MD wrote the manuscript in consultation with CD, CK, AW, AKC, EK and LPJ, and CD supervised the project.

## Declaration of interest

Christian Klein is a full-time employee of Roche-Glycart. Fabian Birzele is full time employee of Roche Pharma Research & Early Development, Pharmaceutical Sciences, Roche Innovation Center Basel.

## References

1. Ansell, S. M. *et al.* PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **372**, 311–319 (2015).
2. Balar, A. V. *et al.* Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet* **389**, 67–76 (2017).
3. Cella, D. *et al.* Patient-reported outcomes of patients with advanced renal cell carcinoma treated with nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib (CheckMate 214): a randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **20**, 297–310 (2019).
4. Garon, E. B. *et al.* Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* **372**, 2018–2028 (2015).
5. Kaufman, H. L. *et al.* The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumour immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma. *Nature Reviews Clinical Oncology* **10**, 588–598 (2013).

6. Larkin, J. *et al.* Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine* **381**, 1535–1546 (2019).
7. McNeel, D. G. *et al.* The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of prostate carcinoma. *Journal for Immunotherapy of Cancer* **4**, 92 (2016).
8. Nizam, A. & Aragon-Ching, J. B. Frontline immunotherapy treatment with nivolumab and ipilimumab in metastatic renal cell cancer: a new standard of care. *Cancer Biology & Therapy* **20**, 6–7 (2019).
9. Rosenberg, J. E. *et al.* Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet* **387**, 1909–1920 (2016).
10. Spranger, S., Bao, R. & Gajewski, T. F. Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* **523**, 231–235 (2015).
11. Torrejon, D. Y. *et al.* Overcoming genetically-based resistance mechanisms to PD-1 blockade. *Cancer Discov* **10**, 1140–1157 (2020).
12. Zaretsky, J. M. *et al.* Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **375**, 819–829 (2016).
13. Steele, F. R., Chader, G. J., Johnson, L. V. & Tombran-Tink, J. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1526–1530 (1993).
14. Dawson, D. W. *et al.* Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* **285**, 245–248 (1999).

15. Famulla, S. *et al.* Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is one of the most abundant proteins secreted by human adipocytes and induces insulin resistance and inflammatory signaling in muscle and fat cells. *Int J Obes* **35**, 762–772 (2011).
16. Tombran-Tink, J. & Barnstable, C. J. PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nat Rev Neurosci* **4**, 628–636 (2003).
17. Abe, R. *et al.* Overexpression of pigment epithelium-derived factor decreases angiogenesis and inhibits the growth of human malignant melanoma cells in vivo. *Am J Pathol* **164**, 1225–1232 (2004).
18. Hong, H. *et al.* Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits breast cancer metastasis by down-regulating fibronectin. *Breast Cancer Res Treat* **148**, 61–72 (2014).
19. Uehara, H. *et al.* Expression of pigment epithelium-derived factor decreases liver metastasis and correlates with favorable prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* **64**, 3533–3537 (2004).
20. Chen, Z. *et al.* Upregulation of PEDF Predicts a Poor Prognosis and Promotes Esophageal Squamous Cell Carcinoma Progression by Modulating the MAPK/ERK Signaling Pathway. *Front. Oncol.* **0**, (2021).
21. Hou, J. *et al.* Pigment epithelium-derived factor promotes tumor metastasis through an interaction with laminin receptor in hepatocellular carcinomas. *Cell Death Dis* **8**, e2969 (2017).
22. Yin, J. *et al.* Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) Expression Induced by EGFRvIII Promotes Self-renewal and Tumor Progression of Glioma Stem Cells. *PLoS Biol* **13**, e1002152 (2015).

23. Singh, R. B. *et al.* Pigment Epithelium–Derived Factor Enhances the Suppressive Phenotype of Regulatory T Cells in a Murine Model of Dry Eye Disease. *The American Journal of Pathology* **191**, 720–729 (2021).
24. Li, C. *et al.* The contrary intracellular and extracellular functions of PEDF in HCC development. *Cell Death Dis* **10**, (2019).
25. Carnagarin, R., Dharmarajan, A. M. & Dass, C. R. PEDF-induced alteration of metabolism leading to insulin resistance. *Molecular and Cellular Endocrinology* **401**, 98–104 (2015).
26. Wu, H. *et al.* Lipid droplet-dependent fatty acid metabolism controls the immune suppressive phenotype of tumor-associated macrophages. *EMBO Mol Med* **11**, (2019).
27. Patsoukis, N. *et al.* PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun* **6**, 1–13 (2015).
28. Bardhan, K., Anagnostou, T. & Boussiotis, V. A. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front. Immunol.* **7**, (2016).
29. Chao, T., Wang, H. & Ho, P.-C. Mitochondrial Control and Guidance of Cellular Activities of T Cells. *Front. Immunol.* **0**, (2017).
30. O’Sullivan, D. *et al.* Memory CD8<sup>+</sup> T Cells Use Cell-Intrinsic Lipolysis to Support the Metabolic Programming Necessary for Development. *Immunity* **49**, 375–376 (2018).
31. Pearce, E. L. *et al.* Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature* **460**, 103–107 (2009).
32. Becerra, S. P. & Notario, V. The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer* **13**, 258–271 (2013).

33. Nwani, N. G. *et al.* Melanoma Cells Block PEDF Production in Fibroblasts to Induce the Tumor-Promoting Phenotype of Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Res.* **76**, 2265–2276 (2016).
34. He, X., Cheng, R., Benyajati, S. & Ma, J. PEDF and its roles in physiological and pathological conditions: implication in diabetic and hypoxia-induced angiogenic diseases. *Clin. Sci.* **128**, 805–823 (2015).
35. Miao, H. *et al.* PKC $\alpha$  replaces AMPK to regulate mitophagy: Another PEDF role on ischaemic cardioprotection. *J Cell Mol Med* **22**, 5732–5742 (2018).
36. Yang, S. *et al.* Metformin inhibits expression and secretion of PEDF in adipocyte and hepatocyte via promoting AMPK phosphorylation. *Mediators Inflamm.* **2013**, 429207 (2013).
37. Qiu, F. *et al.* A decrease of ATP production steered by PEDF in cardiomyocytes with oxygen-glucose deprivation is associated with an AMPK-dependent degradation pathway. *Int. J. Cardiol.* **257**, 262–271 (2018).
38. Grasso, C. S. *et al.* Genetic mechanisms of immune evasion in colorectal cancer. *Cancer Discov* (2018) doi:10.1158/2159-8290.CD-17-1327.
39. Garcia-Diaz, A. *et al.* Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep* **19**, 1189–1201 (2017).
40. Garcia, M. *et al.* Inhibition of Xenografted Human Melanoma Growth and Prevention of Metastasis Development by Dual Antiangiogenic/Antitumor Activities of Pigment Epithelium-Derived Factor. *Cancer Res* **64**, 5632–5642 (2004).

41. Snaebjornsson, M. T., Janaki-Raman, S. & Schulze, A. Greasing the Wheels of the Cancer Machine: The Role of Lipid Metabolism in Cancer. *Cell Metabolism* **31**, 62–76 (2020).
42. Dierge, E. *et al.* Peroxidation of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in the acidic tumor environment leads to ferroptosis-mediated anticancer effects. *Cell Metabolism* **33**, 1701-1715.e5 (2021).
43. Al-Khami, A. A. *et al.* Exogenous lipid uptake induces metabolic and functional reprogramming of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology* **6**, (2017).
44. Sanjana, N. E., Shalem, O. & Zhang, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* **11**, 783–784 (2014).
45. Heberle, H., Meirelles, G. V., da Silva, F. R., Telles, G. P. & Minghim, R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* **16**, 169 (2015).

## KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies for MC38 model Flow cytometry experiment</b>		
<b>PD-1</b>	BD	748268
<b>CD45</b>	BD	561487
<b>CD11b</b>	Invitrogen	83-0112-42
<b>CD4</b>	BD	563747
<b>Viability Dye 780</b>	eBioscience	65-0865-14
<b>T-Bet</b>	Biolegend	644812
<b>CD8</b>	BD	553036
<b>FoxP3</b>	Miltenyi	130-113-470
<b>CD44</b>	Biolegend	103056
<b>CD49b</b>	Biolegend	108922
<b>Granzyme B</b>	Invitrogen	MHGB05
<b>CD19</b>	BD	565473
<b>CD25</b>	Biolegend	101922
<b>CD3</b>	BD	564380
<b>CD64</b>	BD	740622
<b>SiglecH</b>	Invitrogen	12-0333-80
<b>CMH2</b>	Biolegend	107648
<b>CD11c</b>	Biolegend	117318
<b>Ly6G</b>	BD	561236
<b>Ly6C</b>	BD	560596
<b>SIRPa</b>	Biolegend	144028
<b>PD-L1</b>	BD	745616
<b>Therapies In vivo</b>		

<b>InVivoMab IgG2a (clone 2A3)</b>	Bioxcell	BE0089
<b>InVivoMab anti-mouse CD279 (PD-1) (clone RMP1-14)</b>	Bioxcell	BE0146
<b>InVivoMab anti-mouse CD274 (PD-L1) (clone 10F.9G2)</b>	Bioxcell	BE0101
<b>Orlistat</b>	Roche	1GANGGW5CC

#### Experimental Models: Organisms/Strains

<b>C57BL/6 mice</b>	Charles Rivers	000664
<b>BALB/c mice</b>	Charles Rivers	000651
<b>C3H mice</b>	Charles Rivers	

#### Experimental Models: Cell Lines

<b>MC38</b>	Kerafast	CVCL_B288
<b>MB49</b>	Dr A. Bergeron	N/A
<b>MB-T2</b>	Dr A. Bergeron	N/A
<b>RENCA</b>	ATCC	CRL-2947
<b>TyrNras</b>	Dr J. Caramel	N/A
<b>HEK293T</b>	ATCC	CRL-2539

#### Medium culture

<b>DMEM medium</b>	Gibco™	41966-029
<b>RPMI medium</b>	Gibco™	21875-034
<b>Fetal bovine serum</b>	Gibco™	A3160802
<b>Antibiotics (Pen/Strep)</b>	Gibco™	15140122

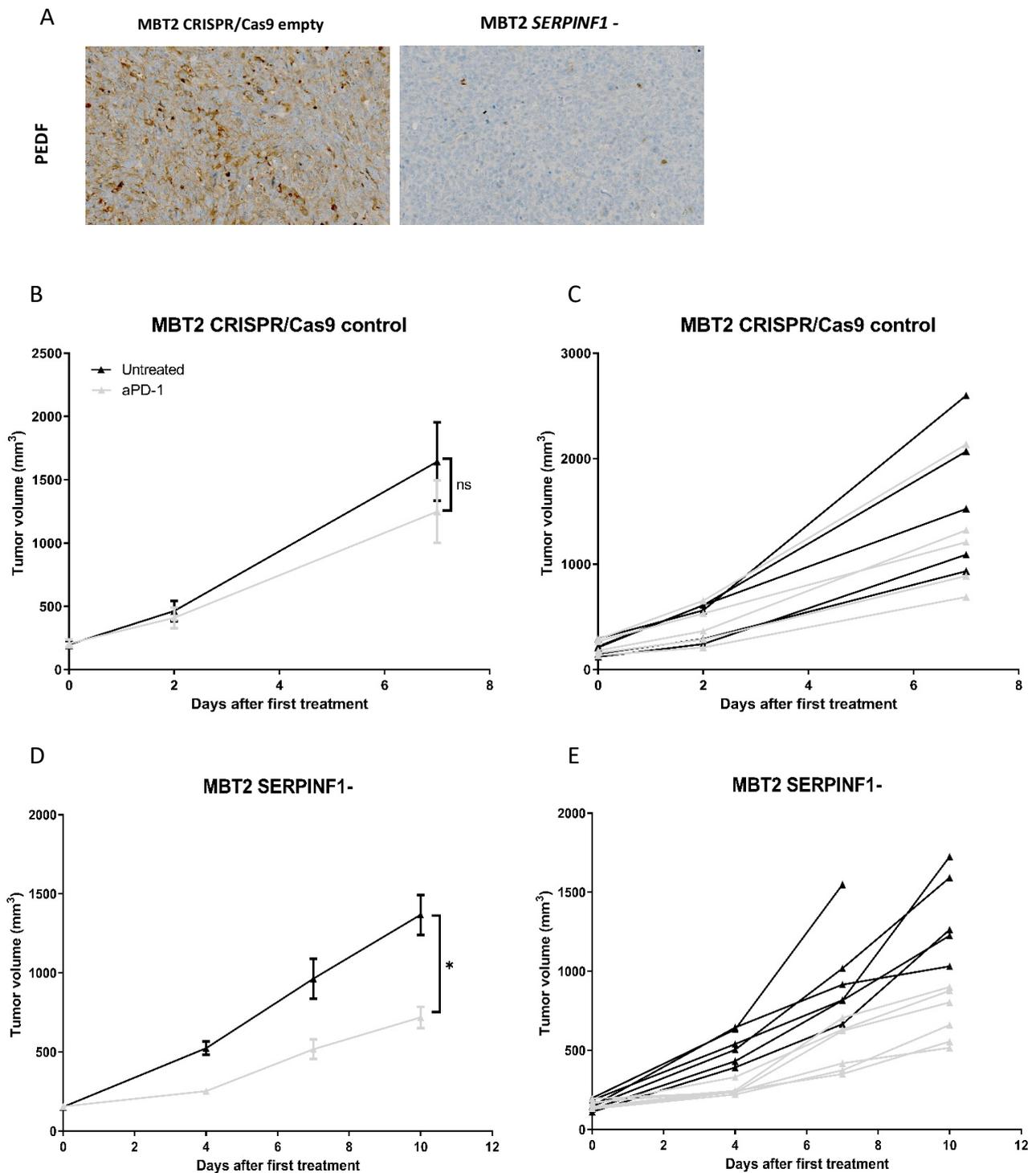
#### Oligonucleotides

<b>KO <i>SERPINF1</i>-F: CAGTCCAGAGGAGTAGCACCGTTTT KO <i>SERPINF1</i>-R: GGTGCTACTCCTCTGGACT</b>	This paper	N/A
<b>KO Non target Control-F: AACGGTAGCGTACCCGTGAA KO Non target Control-R: TTCACGGGTACGCTACCGTT</b>	Addgene <sup>44</sup>	N/A

#### Critical Commercial Assays

<b>RNeasy Mini Kit</b>	QIAGEN	74106
------------------------	--------	-------

<b>Mouse Tumor Dissociation Kit</b>	Miltenyl Biotec	130-096-730
<b>MACS SmartStrainers</b>	Miltenyl Biotec	130-110-917
Chemical, Peptides and Recombinant Proteins		
<b>Puromycin</b>	Sigma-Aldrich	P9620
<b>Polybrene</b>	Sigma-Aldrich	H9268-10G
<b>Geneticin</b>	Life technologies	10131-027
<b>Lipofectamine</b>	Invitrogen	11668030
<b>BD Cytotfix/Cytoperm</b>	BD	554714
<b>Red blood cell lysis solution</b>	Miltenyi Biotec	130-094-183
Recombinant DNA		
<b>pCDNA3.1+</b>	Dr. Jp.Rouault	N/A
<b>pLentiCRISPRv2 vectors</b>	Addgene	52961
<b><i>SERPINF1</i>-pCNA3.1+</b>	ThermoFisher	N/A
<b>pLentiCRISPRv2 – KO –<i>SERPINF1</i></b>	This paper	N/A
Immunohistochemistry experiments		
<b><i>SERPINF1</i></b>	R&D	AF1149
<b>Roche DAB Map Kit</b>	Roche	760-124
<b>Rabbit Anti-Goat IgG Antibody Biotinylated</b>	Vector	BA5000
<b>Rabbit Anti-Rat IgG Antibody Biotinylated</b>	Vector	BA4001
<b>ATGL</b>	Cell Signaling	2138
<b>OIL RED</b>	Diapath	F/C0512
<b>CD8</b>	Invitrogen	14-0808-82



**Figure S1. Altered sensitivity profiles observed upon modulation of the expression *SERPINF1* gene support his implication in aPD-1 acquired resistance.** (A) IHC analysis for PEDF in representative MBT2 *SERPINF1*- and control tumors. For each *in vivo* experiments, tumor fragments were injected in mice and when tumors reached 150 mm<sup>3</sup>, mice were randomized and treated with aPD-1 (BioXCell, 12.5 mg/kg per week), (B) MBT2 CRISPR/Cas9 control cell line, (C) MBT2 CRISPR/Cas9 control cell line individual curves, (D) MBT2 *SERPINF1*- cell line, (E) MBT2 *SERPINF1*- cell line individual curves. Data shown are mean tumor volume values and error bars are  $\pm$  SEM. n=5 or 6 mice/group, \*: p<0.05, using Mann Whitney t-test.

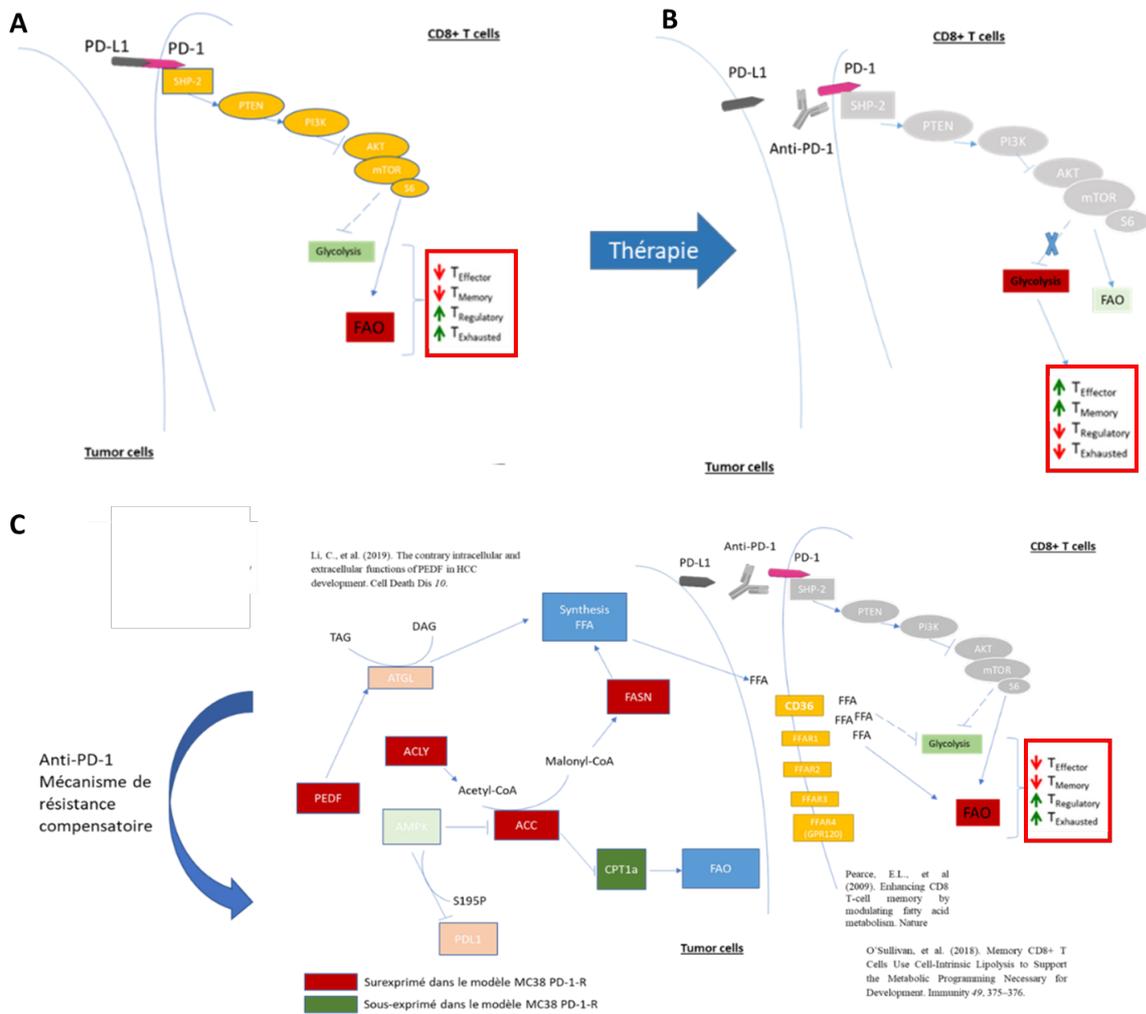
### 3. Conclusion

De cet article, l'analyse des différences d'expression des gènes des tumeurs résistantes comparées aux tumeurs sauvages nous a permis d'identifier 11 gènes communément sous- ou sur-exprimés dans au moins 5 modèles. Nous nous sommes focalisés sur l'un des gènes candidats, à savoir *SERPINF1*.

A l'aide des modèles MC38 génétiquement modifiés nous avons pu étudier et démontrer de manière ciblée comment ce gène intervenait dans la résistance à l'anti-PD-1. PEDF a principalement été décrite comme étant une protéine sécrétée, mais son rôle intracellulaire a également été rapporté, en particulier en relation avec le métabolisme lipidique. Pour vérifier que son rôle se situait bien au niveau intracellulaire, nous avons mis en place une expérience avec une protéine PEDF recombinante. L'idée ici a simplement été de vérifier son impact, direct ou indirect, sur les lymphocytes T CD8+. Dans une expérience, nous avons mis pendant 48h en co-culture des lymphocytes T avec ou sans la protéine recombinante. Puis nous avons acquis en cytométrie en flux les lymphocytes T pour vérifier l'expression de certains marqueurs, tels que CD44 et PD-1, qui permettent de discriminer les lymphocytes T effecteurs, mémoires et épuisés. Nos résultats préliminaires indiquent que la présence de la protéine recombinante dans le surnageant n'influence pas le développement des lymphocytes T CD8+. Ces différents résultats, qui doivent être confirmés, nous laissent donc penser que le rôle de la *SERPINF1* dans l'apparition d'une résistance à l'anti-PD-1, se déroule bien au niveau intracellulaire dans la cellule tumorale.

Notre laboratoire est spécialisé dans les interactions entre les cellules tumorales et le système immunitaire mais le pan métabolique ne faisait pas partie de nos compétences de prédilection. Pour étudier ce lien, nous nous sommes rapprochés de plusieurs experts comme Hubert Vidal et Assia Delfassi, de l'unité CARMEN à Lyon. Leurs conseils nous ont permis d'identifier nos besoins et de mettre en place les expériences appropriées pour répondre à notre problématique. Après avoir démontré de manière simple à l'aide du red oil qu'il y avait bien une différence en quantité de lipides dans les modèles résistants *versus* sensibles, nous avons voulu identifier quels types de lipides étaient augmentés. Les résultats présentés dans

l'article indiquent une augmentation des acides gras saturés et mono insaturés dans nos modèles résistants à l'anti-PD-1. Ceci est en corrélation avec la littérature qui démontre le rôle anti-tumoral des acides gras polyinsaturés *a contrario* des deux autres sous-catégories<sup>468</sup>. A l'aide de l'Orlistat, nous avons pu démontrer le potentiel anti-tumoral d'une thérapie ciblant la synthèse des acides gras. Cette publication doit être complétée par de futures expériences. Nous souhaitons faire de nouveau l'expérience de combinaison avec l'orlistat, pour déterminer par cytométrie en flux le changement phénotypique des lymphocytes T CD8+ ainsi que l'expression du CD36. En effet, ce transporteur transmembranaire d'acides gras a été corrélé à une moins bonne survie chez des patients atteints de mélanome<sup>469</sup>. Récemment, il a été démontré que l'absorption des acides gras par les lymphocytes T CD8+ grâce au CD36 diminuait leur fonction effectrice anti-tumorale<sup>470</sup>. Cette nouvelle expérience pourrait nous permettre de mieux comprendre quel processus en aval de PEDF conduit à une résistance à l'anti-PD-1 (Figure 39).



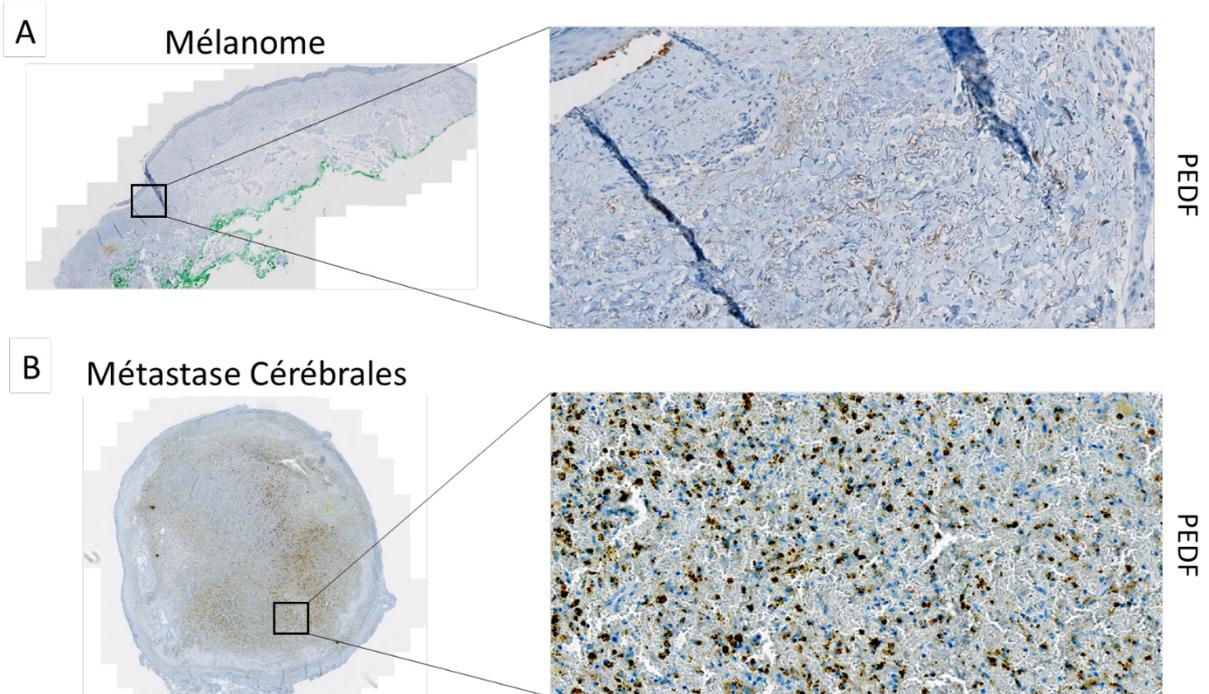
**Figure 39. Hypothèse mécanistique d'un effet compensatoire de résistance permettant une inhibition de novo des lymphocytes T CD8+.** (A) Interaction PD-1/PD-L1 enclenchant une cascade de signalisation permettant un *switch* métabolique glycolytique vers FAO. Les lymphocytes T CD8+ effecteurs mûrissent vers un phénotype épuisé. (B) L'anti-PD-1 permet de bloquer l'interaction PD-1/PD-L1. Les lymphocytes T CD8+ peuvent se réactiver. (C) Effet compensatoire théorique mit en place par les cellules tumorales permettant d'outrepasser le traitement anti-PD-1. Les cellules tumorales surexpriment *SERPINF1*. La voie de synthèse des acides gras est activée. Les cellules tumorales relarguent le surplus d'acides gras dans le microenvironnement. Les lymphocytes T CD8+ les absorbent induisant une voie parallèle d'activation de FAO. Les lymphocytes T CD8+ effecteurs mûrissent vers un phénotype épuisé.

Également, nous avons effectué une expérience de séquençage d'ARN sur cellule unique dans le modèle MC38 WT et aPD-1-R. Cette expérience est en cours d'analyse et devrait être intégrée

aux précédents résultats. Nous avons choisi de faire un séquençage des cellules tumorales et des cellules immunitaires pour chacune des tumeurs. Cette étude devrait permettre d'éclaircir les mécanismes qui impliquent la SERPINF1 mais également de déterminer précisément le profil d'activation des lymphocytes T CD8+.

Ce travail ouvre une voie dans la lutte contre les résistances aux ICI et pourrait à terme être bénéfique pour la prise en charge patient. Cependant, perturber la production de lipide peut faire émerger d'autres problèmes, il est donc important de réussir à agir au niveau du microenvironnement tumoral sans perturber l'ensemble de l'hôte. Toutefois, un énorme travail reste à accomplir pour espérer faire un parallèle chez l'Homme. Pour ce faire, nous avons initié des démarches auprès de cliniciens comme Michaël Duruisseaux (Médecin Pneumologie Hôpital Louis-Pradel, hospices civils de Lyon) et auprès de regroupement comme ImmuCare pour obtenir des échantillons de patients appariés, avant et après apparition de la résistance sous traitements de type anti-PD-1 ou anti-PD-L1 afin d'évaluer la pertinence clinique de ce gène.

Pour avancer ce travail, nous avons validé sur des échantillons de patients atteints de mélanome et sur des métastases cérébrales, la bonne spécificité de l'anticorps anti-PEDF (Figure 40).



**Figure 40. Image représentative du marquage PEDF sur des échantillons de tumeurs patients.** (A) Coupe de patient atteint de mélanome. (B) Coupe de patient atteint de cancer primitif du poumon avec métastase cérébrales.

L'idée de ce futur travail est de comprendre si oui ou non la *SERPINF1* est surexprimée chez des patients développant une résistance acquise et si cela est en lien avec une augmentation de la charge lipidique dans les cellules tumorales. Cette étude aura une triple fonction : elle permettra l'identification d'un biomarqueur, une meilleure compréhension du mécanisme sous-jacent et *in fine* une potentielle solution thérapeutique.

## Chapitre IV. Résultats

### Comparaison du microenvironnement immunitaire tumoral du modèle MC38 colorectal implanté en sous-cutané *versus* orthotopique

#### 1. Introduction

Des deux études précédentes qui se sont concentrées sur l'établissement de modèles *in vivo* innovants détenant une résistance acquise aux ICIs puis à l'identification d'un mécanisme de résistance, l'une des limites majeures qui en découle est le site d'implantation des tumeurs chez la souris en sous-cutané. En effet, le microenvironnement immunitaire tumoral en est extrêmement dépendant. Dans un souci de reproductibilité et de facilité, la plupart des recherches sont établies sur des modèles implantés en sous-cutané et non orthotopique. Également, certaines recherches se basent sur des modèles tumoraux spontanés mais le temps nécessaire pour produire ces modèles est un frein majeur qui explique pourquoi peu d'études les utilisent. Par conséquent, la plupart des interprétations sont effectuées sur le microenvironnement immunitaire tumoral créé en sous-cutané. Le problème majeur est que les organes ont une architecture et une composition cellulaire particulière. Le cancer colorectal est un des exemples les plus parlants. Le colon est constitué de 3 éléments impliqués dans la défense immunitaire: i) la muqueuse intestinale qui représente une surface d'échanges extrêmement importante, elle permet de filtrer les nutriments, ii) le système immunitaire intestinal, qui concentre environ 60% des cellules immunitaires, iii) le microbiote intestinal qui joue un rôle essentiel dans la défense du soi<sup>471</sup>. Concernant les cellules immunitaires présentes dans le colon, les macrophages sont majoritaires<sup>472</sup>. Pourtant, dans le cadre du cancer colorectal, malgré l'abondance de ces cellules, leur rôle précis reste à définir. Le microbiote joue également un rôle considérable dans la modulation de l'immunité. Ces différences majeures impliquent qu'une implantation tumorale en sous-cutané ne pourra pas

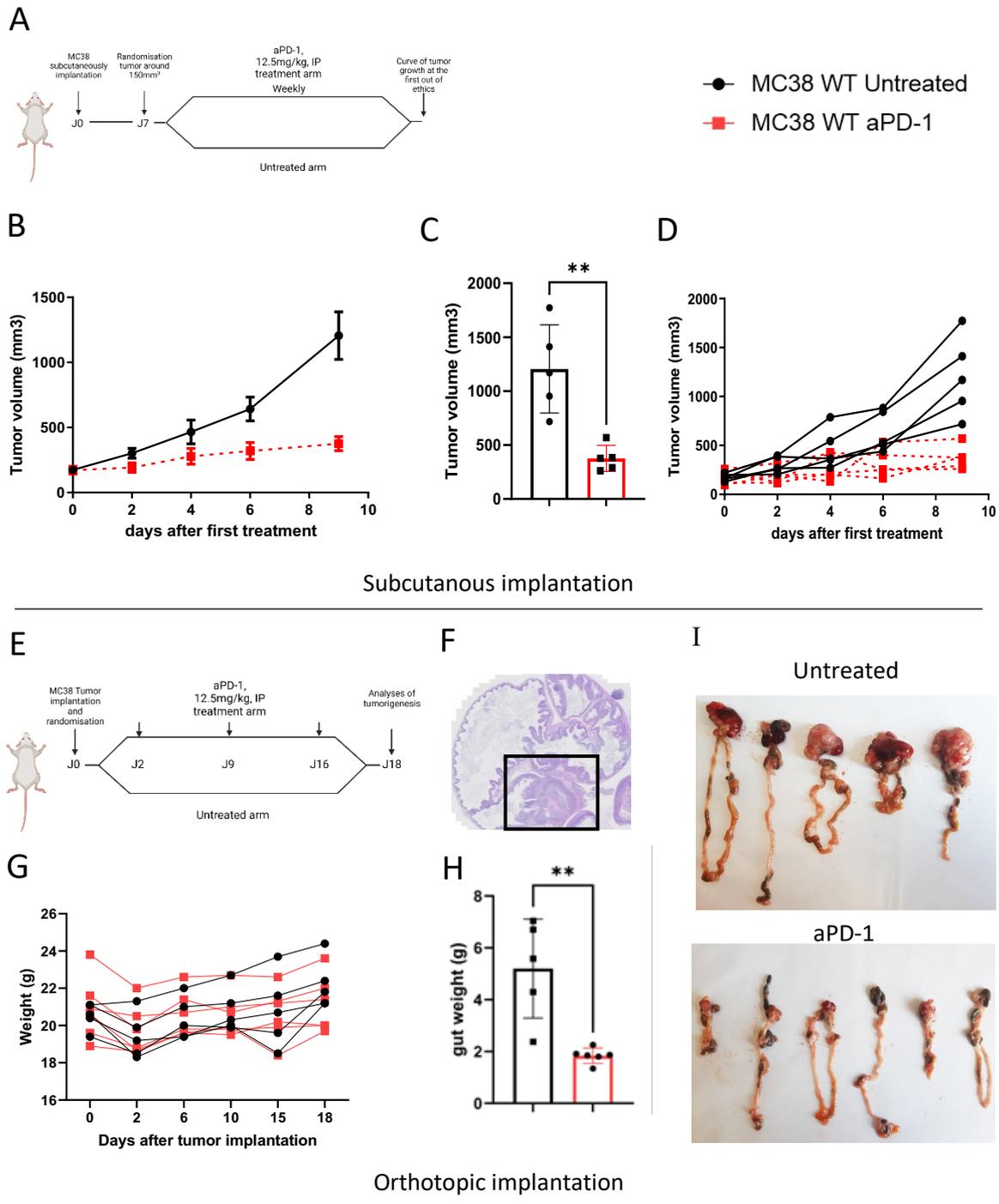
refléter les interactions réelles qui existent entre les cellules tumorales et leur microenvironnement. Il est certain que la transposition d'un mécanisme découvert sur un modèle murin à l'Homme n'est pas toujours couronnée de succès. De ce constat, nous avons voulu comparer, pour l'un de nos modèles à savoir MC38, comment le site d'implantation sous-cutané *versus* orthotopique impactait la composition des cellules immunitaires infiltrant la tumeur. L'objectif étant de savoir si l'on peut diminuer le biais expérimental, déjà important, en implantant les tumeurs dans leurs sites anatomiques de prédilection. De plus, l'aboutissement, *in fine*, a été de créer un modèle orthotopique avec une résistance acquise aux ICIs permettant ainsi de mettre à l'épreuve nos hypothèses issues de tumeurs implantées par voie sous-cutanée.

Les résultats obtenus sont décrits ci-dessous et devraient faire l'objet d'une soumission à la publication une fois complets.

## 2. Résultats

La première étape a bien évidemment été de mettre en place une technique d'implantation reproductible. Ce processus a été de longue haleine. Nous avons d'abord essayé une technique facile et rapide à savoir l'injection d'une suspension cellulaire à différentes concentrations dans les feuillets du caecum. Cette technique s'est avérée peu reproductible dans la prise tumorale, ce qui nous a conduit à essayer une greffe d'un morceau de tumeur solide directement sur le caecum. Cette technique reproductible, nous a encouragé à poursuivre notre investigation. Après plusieurs tests de tumorigénèse, nous avons estimé que le point hors éthique était atteint en seulement 18 jours.

La deuxième étape, après l'identification des points limites appropriés qui en incombait, a été de tester la sensibilité à l'anti-PD-1 et l'anti-PD-L1.



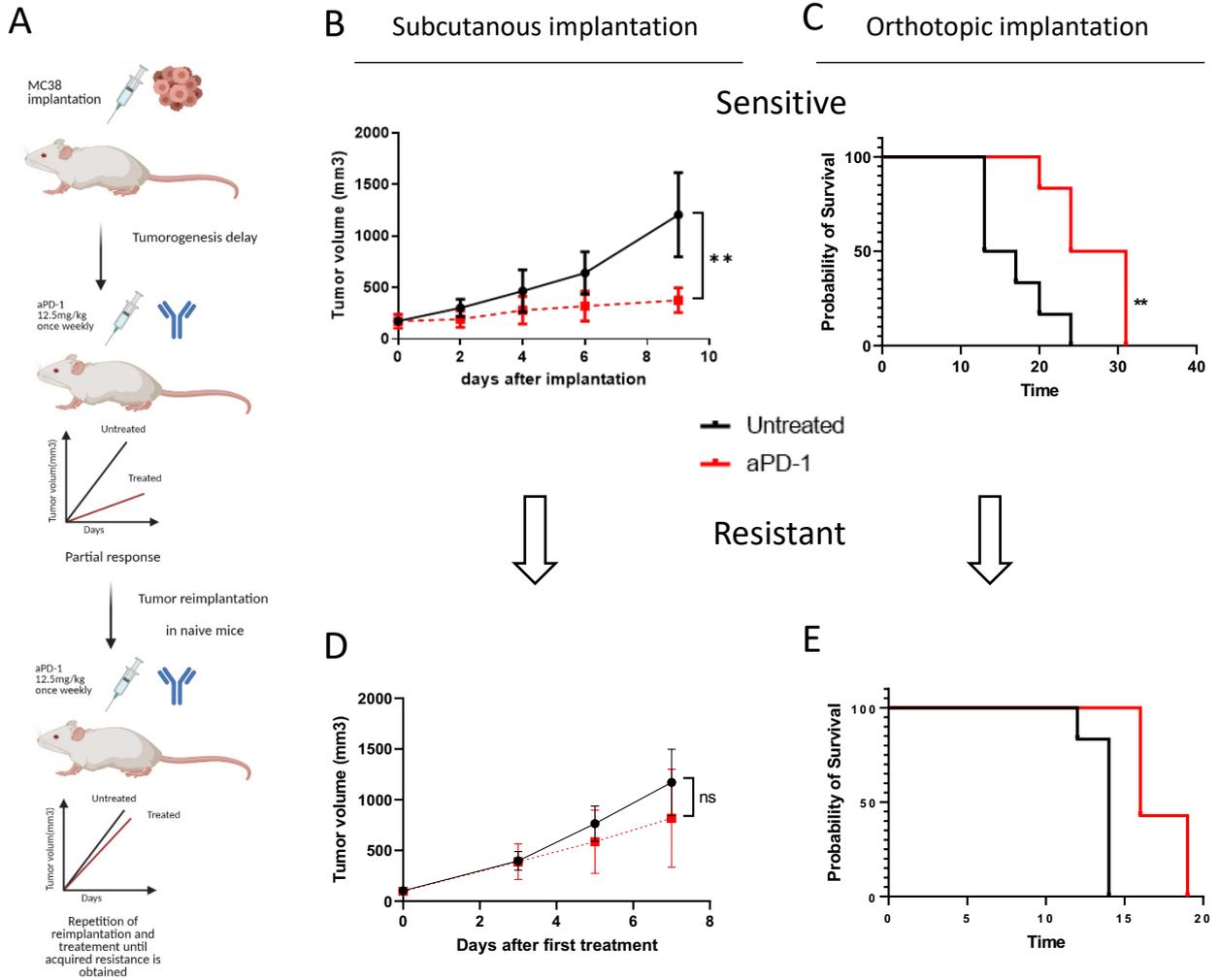
**Figure 41. Sensibilité au traitement anti-PD-1 sur le modèle MC38 implantation sous-cutanée versus orthotopique.** (A) Schéma d'administration du traitement pour les souris C57Bl/6 implantées avec un morceau de tumeur MC38 en sous-cutané. Les souris ont été randomisées quand le volume tumoral a atteint 150mm<sup>3</sup>, puis elles ont été traitées ou non avec l'anti-PD-1 (BioXCell, BE0146, RRID : AB\_10949053, 12.5 mg/kg par semaine, intrapéritonéal). (B) Courbe représentant l'évolution du volume tumoral des souris greffées

avec MC38 en sous-cutanée non traitées ou traitées avec l'anti-PD-1. (C) Valeur individuelle du dernier point de mesure des souris ayant reçu un traitement ou non. (D) Courbe individuelle représentant l'évolution du volume tumoral des souris greffées avec MC38 en sous-cutané non traitées ou traitées avec l'anti-PD-1. (E) Schéma d'administration du traitement anti-PD-1 pour les souris C57Bl/6 implantées avec un morceau de tumeur MC38 en orthotopique. (F) Image représentative d'une tumeur MC38 implanté sur le caecum à J4 (G) Courbe individuelle représentant l'évolution pondérale en grammes des souris greffées avec MC38 en orthotopique non traitées ou traitées avec l'anti-PD-1. (H) Valeur individuelle du poids des intestins à J18 des souris ayant reçu un traitement ou non. (I) Photographies des intestins non traités et traités greffés avec MC38 en orthotopique. Les données représentent la moyenne du volume tumoral et les bars d'erreurs représentent  $\pm$  SEM. n=5 souris/groupes, \*\*:  $p < 0.01$ , Mann Whitney t-test.

Nous avons comparé la sensibilité au traitement avec les deux types d'implantation sous-cutanée et orthotopique. Pour la première implantation, nous avons choisi un schéma d'administration classique, à savoir un premier traitement à 150mm<sup>3</sup> à 12,5mg/kg une fois par semaine en intrapéritonéal (Figure 41A). Comme décrit dans la littérature et dans nos résultats précédents, nous avons obtenu une réponse partielle suite au traitement anti-PD-1 par rapport aux souris non traitées (Figure 41B, 41C, 41D). Pour le deuxième type d'implantation, à savoir orthotopique, nous avons choisi de traiter les souris 48 heures après l'implantation, également une fois par semaine à 12,5 mg/kg (Figure 41E). En effet, nous avons choisi un traitement précoce car suite à nos tests de tumorigenèse nous avons remarqué que les tumeurs se développaient plus agressivement lorsqu'elles étaient implantées en orthotopique par rapport à l'implantation sous-cutanée (18 jours *versus* 25 jours maximum respectivement). Par rapport au modèle sous-cutané la fenêtre thérapeutique est encore plus petite. En effet, à J4 la tumeur est déjà complètement établie et intégrée au caecum (Figure 41F). Comme, nous ne disposions pas d'outils d'imagerie permettant d'effectuer un suivi longitudinal aisé, nous avons suivi le poids (Figure 41G) et nous avons palpé l'abdomen des souris quotidiennement car la tumeur devient rapidement perceptible au toucher. Pour cette étude, nous avons mis à mort toutes les souris lorsque l'une d'entre elles avait atteint le point éthique. À partir de cette expérience, nous avons également obtenu une réponse partielle à l'anti-PD1 dans le groupe de souris traitées par rapport aux souris non traitées (Figure 41H, 41I).

De ces résultats, il s'est avéré que notre modèle est bien partiellement sensible à l'anti-PD-1 comme pour le modèle implanté en sous-cutané. De ces expériences nous nous sommes donc focalisés sur l'induction d'une résistance acquise à l'anti-PD-1.

Pour ce faire, le principe était identique que pour le modèle sous-cutané ; nous avons effectué une réimplantation de fragments en série à chaque fois sous pression de sélection de l'anti-PD-1 (Figure 42A). Après cinq passages pour le modèle sous-cutané et sept passages pour le modèle orthotopique, le traitement n'a plus d'effet sur la croissance tumorale par rapport au groupe non traité. Les modèles sensibles implantés par voie sous-cutanée ou orthotopique ont démontré tous deux comme attendu un retard de croissance partiel et/ou une meilleure survie globale (Figure 42B, 42C respectivement,  $p < 0,01$ ). *A contrario*, lorsque la résistance acquise est en place, il n'y a plus de différence de croissance ou de survie globale par rapport aux groupes non traités (Figure 42D, 42E respectivement).



**Figure 42. Induction de la résistance acquise au traitement anti-PD-1 dans le modèle MC38 implanté en sous-cutané *versus* orthotopique.** (A) Représentation schématique du principe d'induction d'une résistance secondaire à l'anti-PD-1. (B) Courbe représentant l'évolution du volume tumoral des souris greffées avec MC38 en sous-cutané non traitées ou traitées avec l'anti-PD-1. (C) Survie globale des souris greffées avec MC38 en orthotopique non traitées ou traitées avec l'anti-PD-1. (D) Courbe représentant l'évolution du volume tumoral des souris greffées en sous-cutané avec un modèle MC38 devenu résistant à l'anti-PD-1. (E) Survie globale des souris greffées en orthotopique avec un modèle MC38 devenu résistant à l'anti-PD-1. Les données montrées représentent la moyenne du volume tumoral et les barres d'erreurs représentent  $\pm$  SEM.  $n=5$  souris/groupes, \*\*:  $p<0.01$ , Mann Whitney t-test.

Suite à l'établissement de ces deux modèles, nous avons étudié le microenvironnement immunitaire infiltrant la tumeur à l'aide du panel d'immunophénotypage de 29 couleurs précédemment cité. L'objectif étant ici de comprendre les changements phénotypiques immunitaires en fonction du site d'implantation, il nous a semblé opportun d'effectuer notre

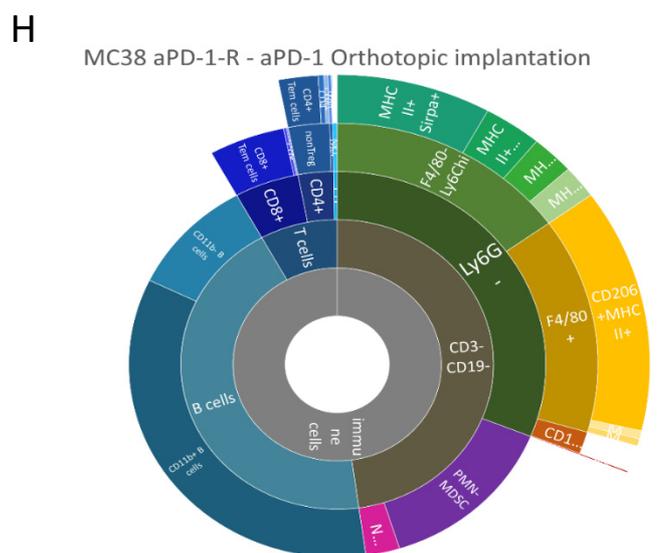
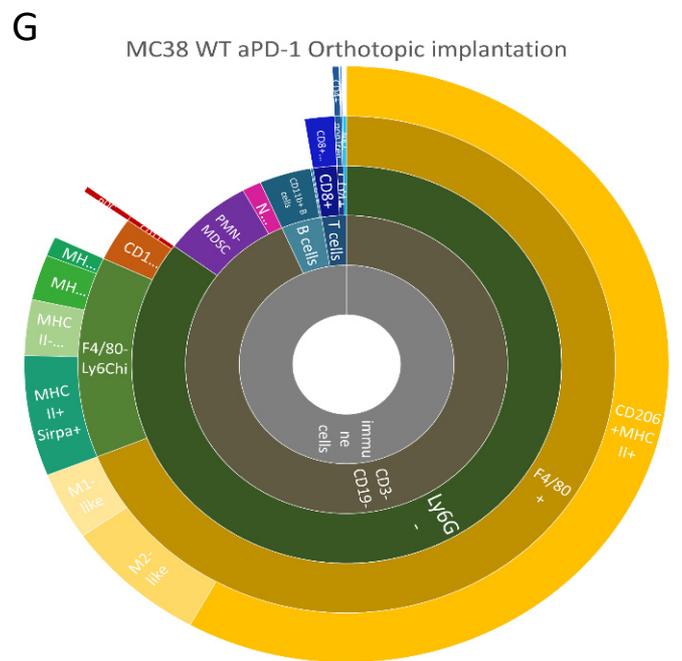
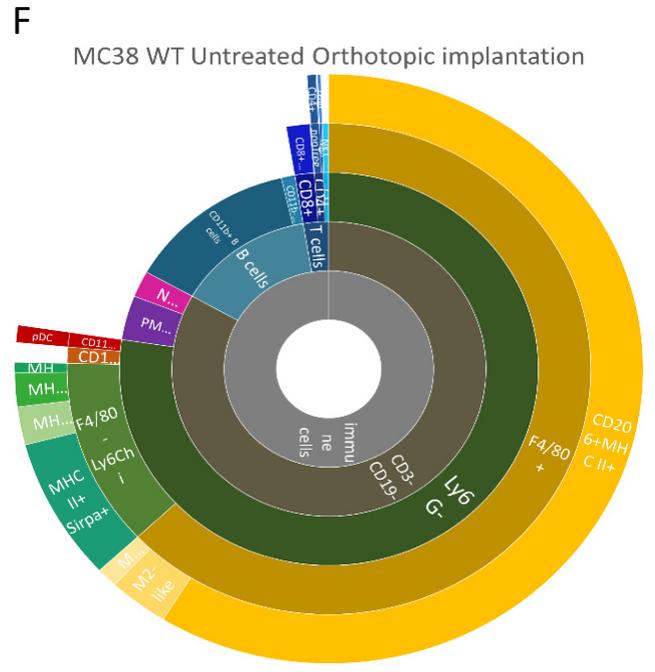
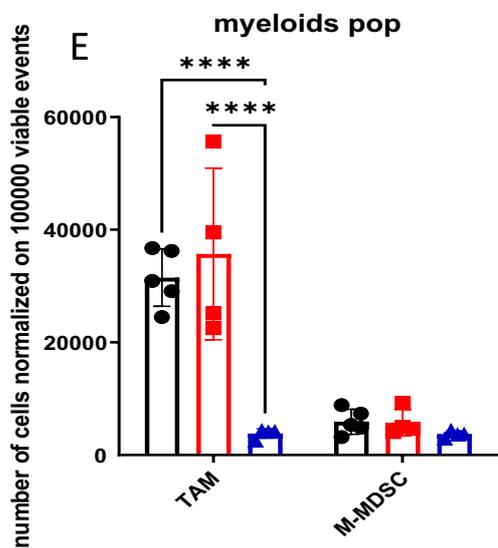
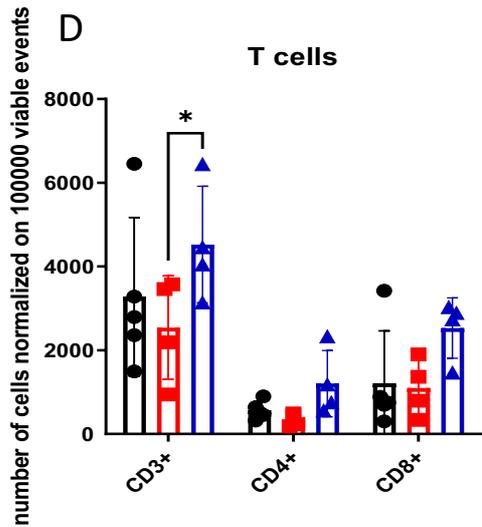
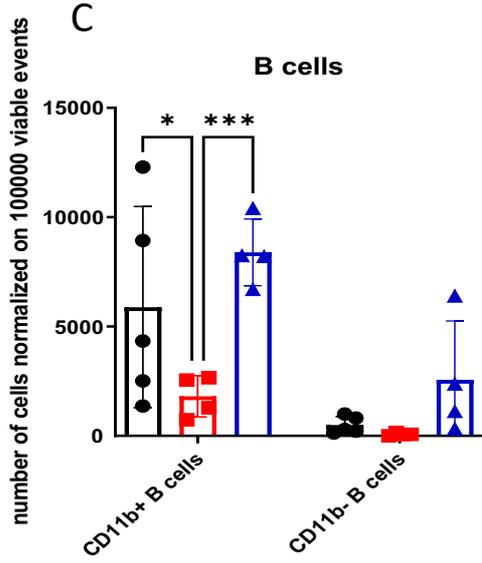
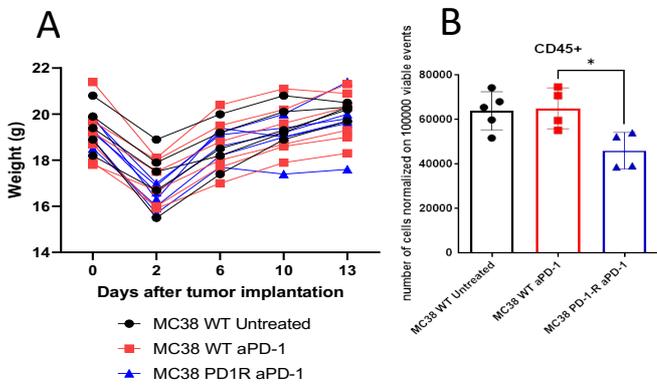
immunophénotypage à un temps plus tardif, à savoir en cours de croissance et post-traitement.

Après avoir dissocié et digéré les tumeurs à l'aide du gentle MACS Octo Dissociator (130-096-427, Miltenyi Biotec), les suspensions ont été filtrées (filtres de 100 µm, 130-110-917, Miltenyi Biotec) puis lavées avec du PBS1X. Après 15min d'incubation à température ambiante avec les anticorps de surface et lavage, les cellules ont été fixées et perméabilisées avec le kit de BD Cytofix/Cytoperm (BD, 554714, RRID : AB\_2869008) pendant 30 min à 4°C. Enfin, après lavage, les cellules ont été marquées en intracellulaire avec les anticorps appropriés. Une fois lavés, les échantillons ont été acquis sur le cytomètre Cytex<sup>®</sup> Aurora. L'analyse a été effectuée à l'aide de deux logiciels SpectroFlo<sup>®</sup>Software (Cytex<sup>®</sup> Biosciences) et FlowJo software (BD). L'analyse graphique et statistique a été faite à l'aide du logiciel GraphPad Prism (cf. tableau 1 et 2, chapitre 2).

Ce projet est en cours. Pour cette raison nous ne disposons que de résultats préliminaires. Seules les tumeurs MC38 implantées en orthotopique ont été complètement immunophénotypées (Figure 43).

Nous avons prélevé les tumeurs à J13 post implantation : les souris avaient donc reçu deux doses anti-PD-1 (la première 48h post-implantation et la seconde 7 jours plus tard) (Figure 43A). De cette expérience, un premier constat peut être fait : la proportion de cellules immunitaires infiltrantes est diminuée dans les tumeurs résistantes (Figure 43B). Concernant les cellules lymphoïdes, les cellules B et T sont proportionnellement plus présentes dans le modèle résistant que dans le modèle WT, que celui-ci soit traité ou non (Figure 43C, 43D, 43F, 43G, 43H). De plus, les cellules macrophagiques F4/80+ sont majoritaires dans le microenvironnement tumoral des tumeurs MC38 WT non traitées et traitées, contrairement à ce que nous observons dans les tumeurs résistantes traitées à l'anti-PD-1 (Figure 43E, 43F, 43G, 43H).

Ces premiers résultats doivent être maintenant confrontés aux modèles implantés par voie sous-cutanée. Cette étude est en cours et les résultats complets devraient être disponibles prochainement.



CD4+ Tem cells	CD4+ Tcm cells	CD4+ Tnaive cells	Treg cm cells	Treg em cells	CD8+ Tem cells	CD8+ Tcm cells	CD8+ Tnaive cells	CD11b+ B cells	CD11b- B cells	NKT	NK cells	PMN-MDSC	CD11b+ DC	pDC	F4/80+ CD206+ MHC II+	F4/80+ M1-like	F4/80+ M2-like	F4/80- Ly6C <sup>hi</sup> MHC II- Sirpa+	F4/80- Ly6C <sup>hi</sup> MHC II+ Sirpa+	F4/80- Ly6C <sup>hi</sup> MHC II+ Sirpa-	F4/80- Ly6C <sup>hi</sup> MHC II- Sirpa-
----------------	----------------	-------------------	---------------	---------------	----------------	----------------	-------------------	----------------	----------------	-----	----------	----------	-----------	-----	-----------------------	----------------	----------------	------------------------------------------	------------------------------------------	------------------------------------------	------------------------------------------

**Figure 43. Microenvironnement immunitaire des tumeurs MC38 implantées en orthotopique.** (A) Courbe individuelle du suivi pondéral des souris implantées avec des tumeurs MC38 WT traitées ou non à l'anti-PD-1 et résistante à l'anti-PD-1 à 12,5mg/kg. (B) Histogramme représentant la proportion de cellules CD45+. (C) Histogramme représentant la proportion de cellules B. (D) Histogramme représentant la proportion de cellules T. (E) Histogramme représentant la proportion des TAMs et M-MDSC. (F-H) Découpage de la proportion de chaque cellule immunitaire présente dans le microenvironnement tumoral. (F) Souris implantées non traitées avec des tumeur MC38 WT. (G) Souris implantées traitées à l'anti-PD-1 avec des tumeur MC38 WT. (H) Tumeur MC38 résistante à l'anti-PD-1 sous pression de sélection. Les données montrées représentent le nombre de cellules immunitaires normalisé sur 100000 évènements viables et les barres d'erreurs représentent  $\pm$  SEM. n=5 souris/groupe, \* :  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ , Mann Whitney t-test.

### 3. Conclusion

Grace à ce travail nous avons pu développer un modèle de tumeur colorectale implantée en orthotopique. Les résultats que nous sommes en train de générer devraient nous permettre de mieux appréhender les biais expérimentaux en lien avec le site d'implantation. Également, ils devraient nous permettre de déterminer quelles différences existent entre les microenvironnements tumoraux immunitaires. Nous aimerions caractériser en profondeur le microenvironnement immunitaire tumoral par une étude longitudinale d'immunophénotypage mais aussi par une caractérisation de cellules immunitaires plus spécifiques du microenvironnement colorectal comme les ILCs. Il serait également intéressant d'analyser la proportion des bactéries présentes dans le microbiote. Notre hypothèse de travail est que ce modèle orthotopique est un meilleur reflet des modèles tumoraux colorectaux humains que les modèles sous-cutanés, et tester des combinaisons de traitement sur ce modèle aiderait à proposer des solutions thérapeutiques qui auront certainement plus de chance de fonctionner pour les patients ne répondant plus aux ICIs.

Pour continuer dans ce sens, nous avons déposé un protocole qui nous permettra d'implanter en orthotopique les modèles de vessie et le modèle rénal chez la souris. Dans un futur projet, i) l'analyse de ces modèles dans leur environnement de prédilection, ii) l'induction d'une résistance acquise (si ceux-ci sont sensibles de la même manière que les modèles implantés en sous-cutané), iii) et enfin l'étude de la réversion de cette résistance pourra permettre

d'avancer de nouvelles hypothèses mécanistiques spécifiques de chaque modèle, voire de déceler un mécanisme commun. Au-delà de comprendre les problématiques précédemment citées, ce projet a également une portée économique et pourra à terme permettre à Antinéo de proposer à sa clientèle ce type d'expérience.

## Chapitre V. Résultats

### L'hyperprogression induite par anti-PD-1/PD-L1, réalité ou mythe ?

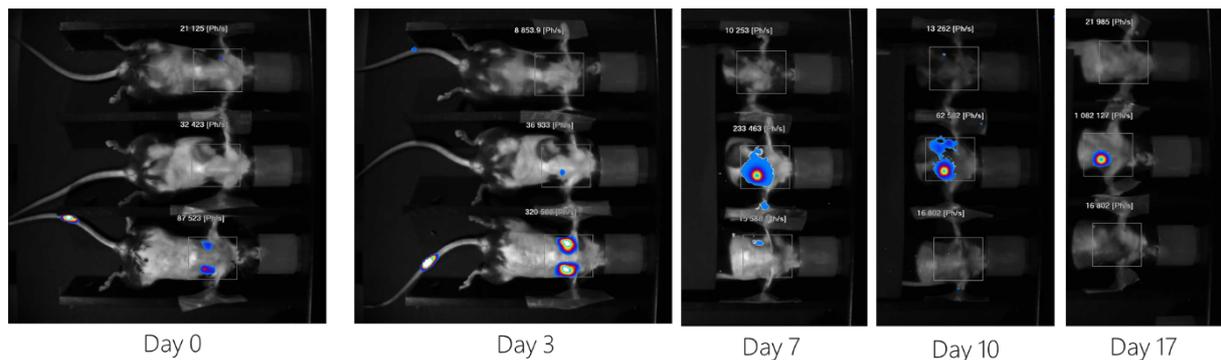
L'étude de l'hyperprogression est aujourd'hui un défi pour plusieurs raisons. La première est le manque de consensus chez les praticiens hospitaliers sur la définition de ce phénomène. La deuxième, corollaire de la première, est la méthode de détection de l'hyperprogression qui diffère en fonction des centres. Par exemple, certains chercheurs utilisent comme critère d'évaluation le taux de croissance tumorale deux fois plus élevé après traitement qu'avant, d'autres chercheurs utilisent la cinétique de croissance tumorale qui correspond à la différence entre la ligne de base pré-traitement et la ligne de base de la somme des plus grands diamètres des lésions cibles par unité de temps, d'autres encore se réfèrent à un score comprenant plusieurs paramètres tels que le temps jusqu'à l'échec du traitement ou l'apparition de 2 nouvelles lésions ou plus<sup>412,413,473</sup>. La troisième est la difficulté à rassembler des échantillons d'une cohorte de patients appariés et homogènes qui permettrait de comprendre si ce processus est bel et bien déclenché par les ICIs. La quatrième est de comprendre quels mécanismes sous-jacents sont impliqués. Enfin, le cinquième point que nous pouvons soulever est l'hétérogénéité de cette réponse en fonction du type de cancer. Comme indiqué précédemment, cette réponse survient en fonction du type de cancers chez 4 à 29% des patients<sup>474</sup>.

Cette problématique nous a amené à essayer d'identifier des modèles *in vivo* syngéniques hyperprogressseurs. La difficulté de ce travail réside dans l'hétérogénéité de la réponse aux ICIs, comme cela est bien visualisé dans les graphiques montrant la progression du volume tumoral de souris individuelles. Quand bien même les souches de souris que nous utilisons en laboratoire sont censées répondre de façon identique au traitement, nous savons que cette règle n'est pas figée. Nous sommes donc partis de ce constat pour essayer de détecter des réponses de type hyperprogressseur.

Notre stratégie a donc été de sélectionner des lignées de souris syngéniques avec une croissance tumorale agressive ne répondant pas aux ICI. L'idée a été de travailler sur des groupes comportant un nombre important de souris pour augmenter nos chances de détecter un phénotype qui s'apparente à de l'hyperprogression.

De notre banque de lignées, nous avons sélectionné, au début de notre démarche, trois lignées de type tumoral différent : LL2-Luc lignée de cancer du poumon, L1210 lignée de leucémie lymphoïde de souris dérivée du liquide d'ascite, E0771 lignée de cancer du sein. Pour s'affranchir des biais précédemment exprimés, nous avons décidé d'implanter ces lignées en orthotopique.

L'une des lignées à savoir LL2-luc a été abandonnée en cours d'étude : en effet, celle-ci perdait de manière aléatoire *in vivo* sa luminescence, ce qui rendait son suivi par imagerie thoracique impossible (Figure 44).

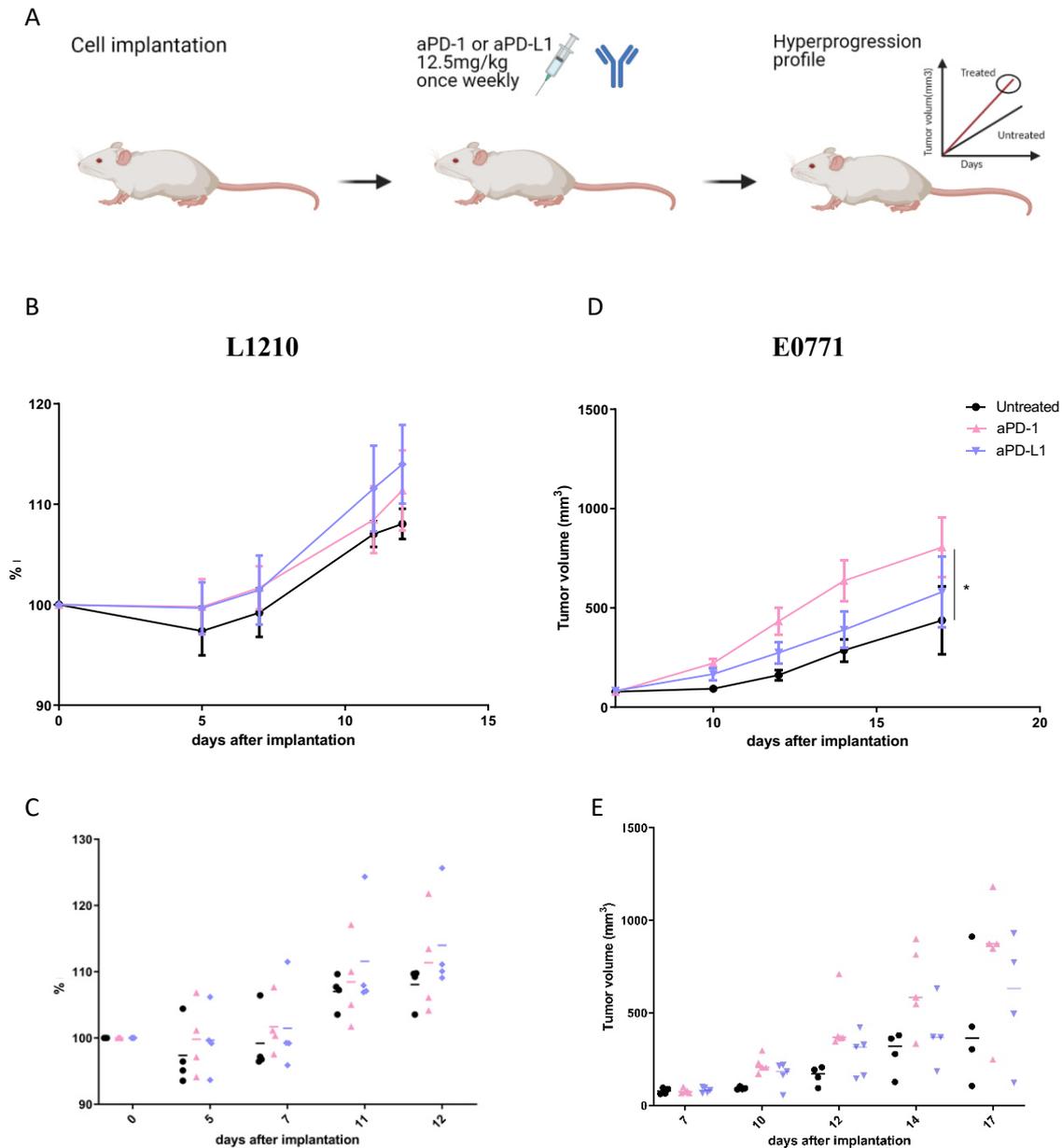


**Figure 44. Imagerie représentative de 3 cas différents d'évolution en rapport avec la détection de la bioluminescence de LL-2-Luc.** 100µL de solution contenant  $1.10^6$  cellules LL-2-Luc ont été injectés en intraveineuse dans des souris C57BL/6. L'imagerie par bioluminescence a été faite sur l'appareil Night OWL. Un premier point de mesure de la luminescence a été fait le jour de l'injection, puis à J3, J7, J10 et J17, sous anesthésie (Isoflurane, TEMSEGA 3% 2L air/min) après une injection de 100 µL en IP de luciférine à 150mg/kg 10 minutes avant l'imagerie.

En effet, le suivi longitudinal de cette lignée *in vivo* par imagerie est un moyen efficace pour observer la prise tumorale, son évolution et l'apparition de métastases. Néanmoins, nous nous sommes heurtés à un problème majeur. En effet, pour certaines cellules nous avons observé une perte au fur et à mesure de leur luminescence.

Cette hétérogénéité trop importante nous a amené à sélectionner *in vitro* les cellules. Nous avons donc remis en culture et fait une nouvelle fois une sélection par exposition aux antibiotiques. Après avoir testé, à l'aide du Chaméleon, la luminescence de ces cellules nouvellement sélectionnées, nous les avons réinjectées *in vivo*. Le suivi longitudinal a montré une nouvelle fois que, malgré une sélection en amont, la détection ainsi que la prise tumorale étaient très hétérogènes.

Nous avons donc poursuivi avec les deux autres modèles précédemment cités à savoir L1210 et E0771.



**Figure 45. Evolution tumorale de L1210 et de E0771 suite aux traitements avec anti-PD-1 ou anti-PD-L1.** (A) Une suspension cellulaire de 200 $\mu$ L de L1210 ou de E0771 de  $5 \cdot 10^6$  cellules a été injectée en intrapéritonéal dans des souris B6D2F1 ou en intra-mammaire dans des souris C57BL/6 respectivement. Pour L1210, les souris ont été randomisées en fonction de leur poids initial, puis elles ont été traitées avec l'anti-PD-1 (BioXCell, BE0146, RRID : AB\_10949053, 12.5 mg/kg par semaine) ou l'anti-PD-L1 (BioXCell, BE0101, RRID : AB\_10949073, 12.5 mg/kg par semaine) en intrapéritonéal, 72h après l'injection des cellules. Pour E0771, les souris ont été randomisées quand le volume tumoral a atteint 100mm<sup>3</sup>, puis elles ont été traitées avec l'anti-PD-1 (BioXCell, BE0146, RRID : AB\_10949053, 12.5 mg/kg par semaine) ou l'anti-PD-L1 (BioXCell, BE0101, RRID : AB\_10949073, 12.5 mg/kg par semaine) en intrapéritonéal. (B)

Courbe représentant l'évolution pondérale en % par rapport au poids initial des souris injectées avec L1210 non traitées ou traitées avec l'anti-PD-1 ou l'anti-PD-L1. (C) Courbes individuelles représentant l'évolution pondérale en % du ratio par rapport au poids initial des souris injectées avec L1210 non traitées ou traitées avec l'anti-PD-1 ou l'anti-PD-L1. (D) Courbe représentant l'évolution du volume tumoral des souris injectées avec E0771 non traitées ou traitées avec l'anti-PD-1 ou l'anti-PD-L1. (E) Courbes individuelles représentant l'évolution du volume tumoral des souris injectées avec E0771 non traitées ou traitées avec l'anti-PD-1 ou l'anti-PD-L1. Les données montrées représentent la moyenne du % de ratio du poids ou du volume tumoral et les barres d'erreurs représentent  $\pm$  SEM. n=4 or 5 souris/groupe, \*: p<0.05, Mann Whitney t-test.

Suite à l'injection des cellules et au suivi de l'évolution des tumeurs, nous avons pu constater qu'au sein des groupes traités une disparité effective existait (Figure 45). En effet, les souris, bien que de la même souche, ne répondent pas au traitement de manière identique, au contraire des souris non traitées qui ont une pousse tumorale homogène. Sur chacune des expériences que nous avons faites, 1 à 3 souris évoluent plus vite après traitement par rapport au groupe non traité contrôle.

De cette constatation, nous avons décidé de continuer notre investigation par un immunophénotypage approfondi à l'aide d'un panel de 29 couleurs ayant déjà fait ses preuves sur nos précédents modèles (chapitres 2, 3 et 4). L'hypothèse sous-jacente a été que, comme chez l'Homme, un faible pourcentage de souris, suite au traitement par un ICI, pouvait avoir une tumeur qui évoluerait plus vite que si elle n'avait pas reçu de traitement.

Pour ce faire nous avons donc réitéré notre expérience et décidé de prélever les ascites pour les L1210 et les tumeurs E0771 chez les souris 48h après le deuxième traitement. Le protocole est le suivant : après avoir dissocié et digéré les tumeurs à l'aide du gentle MACS Octo Dissociator (130-096-427, Miltenyi Biotec), les suspensions ont été filtrées (filtres de 100  $\mu$ m, 130-110-917, Miltenyi Biotec) puis lavées avec du PBS1X. Après 15min d'incubation à température ambiante avec les anticorps de surface et lavage, les cellules ont été fixées et perméabilisées avec le kit de BD Cytotfix/Cytoperm (BD, 554714, RRID : AB\_2869008) pendant 30 min à 4°C. Enfin, après lavage, les cellules ont été marquées en intracellulaire avec les anticorps appropriés. Une fois lavés, les échantillons ont été acquis sur le cytomètre Cytex<sup>®</sup> Aurora. L'analyse a été effectuée à l'aide de deux logiciels SpectroFlo<sup>®</sup>Software (Cytex<sup>®</sup>

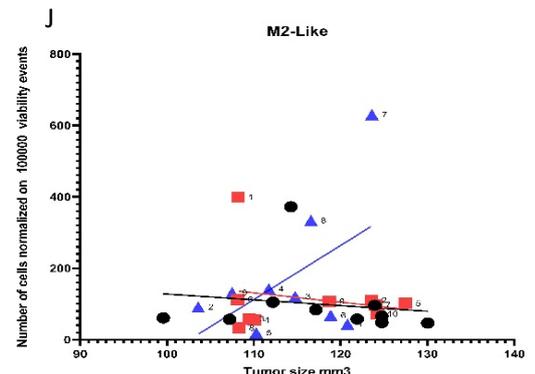
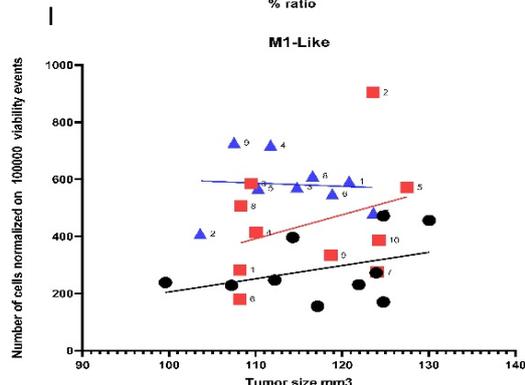
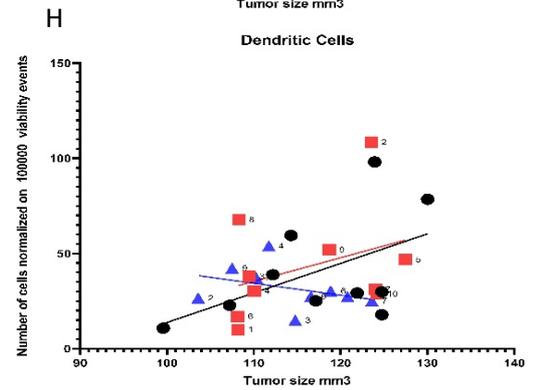
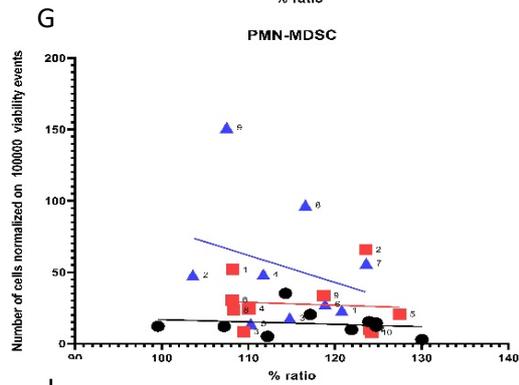
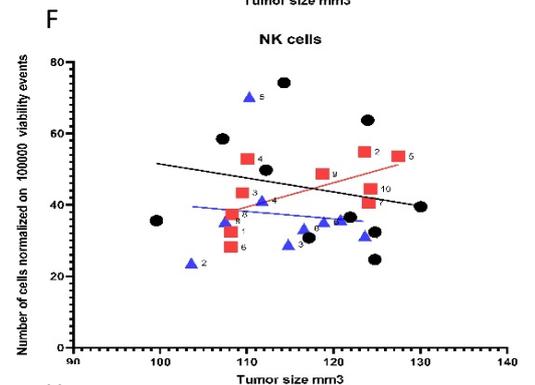
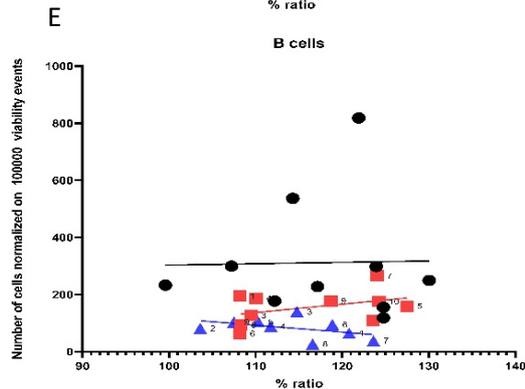
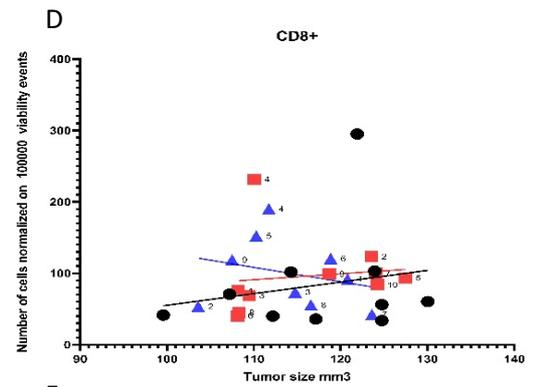
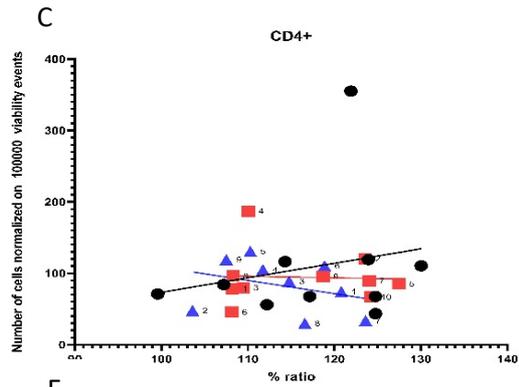
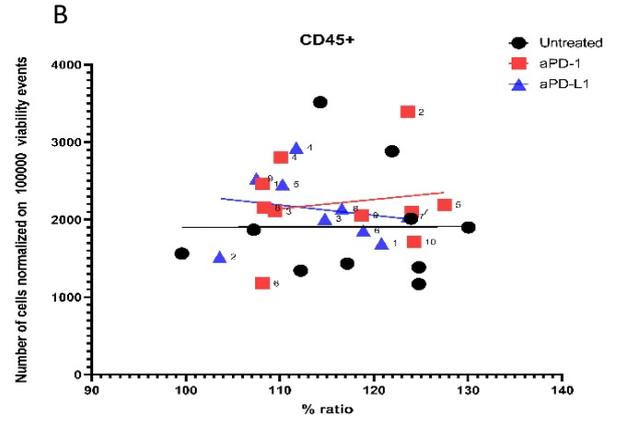
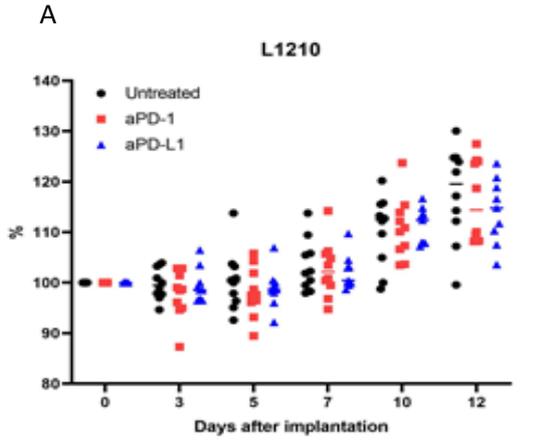
Biosciences) et FlowJo software (BD). L'analyse graphique et statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism (cf. tableau 1 et 2, chapitre 2).

Pour tenter d'établir une corrélation entre la présence d'une population immunitaire donnée et le phénotype hyperprogresseur suite aux traitements avec l'anti-PD-1 ou l'anti-PD-L1, nous avons décidé de regarder individuellement chaque échantillon pour associer soit le poids de la souris (pour L1210) soit le volume tumoral (pour E0771) aux sous-populations immunitaires d'intérêt.

Lors de notre expérience avec le modèle L1210, il fut malheureusement difficile de distinguer des profils hyperprogresseurs comme lors de nos précédentes études *in vivo* (Figure 46A).

La difficulté de ce modèle réside dans le peu d'infiltration immunitaire proportionnellement au nombre de cellules. En effet, il s'agit d'un modèle de leucémie de type lymphoïde B. La première difficulté est donc de discriminer correctement les cellules tumorales des cellules immunitaires puisque que celles-ci sont toutes CD45+. La discrimination s'est faite morphologiquement et à l'aide de marqueurs lymphoïdes ou myéloïdes supplémentaires. Il en résulte que seulement 2% de cellules CD45+, autre que les cellules tumorales, sont présentes dans le prélèvement d'ascite (Figure 46B). Bien évidemment, il est donc compliqué, malgré la puissance de notre panel et cette nouvelle technique, de discriminer en profondeur les sous-types immunitaires.

De ce fait, aucune population immunitaire n'a pu émerger comme ayant un potentiel d'induction d'hyper-prolifération. En effet, aucune augmentation de population n'a pu être corrélée avec une ascite plus importante en fonction du traitement. A titre d'exemple nous montrons ici les populations classiques lymphoïdes et myéloïdes (Figure 46). Les résultats n'étant pas concluants, nous avons choisi de ne pas les soumettre à la publication.



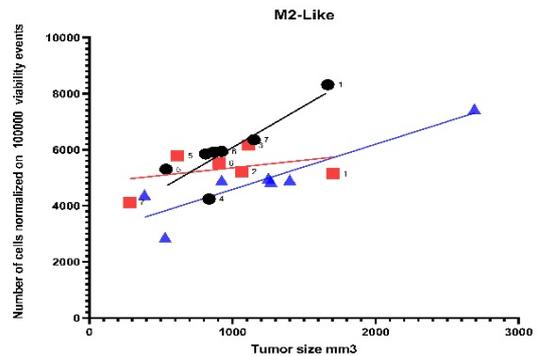
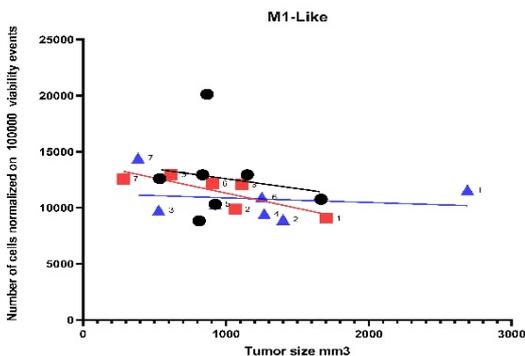
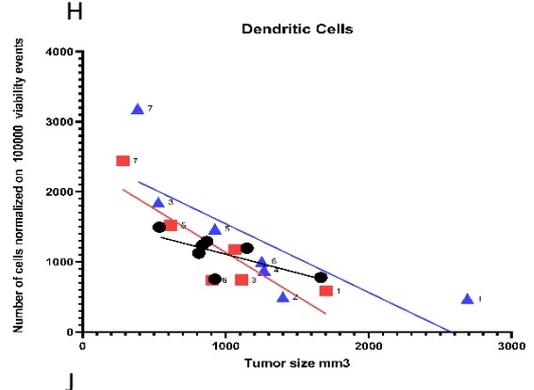
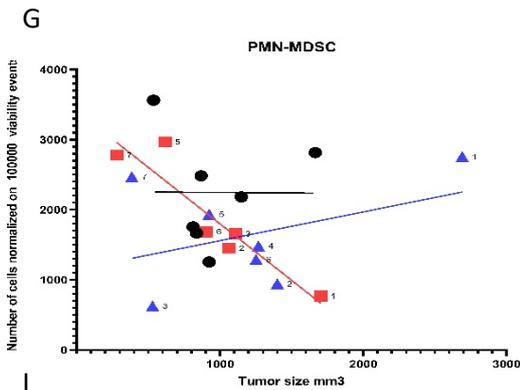
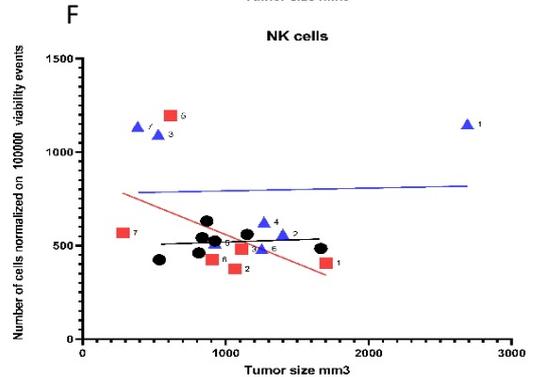
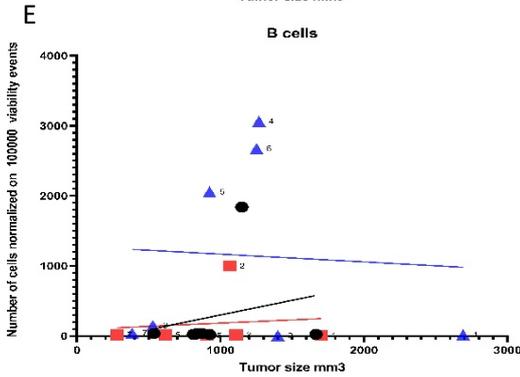
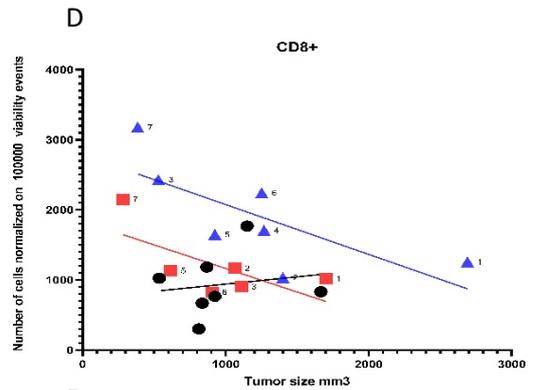
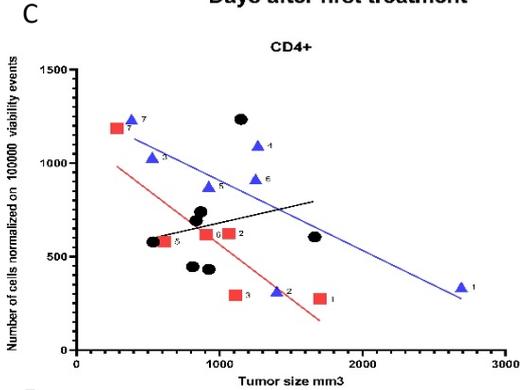
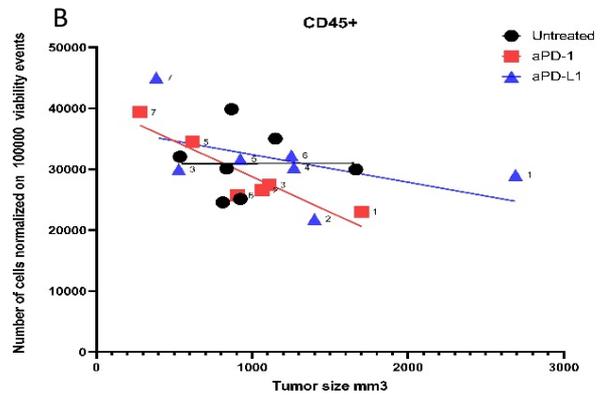
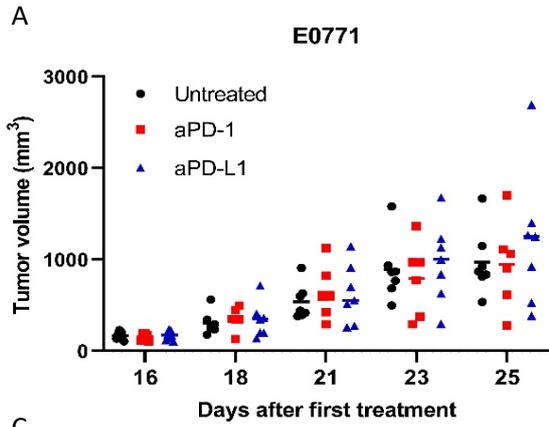
**Figure 46. Cellules immunitaires infiltrant les ascites L1210.** Une suspension cellulaire de 200µL de L1210 de  $5 \cdot 10^6$  cellules a été injectée en intrapéritonéale dans des souris B6D2F1. Les souris ont été randomisées en fonction de leur poids initial, puis elles ont été traitées avec l'anti-PD-1 (BioXCell, BE0146, RRID : AB\_10949053, 12.5 mg/kg par semaine) ou l'anti-PD-L1 (BioXCell, BE0101, RRID : AB\_10949073, 12.5 mg/kg par semaine) en intrapéritonéal, 72h après l'injection des cellules. Les ascites ont été récupérés 48h post deuxième traitement. (A) Volume tumoral individuel représentant l'évolution pondérale en %. Les graphiques qui suivront représentent la proportion de cellules d'intérêt au sein de 100000 évènements viables, en fonction du % du ratio et du traitement que les souris ont reçu. (B) Cellules CD45+. (C) Lymphocytes T CD4+. (D) Lymphocytes T CD8+. (E) Lymphocytes B. (F) Cellules NK. (G) PMN-MDSC. (H) Cellules Dendritiques. (I) Macrophages M1-like. (J) Macrophages M2-like.

Pour le modèle E0771, plusieurs souris avec une tumeur sous traitement se sont distinguées par leur pousse tumorale exacerbée par rapport aux souris portant des tumeurs non traitées (Figure 47A).

De façon attendue, plus le volume tumoral est important, plus l'infiltration immunitaire est faible (Figure 47B).

De la même manière, concernant l'infiltration immunitaire de type anti-tumoral, la même observation peut être effectuée. En effet, la proportion de lymphocytes T CD4+ et de lymphocytes T CD8+ ainsi que les DCs diminuent à mesure que le volume tumoral augmente (Figure 47C, 47D, 47H). Cette observation peut également être faite pour les PMN-MDSC bien qu'un *outlier* soit présent (Figure 47G). Par contre pour les lymphocytes B, les cellules NK et les macrophages de type M1-like, la proportion est relativement stable en fonction du volume tumoral (Figure 47E, 47F, 47I).

Concernant les macrophages de type M2-like, la proportion semble s'inverser. Plus le volume tumoral est fort, plus la proportion de cellules est importante (Figure 47J). Au vu de ces résultats et des précédentes publications qui se sont intéressées au rôle de ces macrophages dans l'hyperprogression, nous avons regardé l'intensité de fluorescence de PD-1 et de PD-L1. Aucune différence significative n'est apparue entre une éventuelle augmentation de la MFI en fonction du traitement et un plus fort volume tumoral.



**Figure 47. Cellules immunitaires infiltrant les tumeurs E0771.** Une suspension cellulaire de 200µL de E0771 de  $5 \cdot 10^6$  cellules a été injectée en intra-mammaire dans des souris C57BL/6. Les souris ont été randomisées quand le volume tumoral a atteint 100mm<sup>3</sup>, puis elles ont été traitées avec l'anti-PD-1 (BioXCell, BE0146, RRID : AB\_10949053, 12.5 mg/kg par semaine) ou l'anti-PD-L1 (BioXCell, BE0101, RRID : AB\_10949073, 12.5 mg/kg par semaine) en intrapéritonéal. Les tumeurs ont été récupérées 48h post deuxième traitement. (A) Volume tumoral individuel représentant l'évolution tumorale. Tous les graphiques qui suivent représentent la proportion de cellules d'intérêt au sein de 100000 événements viables, en fonction du volume tumoral en mm<sup>3</sup> et du traitement que les souris ont reçu. (B) Cellules CD45+. (C) Lymphocytes T CD4+. (D) Lymphocytes T CD8+. (E) Lymphocytes B. (F) Cellules NK. (G) PMN-MDSC. (H) Cellules Dendritiques. (I) Macrophages M1-like. (J) Macrophages M2-like.

Ces résultats ne permettent pas de déterminer quel type de cellules immunitaires peut être responsable de l'hyperprogression. Tout d'abord nos modèles ne miment que faiblement ce processus. Il faudrait augmenter considérablement le nombre de souris par cohorte pour espérer avoir un nombre suffisant de souris avec un profil hyperprogresseur. De plus, l'hypothèse qui est faite ici se focalise sur le rôle du système immunitaire. Chez les patients atteints de tumeurs qui hyperprogressent sous traitement, les cellules tumorales elles-mêmes peuvent en être la cause et non nécessairement le microenvironnement immunitaire. La thérapie peut, par exemple, sélectionner des clones non immunogènes qui se développeront malgré un système immunitaire anti-tumoral actif.

Cette question reste en suspens et mérite de nouvelles investigations. L'étude de phénomènes sur des modèles murins étant plus complexe que nous le pensions, nous nous sommes rapprochés du groupe d'étude hospitalier ImmuCare, qui a pour objet de constituer une cohorte de patients hyperprogresseurs afin d'investiguer ce point sur des échantillons appariés avant et après traitement de tumeurs.

## Chapitre VI. Discussion

L'étude des mécanismes de résistance liés aux thérapies est un domaine de recherche largement exploré. Il est pourtant instructif de comparer la rareté des données disponibles sur les mécanismes de résistance liés aux ICIs avec les données disponibles sur les mécanismes de résistance liés aux thérapies ciblées ainsi que les progrès associés à la prise en charge des patients. A titre d'exemple, dans le cancer du poumon détenant une mutation de type EGFR, traité classiquement avec un inhibiteur de tyrosine kinase, les mécanismes de résistance identifiés ont rapidement permis le développement de nouvelles thérapies efficaces<sup>475-477</sup>, à l'inverse des ICIs, bien qu'un nombre important de patients reçoit ce type de traitements. Un des éléments pouvant expliquer ce manque d'explication est le fait que les ICIs sont peu ou pas actifs en modèles cellulaires *in vitro*, nécessitant le recours à des modèles *in vivo* qui sont plus longs et complexes à mettre en œuvre.

Par ailleurs, la validation de la pertinence clinique des hypothèses générées dans les modèles précliniques est également complexe. Les problèmes majeurs que nous avons précédemment cités dans l'induction de nouvelles hypothèses mécanistiques sont : i) le manque d'homogénéité dans la terminologie, ii) le manque de disponibilité d'échantillons biologiques de patients et iii) le manque d'outils faisant le lien entre le patient, les cellules tumorales et le microenvironnement tumoral permettant d'étudier ces mécanismes<sup>439</sup>.

### **Une nouvelle alternative pour étudier les mécanismes de résistance acquise aux ICIs**

Notre approche, avec l'établissement de modèles *in vivo* résistants aux ICIs de manière secondaire, a permis de développer un outil liant les cellules tumorales et le microenvironnement tumoral, essentiel pour étudier ce type de résistance. L'utilisation de séquençage de nouvelle génération, pour analyser les résistances survenant à la suite d'un traitement de type thérapies ciblées, a permis d'identifier des gènes contrôlant la résistance. Cette technique utilisée pour les ICIs a, quant à elle, rencontré un succès limité. Ceci implique

que la résistance aux ICIs est plus dynamique et complexe, nécessitant une approche multifactorielle.

Nos modèles ont permis de répondre partiellement à cette problématique. La première difficulté a été de savoir comment reproduire une résistance acquise aux ICIs. Induire une résistance *in vitro* dans notre cas était impossible car cette thérapie n'est efficace qu'en présence du système immunitaire contrairement aux thérapies qui ciblent directement les cellules tumorales et peuvent donc être cultivées *in vitro* sous pression de sélection. Le choix des modèles à utiliser a également été débattu. La transposition chez l'Homme aurait été plus simple mais nous ne pouvions pas utiliser de lignée cellulaire tumorale humaine puisqu'un système immunitaire intact était indispensable. Bien évidemment, l'alternative d'utiliser des souris humanisées ne pouvait pas être viable économiquement pour le laboratoire. Nous nous sommes donc tournés vers l'utilisation de modèles syngéniques. S'agissant du développement d'immunothérapies, ces modèles ont permis d'établir de nouvelles preuves de concepts. Pour autant, des limites persistent. Notamment, l'expression d'antigènes non-humains ou les différences entre systèmes immunitaires humains et souris, engendrent un frein important dans la transposition des hypothèses générées chez la souris à l'Homme<sup>478</sup>.

Le maintien de ces modèles *in vivo* est un autre aspect important que notre recherche soulève. Le fait que notre technique implique l'implantation d'un fragment de 5 mm environ de tumeur prélevée sur une tumeur de 1600mm<sup>3</sup> induit nécessairement que l'hétérogénéité tumorale ne peut pas être représentative. L'étude par *single cells* de tous nos modèles pourrait nous permettre de bien identifier si un sous-clone prend le dessus à chaque nouvelle implantation et donc de mieux identifier quel mécanisme sous-jacent induit la résistance. Techniquement, lors de l'étude de combinaisons thérapeutiques, une tumeur résistante aux ICIs de 1600mm<sup>3</sup> est fragmentée en fonction du nombre de souris à implanter. Nous avons observé que certaines greffes provenant de la tumeur initialement résistante, redevenaient partiellement sensibles. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées. L'une d'entre elles laisse à penser que certains sous-clones, même s'ils peuvent être sensibles aux ICIs, sont protégés par les sous-clones résistants. Ainsi, lors de la division de la tumeur, si le fragment nouvellement implanté

à une dominance de sous-clones sensibles, ceux-ci pourront de nouveau être ciblés par le système immunitaire réactivé par les ICIs.

Une autre hypothèse voudrait que les mécanismes immunosuppresseurs compensatoires soient principalement contrôlés par des mécanismes épigénétiques hautement réversibles. Ceci laisse supposer qu'un arrêt de l'ICI, le temps de cicatrisation et de la pousse tumorale afin d'atteindre 150mm<sup>3</sup> suffisent pour que les mécanismes épigénétiques en place disparaissent.

Même si ce point peut paraître un frein ou un biais important dans nos analyses, il n'en reste pas moins que ces problématiques sont potentiellement à l'œuvre chez les patients atteints de cancers. En effet, lors des biopsies qui déterminent si un patient est en mesure de répondre aux ICIs, l'hétérogénéité tumorale peut ne pas être détectée de manière optimale. De ce fait, un patient peut ne pas répondre aux traitements bien que la biopsie prédise le contraire. De ce fait, il est finalement important de garder cette hétérogénéité dans nos modèles pour nous permettre de mimer au plus près ce qui se passe chez l'Homme. Ceci nous permet de prédire de façon plus représentative la future réponse probable qui surviendra chez l'Homme.

Une autre remarque est que nous utilisons des lignées cellulaires créées, par exemple pour MC38, en 1975. Près de 45 ans se sont donc écoulés depuis son apparition chez la souris. Pouvons-nous être certains que les mécanismes étudiés sur de tels modèles reflètent la réalité chez les personnes atteintes de cancers aujourd'hui ? La dérive des lignées cellulaires à force de passage *in vitro* ou encore l'hétérogénéité existante d'une lignée d'un laboratoire à l'autre est un fait et la recherche doit en tenir compte. Cependant, l'utilisation par la communauté scientifique de ces lignées vieillissantes pose question. Hypothétiquement, la logique voudrait que les lignées cellulaires tumorales syngéniques, si elles étaient recrées aujourd'hui, soient relativement identiques étant donné que la souche de souris est censée être stable à travers les années. Cependant, les lignées humaines, comme par exemple Raji dérivé d'un lymphome stabilisé dans les années 60, peuvent-elles être encore considérées comme représentatives ? Il serait par conséquent intéressant de sélectionner des lignées cellulaires nouvellement créées et de comparer si le microenvironnement immunitaire ou les voies activées sont

semblables aux anciennes lignées. Cette approche pourrait également permettre de mieux appréhender les mécanismes de résistance auxquels nous sommes confrontés aujourd’hui.

Il n’en reste pas moins que l’outil que nous avons développé est, à notre connaissance, unique.

Il doit maintenant démontrer sa puissance prédictive chez l’Homme.

### A chaque modèle sa particularité

Il est important de noter que nous avons utilisé différents sous-types tumoraux. L’utilisation de modèles syngéniques extrêmement différents entre eux constitue une des plus-values de notre étude et permettent de générer de nouvelles hypothèses. Par conséquent, les mécanismes liés à chaque sous-type peuvent finalement être complètement différents. Dans le tableau ci-dessous, nous avons succinctement récapitulé les différences que ce soit au niveau du temps de prise des tumeurs qu’au niveau de la composition de la tumeur elle-même. Cela démontre bien que chaque modèle, du fait de ses particularités, ne peut pas être utilisé pour répondre à la même question. Pour la combinaison de traitements par exemple le modèle MC38 a une fenêtre thérapeutique très étroite contrairement au modèle TyrNras (Figure 48).

Modèles	Temps de prise pour atteindre 150mm <sup>3</sup>	Point limite atteint	Évolution tumorale	Souche	Population immunitaire prédominante	Nombre de gènes différentiellement exprimé par rapport au modèle sensible (RNAseq)
MC38 Colorectal	7 jours	Courte (15 jours)	Atteint le volume hors éthique	C57Bl/6	Cellules NK	FORT
MB49 Vessie	10 jours	Courte (15 jours)	Modèle nécrotique	C57Bl/6	Lymphocytes B CD11b+	FAIBLE
MBT2 Vessie	10 jours	Moyenne (20 Jours)	Atteint le volume hors éthique	C3H	PMN-MDSC	MEDIUM
TyrNras Mélanome	20 jours	Longue (40 jours)	Atteint le volume hors éthique	C57Bl/6	Lymphocytes Tcm CD8+	FORT
RENCA Rein	20 jours	Variable (15-30 jours)	Modèle nécrotique	BALB/C	TAM CD206+MHC II+	MEDIUM

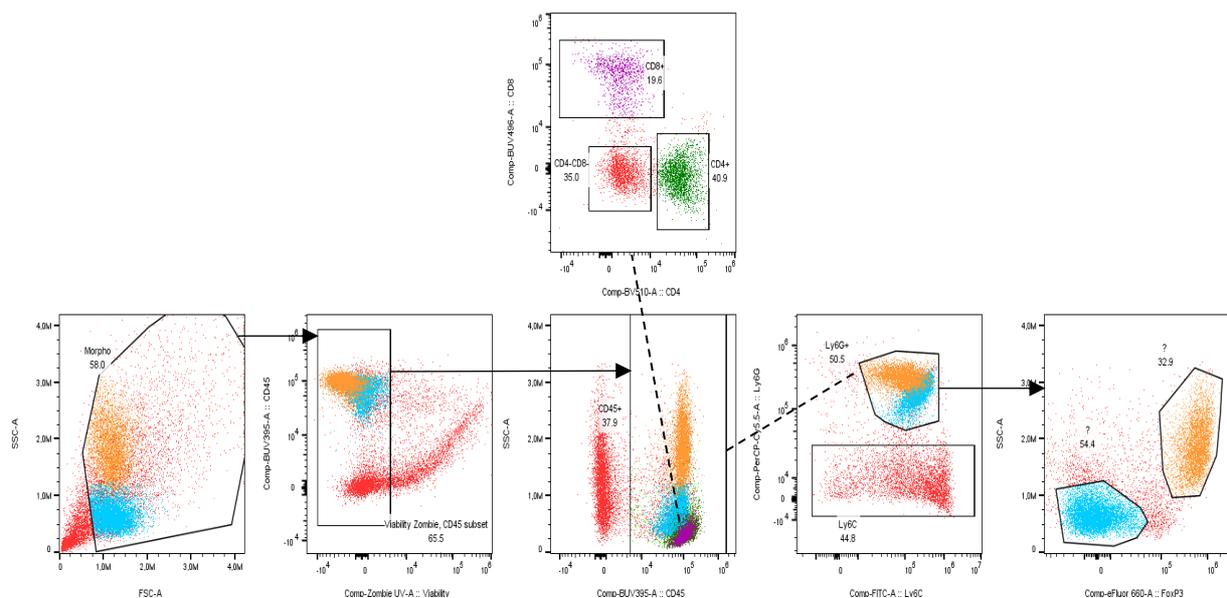
**Figure 48. Différences sommaires entre les modèles tumoraux syngéniques WT utilisés.**

Nos modèles ont aussi l'avantage de prendre en compte la complexité qui existe dans une tumeur ayant acquis une résistance aux ICIs, à l'inverse des lignées cellulaires génétiquement modifiées qui interrogeront une fonction particulière comme nous l'avons fait pour le gène *SERPINF1*. La problématique est de savoir comment transposer les observations précliniques à l'Homme. Un modèle de mélanome syngénique doit-il forcément être mis en parallèle avec un mélanome humain ou des mécanismes peuvent-ils se recouper avec d'autres types de cancers ? Nous savons que certains mécanismes sont communs à plusieurs types de cancers. Cependant, l'approche voulant déterminer un processus unique occulte souvent les différences entre les sous-types de cancers. Le fait donc d'avoir différents types de cancers nous permet de répondre à cette question. Par exemple, pour le gène *SERPINF1*, nous avons pu montrer qu'une sous-expression dans les modèles MC38 et MBT2 de ce gène permettait d'avoir une réponse complète ou partielle à l'anti-PD-1, respectivement. Ce résultat nous pousse donc à croire que ce gène peut être lié à un mécanisme de résistance à l'anti-PD-1 dans différents types de cancers chez l'Homme.

### **Nouvelle technologie d'immunophénotypage, perspective de découvrir de nouvelles populations immunitaires**

J'ai eu la chance, pendant ma thèse, de pouvoir utiliser une nouvelle technologie d'immunophénotypage : celle-ci s'appuie sur des signatures spectrales permettant ainsi de combiner un nombre important de fluorochromes différents qui, avant cette approche, ne pouvaient être regroupés (par exemple possibilité de combiner BB515 et FITC). Si au début de ma thèse, la question d'utiliser des technologies comme la cytométrie de masse s'est posée pour notre laboratoire, l'alternative du spectral s'est rapidement imposée comme une évidence. Nous avons donc choisi de développer un panel permettant de mettre en évidence différents sous-types de cellules immunitaires. Cette approche s'est voulue globale et non pas focalisée sur un sous-type immunitaire. En effet, notre postulat de départ a été qu'un bon nombre de publications étudiaient de manière approfondie les cellules T, alors que très peu d'entre elles s'intéressaient à l'implication des autres sous-types immunitaires

dans la résistance aux ICIs. Nous avons décidé, plutôt que de regarder en profondeur un sous-type immunitaire, d'étudier l'ensemble. Lors de l'utilisation de ce panel, nous avons été confrontés à de nombreuses problématiques. Tout d'abord l'expression des marqueurs non classiques sur les différentes populations immunitaires n'est que très peu documentée. Ceci nous a donc freiné dans la caractérisation des sous-ensembles immunitaires et nous sommes donc restés sur une division classique. En effet, du fait de la technologie employée, comme la cytométrie classique qui nécessite deux panels distincts pour étudier par exemple le coté myéloïde et le coté lymphoïde, beaucoup de marqueurs n'ont, de ce fait, pas nécessairement été étudiés pour d'autres sous-types cellulaires. Par exemple, les populations neutrophiles *versus* PMN-MDSC au sein d'une tumeur ne peuvent à ce jour être différenciées. Avec ce panel, nous avons pu remarquer au sein de la population Ly6G+Ly6C+ une subdivision non documentée à l'aide du marqueur FoxP3 (Figure 49).



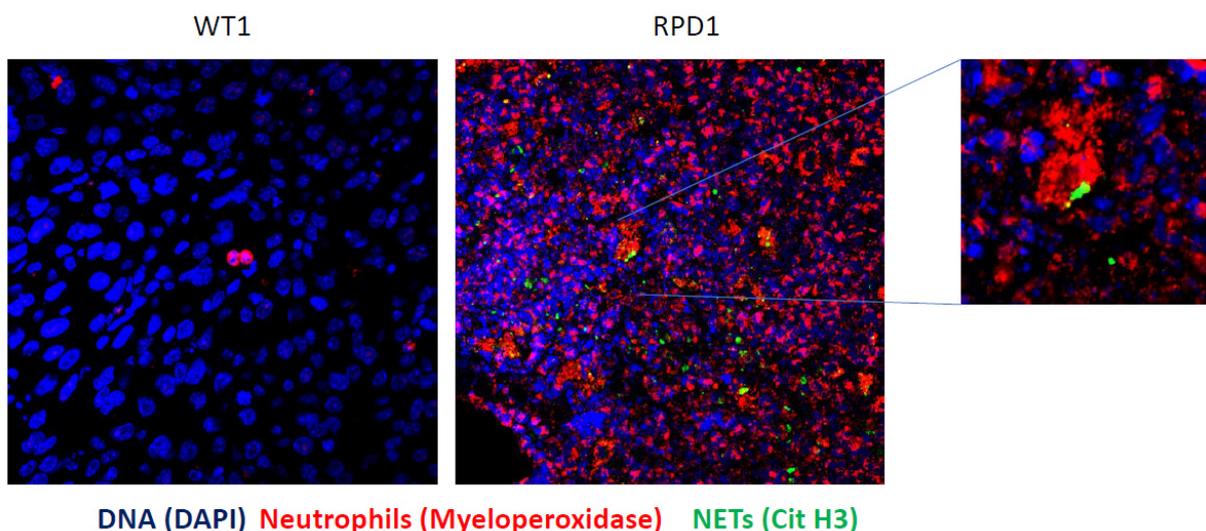
**Figure 49. Stratégie de fenêtrage représentatif d'un échantillon de tumeur MB49 WT.** Discrimination des cellules vivantes et des débris, puis séparation des cellules immunitaires, des cellules tumorales grâce au marqueur CD45. Ensuite, discrimination des granulocytes *via* Ly6G. Finalement, discrimination des granulocytes en deux populations en fonction de leur granulocytée cellulaire et de FoxP3.

En effet, dans le modèle MB49, dans lequel une infiltration massive de PMN-MDSC était présente, ce marqueur permettait de distinguer deux populations Ly6C<sup>med</sup>Ly6G<sup>hi</sup>. FoxP3 est

connu pour être un marqueur des Tregs. Il y a peu de littérature sur l'expression de FoxP3 par d'autres populations immunitaires. Cependant un débat existe sur la possibilité que FoxP3 puisse être exprimé par d'autres types cellulaires. Une équipe a par exemple proposé que les TAM M2-like pouvaient exprimer ce marqueur<sup>479,480</sup>. Dans de futures expériences, il serait intéressant de vérifier si le rôle immunosuppresseur des PMN-MDSCs corrèle avec l'expression de FoxP3. Si cela est avéré, nous aurions un outil simple à notre disposition pour discriminer les neutrophiles pathologiques.

De manière plus globale, documenter l'expression des marqueurs sur différentes lignées cellulaires de souris afin de mieux caractériser par la suite le lien fonctionnel pourrait permettre de mieux discriminer les populations immunitaires. Ce travail permettrait certainement de mieux comprendre et prévoir pourquoi certaines combinaisons de traitements par exemple ne fonctionnent pas, ou encore de faire un lien avec des mécanismes comme l'hyperprogression.

Ce panel nous a également permis d'identifier plusieurs populations immunitaires potentiellement impliquées dans les mécanismes de résistance acquise. Entre autres, les PMN-MDSCs dans le modèle MC38 semble jouer un rôle. Ce modèle est connu pour ne pas être infiltré par des neutrophiles<sup>481</sup>. Dans nos modèles résistants, une infiltration massive prend place (Figure 50).



**Figure 50. Image représentative de l'infiltration de neutrophiles et de NETs, dans des tumeurs MC38 WT et des tumeurs MC38 résistantes à l'anti-PD-1.** En bleu, coloration des noyaux *via* le DAPI (1/500, Abcam), en rouge coloration des neutrophiles *via* l'anti-myeloperoxydase (1/100, AF3667, Abcam) ; et en vert coloration des NETs *via* l'anti-CitH3 (dilution 1/250, ab5103, Abcam).

En collaboration avec Jean Albregues (CIRCAN, Nice) nous avons donc en parallèle investigué si les NETs pouvaient jouer un rôle. Il s'est avéré que, malgré la détection de ceux-ci sur des coupes IHC, la combinaison d'un traitement ciblant les NETs n'a eu aucun effet probant à l'inverse du traitement anti-Ly6G. Le mécanisme par lequel les PMN-MDSCs supportent la résistance reste donc à définir dans le modèle MC38.

Tout ceci démontre bien qu'il serait une erreur de penser qu'un mécanisme unique puisse soutenir la résistance acquise aux ICIs. Il s'agit nécessairement de processus multifactoriels extrêmement complexes.

### **Lien entre cellules tumorales et cellules immunitaires**

Comprendre le fonctionnement d'un mécanisme biologique nécessite très souvent de sortir de son domaine de prédilection. Le mécanisme de résistance que nous avons identifié implique un gène multifactoriel. L'une de ses fonctions engendre la production d'acide gras. Lier cela à nos observations d'immunophénotypage n'a pas été évident. Cependant, les lymphocytes T CD8+ ont été majoritairement affectés par la modulation de la *SERPINF1*. De ce fait, nous nous sommes focalisés sur l'étude des cellules T CD8+. Cependant, la difficulté de ce travail réside essentiellement dans le postulat de départ. Etudions-nous des lymphocytes T CD8 provenant du morceau de tumeur implanté ou des lymphocytes T CD8 infiltrant nouvellement la tumeur provenant de la souris naïve. Il serait logique de penser que le premier cas de figure n'est certainement pas viable. Il impliquerait un auto-renouvellement durable et une présence dominante des lymphocytes T CD8 des précédentes souris dans le morceau de tumeur implanté. Si le deuxième cas de figure est plus probable, il laisse donc penser que malgré la thérapie, les lymphocytes T CD8 infiltrant nouvellement les tumeurs n'arrivent pas à changer de phénotype pour être activés. Dans notre cas, il apparaît que le

temps de stimulation par les antigènes tumoraux du TCR n'est pas suffisant pour expliquer un état non-fonctionnel des lymphocytes T CD8. La plupart des lymphocytes T CD8 infiltrant les tumeurs dans nos modèles ont un phénotype de type mémoire soit central, soit effecteur. Comme expliqué précédemment, ces cellules ont la capacité d'être réactivées. Dans le modèle MC38, l'hypothèse que nous avançons permettrait d'expliquer en partie pourquoi, malgré la présence de l'anti-PD-1, ces lymphocytes ont un phénotype de type mémoire et ne peuvent à priori être réactivés pour détruire les cellules cancéreuses. Cette hypothèse implique un *shift* métabolique des TILs qui, une fois dans le microenvironnement tumoral, seraient finalement bloqués dans cet état. Un argument fort qui appuie cette hypothèse est l'efficacité de la combinaison orlistat et anti-PD-1 qui a montré une réversion de la résistance dans le modèle MC38 aPD-1-R. La prochaine étude s'intéressera de savoir si la combinaison orlistat et anti-PD-1, permet aux lymphocytes T CD8+ d'être réactivés. Aussi, l'analyse des données de séquençage sur cellules uniques devrait nous permettre de mieux déterminer quelles cellules immunitaires supportent la résistance.

Dans le domaine de la cancérologie, la composante métabolique ouvre de nombreuses nouvelles portes. Dans un futur projet, il serait intéressant de tester d'autres médicaments bloquant la synthèse des lipides à différents endroits de la cascade d'activation afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents. Il a récemment été démontré que l'adaptation métabolique médiée par CD36 soutiennait la survie et la fonction des cellules Tregs dans les tumeurs. Les auteurs ont montré que CD36 pouvait être une futur cible thérapeutique prometteuse avec des effets indésirables probablement moins importants qu'une autre thérapie déplaçant les cellules Tregs. En effet, ils ont observé que CD36 est surexprimé uniquement par les cellules Tregs intra-tumorales<sup>319</sup>.

### **L'identification de nouvelles voies génétiques impliquées, espoir d'une meilleure compréhension des mécanismes de résistance aux ICIs**

Ces travaux nous ont permis de démontrer que de nouvelles voies mécanistiques pouvaient être identifiées. Le RNAseq, que nous avons réalisé sur tous nos modèles, nous a permis

d'identifier des voies de signalisation différentiellement sur ou sous-exprimées en comparaison avec leur modèle WT. De cette analyse nous avons identifié plusieurs voies déjà décrites dans la littérature comme ayant un impact sur la résistance induite des ICIs, à savoir la voie JAK, IFN $\gamma$  ou encore PTEN. Toutes les études qui ont à ce jour identifié des voies mécanistiques impliquent essentiellement la voie IFN $\gamma$  et les voies permettant la présentation d'antigène. Il est effectivement peu probable qu'aucune autre voie ne soit impliquée. Comme nous l'avons signalé, le manque de disponibilité d'échantillons humains explique en partie pourquoi peu de voies ont été jusqu'alors identifiées.

Il n'en reste pas moins que nous démontrons ici qu'une nouvelle alternative, prometteuse et peu coûteuse, existe pour étudier des différences d'expression génétiques. Dans de futures études, il serait intéressant de mettre à l'épreuve les voies que nous avons détectées comme sur ou sous-exprimées afin de déterminer si elles sont impliquées. Cela permettrait d'ouvrir le champ des possibles sur beaucoup d'autres alternatives thérapeutiques. A titre d'exemple, la voie RhoGDI est sous-exprimée dans nos modèles résistants. Si l'on regarde en détail, 3 modèles ont également une surexpression de la voie Rho. Cette donnée peut très bien être corrélée avec une activité tumorale accrue. En effet, la voie de SUMOylation est également sous-exprimée ce qui corrèle bien avec le fait que lorsque RhoGDI était sumoylé sur la Lys138, la liaison à RhoGTPase était augmentée. Ceci entraînait une inhibition de la mobilité dans la cellule cancéreuse et donc une diminution de son potentiel métastatique<sup>482</sup>. Dans la famille des RhoGTPase, Cdc42, Rac et RhoA ont été très étudiés. Par exemple la mutation Rac1<sup>p29S</sup> présente chez des patients atteints de mélanome est associée à une expression accrue de PD-L1<sup>483</sup>. De plus, Cdc42 est impliqué dans l'inhibition de l'apoptose induite par les CTL au travers de la signalisation MAPK<sup>484</sup>. D'autres études ont montré que PAK4 (effecteurs de la voie RhoGTPase) inhibe la dégradation de la  $\beta$ -caténine et maintient son activité en la phosphorylant<sup>485,486</sup>. Comme expliqué précédemment, la  $\beta$ -caténine a été liée à un mécanisme de résistance aux thérapies de type ICIs car elle permet d'inhiber le recrutement des lymphocytes T CD8<sup>430</sup>. Ces différentes données illustrent simplement que beaucoup de liens mécanistiques doivent encore être établis. L'identification de nouvelles voies impliquées dans des mécanismes de résistance sous-jacents aux ICIs, comme RhoGDI permettront

certainement de mieux comprendre les tenants et aboutissants ainsi que de proposer des combinaisons thérapeutiques efficaces.

Nous avons également identifié 11 gènes différentiellement exprimés dans au moins 5 modèles (dont 2 appariés) avec un focus spécifique sur la *SERPINF1*. La compréhension de la relation entre *SERPINF1*, lipides et lymphocytes T CD8+ doit être approfondie. Il serait notamment intéressant d'étudier ce gène dans les autres modèles afin de déterminer si le mécanisme est spécifique du modèle colorectal ou commun à plusieurs modèles. Nous avons testé cela pour le modèle MBT2 qui possède une résistance innée à l'anti-PD-1. Nos résultats ont montré une modulation de la réponse lorsque la *SERPINF1* est inactive. En effet, d'une résistance innée à l'anti-PD-1, le modèle MBT2 variant avec une suppression de l'expression de *SERPINF1* est devenu partiellement sensible à l'immunothérapie. Par conséquent, ce résultat pose une autre question : s'agit-il d'un mécanisme commun aux deux types de résistance, primaire et acquise ? Ceci ne serait pas étonnant, la plupart des mécanismes de résistance mis en place par la tumeur à un instant t chez un patient peuvent prendre place plus tardivement chez un autre patient, par l'émergence de clones résistants sélectionnés sous l'effet de l'exposition au traitement<sup>435,487</sup>. Il serait intéressant de répondre à cette question qui permettra de mieux comprendre comment ce mécanisme émerge.

Cependant 10 autres gènes candidats ressortent de notre analyse. Certains d'entre eux semblent être de très bons candidats pour révéler d'autres mécanismes de résistance impliqués. Entre autres, *Itgbl1* (Integrin Subunit Beta Like 1) a récemment été identifié comme régulé à la hausse chez des patients résistants à l'anti-PD-1. Il a été décrit comme un nouvel immunomodulateur favorisant le développement tumoral en inhibant l'activité des cellules NKs<sup>488,489</sup>. Il faudrait donc dans un premier temps confirmer leur sur ou sous-expression dans les modèles associés. Il serait ensuite intéressant dans de futures études de vérifier leur implication fonctionnelle comme la *SERPINF1* à l'aide de modification génétique dans les lignées parentales.

## **Une nouvelle alternative pour étudier les combinaisons de traitement afin de contourner la résistance acquise aux ICIs**

Dans ce travail de thèse, nous avons montré qu'un rationnel fort existe entre l'identification de cellules immunitaires à dominante immunosuppressive, l'identification de nouvelles voies génétiques sur ou sous-exprimées, leurs blocages et la réversion de résistance aux ICIs.

Nos modèles semblent donc posséder un pouvoir de prédiction quant à l'efficacité d'une future combinaison de traitement. Cependant, les combinaisons de traitement ne sont, elles aussi, efficaces que pour un temps, laissant de nouveau la tumeur s'adapter à la nouvelle combinaison thérapeutique. En effet, la plupart de nos combinaisons n'ont pas permis d'atteindre une rémission complète chez la souris ; le parallèle peut également être fait chez l'Homme. Il serait intéressant d'utiliser nos modèles afin de mieux comprendre le *timing* d'apparition des mécanismes de résistance. Un traitement intermittent pourrait, par exemple, soutenir des réponses à long terme et ainsi éviter ou retarder l'apparition de résistance. Une étude clinique a par exemple montré que certains patients en rechute pouvaient répondre *de novo* à l'ICI d'origine<sup>490</sup>. Ceci révèle qu'un arrêt peut permettre de retrouver une sensibilité au traitement. L'identification du moment précis où ce *shift* s'opère permettrait de mieux identifier les mécanismes de résistance mis en place. Il n'est pas non plus à exclure que ces mécanismes de résistance évoluent au cours du temps et qu'un processus soit dominant au début puis laisse la place à un autre mécanisme à un temps plus tardif. Il faut en effet, jamais ne perdre de vue que la tumeur est extrêmement dynamique.

Nous avons également réalisé une étude portant sur les différences engendrées dans le microenvironnement immunitaire tumoral, en termes de lieux d'implantation – sous-cutanée *versus* orthotopique. Il serait logique qu'un modèle, qui prend place dans son lieu de prédilection, puisse diminuer un certain nombre de biais permettant de faire un parallèle avec l'Homme plus pertinent. Cependant, cela reste à déterminer. Il serait intéressant de poursuivre avec ce modèle en testant des combinaisons de traitement. L'idée ensuite serait de pouvoir déterminer quelles combinaisons, établies à l'aide du modèle sous-cutané ou

orthotopique, apportent un réel bénéfice chez l'Homme. Cette étude pourrait à l'avenir orienter plus efficacement le choix du modèle d'étude afin d'améliorer, encore une fois, les hypothèses générées dans des modèles animaux.

## Conclusion

Les ICIs ont été la révolution thérapeutique que nous attendions depuis longtemps. Malgré des premiers résultats impressionnants chez des patients atteints de mélanomes métastasés, beaucoup ne parviennent pas à bénéficier d'une réponse à long terme. Pour étudier ces mécanismes de résistance, peu d'outil sont à la disposition des chercheurs. Dans cette optique, nous avons créé des modèles *in vivo* avec une résistance acquise aux ICIs. Ces modèles nous ont permis, à la suite de leur caractérisation par deux techniques (immunophénotypages et RNAseq), de déterminer des combinaisons thérapeutiques pour contrecarrer la résistance. Ces travaux pourront permettre d'orienter des essais cliniques afin de restaurer une réponse immunitaire chez des patients qui ne peuvent plus accéder à des alternatives thérapeutiques. Cela nous a également conduit à identifier un mécanisme probable de résistance à l'anti-PD-1, à savoir une surexpression du gène *SERPINF1* qui enclencherait la surproduction d'acides gras, favorisant un microenvironnement riche en lipides qui *de facto* entraînerait un *shift* des lymphocytes T cytotoxiques en lymphocytes inactifs. Cette étude doit maintenant être validée chez l'Homme. L'implication de ce gène, si elle est avérée, pourra servir dans un premier temps de biomarqueur à une future résistance acquise. Dans un second temps, si le processus par lequel ce mécanisme se met en place est démontré chez l'Homme, il ouvrira le champ des possibles à des alternatives thérapeutiques importantes.

## Bibliographie

1. Les causes médicales de décès en France en 2004 et leur évolution 1980-2004 | Request PDF.  
*ResearchGate*  
[https://www.researchgate.net/publication/284699639\\_Les\\_causes\\_medicales\\_de\\_deces\\_en\\_France\\_en\\_2004\\_et\\_leur\\_evolution\\_1980-2004](https://www.researchgate.net/publication/284699639_Les_causes_medicales_de_deces_en_France_en_2004_et_leur_evolution_1980-2004).
2. Rapport - Volume 1 - Tumeurs solides - Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - juillet 2019 - Ref : RATSINC NAT19.  
<https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Rapport-Volume-1-Tumeurs-solides-Estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-metropolitaine-entre-1990-et-2018-juillet-2019>.
3. Les cancers en France en 2018 - L'essentiel des faits et chiffres (édition 2019) - Ref : ETKAFR19.  
<https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Les-cancers-en-France-en-2018-L-essentiel-des-faits-et-chiffres-edition-2019>.
4. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
6. Citrin, D. E. Recent Developments in Radiotherapy. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1065–1075 (2017).
7. » Cancérologie. Les nouveaux champs de la recherche. [https://popsciences.universite-lyon.fr/le\\_mag/cancerologie-les-nouveaux-champs-de-la-recherche/](https://popsciences.universite-lyon.fr/le_mag/cancerologie-les-nouveaux-champs-de-la-recherche/).
8. Group (EBCTCG), E. B. C. T. C. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *The Lancet* **378**, 771–784 (2011).

9. Thérapies ciblées : modes d'action - Thérapies ciblées et immunothérapie spécifique.  
<https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements/Therapies-ciblees-et-immunotherapie-specifique/Therapies-ciblees-modes-d-action>.
10. Bilancia, D. *et al.* Lapatinib in breast cancer. *Ann. Oncol.* **18**, vi26–vi30 (2007).
11. Dungo, R. T. & Keating, G. M. Afatinib: First Global Approval. *Drugs* **73**, 1503–1515 (2013).
12. Houghton, P. J. Everolimus. *Clin. Cancer Res.* **16**, 1368–1372 (2010).
13. Finn, R. S. *et al.* Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1925–1936 (2016).
14. Doré, J., Brun, M.-P. & Cossy, J. Petites et grosses molécules dans le traitement des cancers. in *Petites et grosses molécules dans le traitement des cancers* 107–124 (EDP Sciences, 2021).  
doi:10.1051/978-2-7598-2478-6-008.
15. Lonberg, N. Human antibodies from transgenic animals. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1117–1125 (2005).
16. Sears, H. F. *et al.* Phase-I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumours. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 762–765 (1982).
17. Catapano, A. L. & Papadopoulos, N. The safety of therapeutic monoclonal antibodies: Implications for cardiovascular disease and targeting the PCSK9 pathway. *Atherosclerosis* **228**, 18–28 (2013).
18. Mohammed, R., Milne, A., Kayani, K. & Ojha, U. How the discovery of rituximab impacted the treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J. Blood Med.* **10**, 71–84 (2019).
19. Krop, I. E. *et al.* Phase I study of trastuzumab-DM1, an HER2 antibody-drug conjugate, given every 3 weeks to patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 2698–2704 (2010).

20. Beck, A., Dumontet, C. & Joubert, N. Les immuno-conjugués en oncologie - Les raisons du succès récent d'une approche ancienne. *médecine/sciences* **35**, 1034–1042 (2019).
21. Lu, R.-M. *et al.* Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J. Biomed. Sci.* **27**, 1 (2020).
22. Foltz, I. N., Karow, M. & Wasserman, S. M. Evolution and Emergence of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Circulation* **127**, 2222–2230 (2013).
23. Robert, C. *et al.* Long-term outcomes in patients (pts) with ipilimumab (ipi)-naive advanced melanoma in the phase 3 KEYNOTE-006 study who completed pembrolizumab (pembro) treatment. *J. Clin. Oncol.* **35**, 9504–9504 (2017).
24. Négrier, S. *et al.* Randomized study of intravenous versus subcutaneous interleukin-2, and IFNalpha in patients with good prognosis metastatic renal cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 5907–5912 (2008).
25. Dhupkar, P. & Gordon, N. Interleukin-2: Old and New Approaches to Enhance Immune-Therapeutic Efficacy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **995**, 33–51 (2017).
26. Hodi, F. S. *et al.* Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4712–4717 (2003).
27. Hodi, F. S. *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**, 711–723 (2010).
28. Robert, C. *et al.* Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2517–2526 (2011).
29. Brahmer, J. R. *et al.* Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 3167–3175 (2010).

30. Koyama, S. *et al.* Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat. Commun.* **7**, 1–9 (2016).
31. Zhang, J., Li, Y., Yang, S., Zhang, L. & Wang, W. Anti-CD40 mAb enhanced efficacy of anti-PD1 against osteosarcoma. *J. Bone Oncol.* **17**, (2019).
32. Qin, S. *et al.* Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Mol. Cancer* **18**, (2019).
33. Bonnefoy, N., Olive, D. & Vanhove, B. Les futures générations d'anticorps modulateurs des points de contrôle de la réponse immunitaire. *médecine/sciences* **35**, 966–974 (2019).
34. Bargou, R. *et al.* Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* **321**, 974–977 (2008).
35. Linke, R., Klein, A. & Seimetz, D. Catumaxomab. *mAbs* **2**, 129–136 (2010).
36. Topp, M. S. *et al.* Phase II trial of the anti-CD19 bispecific T cell-engager blinatumomab shows hematologic and molecular remissions in patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 4134–4140 (2014).
37. Meeting Library | Confirmatory open-label, single-arm, multicenter phase 2 study of the BiTE antibody blinatumomab in patients (pts) with relapsed/refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia (r/r ALL). <https://meetinglibrary.asco.org/record/93809/abstract>.
38. Rosenberg, S. A., Spiess, P. & Lafreniere, R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* **233**, 1318–1321 (1986).
39. Spiess, P. J., Yang, J. C. & Rosenberg, S. A. In vivo antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes expanded in recombinant interleukin-2. *J. Natl. Cancer Inst.* **79**, 1067–1075 (1987).
40. Lauss, M. *et al.* Mutational and putative neoantigen load predict clinical benefit of adoptive T cell therapy in melanoma. *Nat. Commun.* **8**, 1738 (2017).

41. Radvanyi, L. G. Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy: Addressing Prevailing Questions. *Cancer J. Sudbury Mass* **21**, 450–464 (2015).
42. Morgan, R. A. *et al.* Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* **314**, 126–129 (2006).
43. Butler, M. O. *et al.* Establishment of antitumor memory in humans using in vitro-educated CD8+ T cells. *Sci. Transl. Med.* **3**, 80ra34 (2011).
44. Kochenderfer, J. N. *et al.* Chemotherapy-Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Indolent B-Cell Malignancies Can Be Effectively Treated With Autologous T Cells Expressing an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor. *J. Clin. Oncol.* **33**, 540–549 (2015).
45. Neelapu, S. S. *et al.* Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2531–2544 (2017).
46. Lawson, D. A., Kessenbrock, K., Davis, R. T., Pervolarakis, N. & Werb, Z. Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution. *Nat. Cell Biol.* **20**, 1349–1360 (2018).
47. Update, C.-19. *Janeway's Immunobiology ( 8th Edition )*. (2020).
48. Netea, M. G. *et al.* Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* **352**, (2016).
49. Netea, M. G. *et al.* Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 375–388 (2020).
50. Arend, W. P., Palmer, G. & Gabay, C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol. Rev.* **223**, 20–38 (2008).
51. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656–661 (2010).
52. Bekeredjian-Ding, I. B. *et al.* Plasmacytoid Dendritic Cells Control TLR7 Sensitivity of Naive B Cells via Type I IFN. *J. Immunol.* **174**, 4043–4050 (2005).

53. Collin, M. & Bigley, V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* **154**, 3–20 (2018).
54. Scarlett, U. K. *et al.* Ovarian cancer progression is controlled by phenotypic changes in dendritic cells. *J. Exp. Med.* **209**, 495–506 (2012).
55. Ferris, S. T. *et al.* cDC1 prime and are licensed by CD4<sup>+</sup> T cells to induce anti-tumour immunity. *Nature* **584**, 624–629 (2020).
56. Prokopi, A. *et al.* Skin dendritic cells in melanoma are key for successful checkpoint blockade therapy. *J. Immunother. Cancer* **9**, e000832 (2021).
57. Wenzel, J. *et al.* Type I interferon-associated recruitment of cytotoxic lymphocytes: a common mechanism in regressive melanocytic lesions. *Am. J. Clin. Pathol.* **124**, 37–48 (2005).
58. Reizis, B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity* **50**, 37–50 (2019).
59. Sisirak, V. *et al.* Impaired IFN- $\alpha$  Production by Plasmacytoid Dendritic Cells Favors Regulatory T-cell Expansion That May Contribute to Breast Cancer Progression. *Cancer Res.* **72**, 5188–5197 (2012).
60. Conrad, C. *et al.* Plasmacytoid Dendritic Cells Promote Immunosuppression in Ovarian Cancer via ICOS Costimulation of Foxp3<sup>+</sup> T-Regulatory Cells. *Cancer Res.* **72**, 5240–5249 (2012).
61. Segura, E. *et al.* Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity* **38**, 336–348 (2013).
62. Nakano, H. *et al.* Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat. Immunol.* **10**, 394–402 (2009).
63. Ruffell, B. *et al.* Macrophage IL-10 blocks CD8<sup>+</sup> T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell* **26**, 623–637 (2014).

64. Lucarini, V. *et al.* Dendritic Cells: Behind the Scenes of T-Cell Infiltration into the Tumor Microenvironment. *Cancers* **13**, 433 (2021).
65. Qian, B.-Z. & Pollard, J. W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell* **141**, 39–51 (2010).
66. Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* **176**, 287–292 (1992).
67. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164**, 6166–6173 (2000).
68. Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* **11**, 889–896 (2010).
69. Ginhoux, F. *et al.* Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* **330**, 841–845 (2010).
70. Gautier, E. L. *et al.* Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* **13**, 1118–1128 (2012).
71. Hoeffel, G. *et al.* Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.* **209**, 1167–1181 (2012).
72. Laviron, M. & Boissonnas, A. Ontogeny of Tumor-Associated Macrophages. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
73. Ries, C. H. *et al.* Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer Cell* **25**, 846–859 (2014).

74. Cai, H., Zhang, Y., Wang, J. & Gu, J. Defects in Macrophage Reprogramming in Cancer Therapy: The Negative Impact of PD-L1/PD-1. *Front. Immunol.* **12**, 2381 (2021).
75. Chen, Y. *et al.* Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *J. Biomed. Sci.* **26**, 78 (2019).
76. Movahedi, K. *et al.* Different Tumor Microenvironments Contain Functionally Distinct Subsets of Macrophages Derived from Ly6C(high) Monocytes. *Cancer Res.* **70**, 5728–5739 (2010).
77. Overmeire, E. V. *et al.* M-CSF and GM-CSF Receptor Signaling Differentially Regulate Monocyte Maturation and Macrophage Polarization in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* **76**, 35–42 (2016).
78. Wu, K. *et al.* Redefining Tumor-Associated Macrophage Subpopulations and Functions in the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **0**, (2020).
79. Noy, R. & Pollard, J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* **41**, 49–61 (2014).
80. Anfray, C., Ummarino, A., Andón, F. T. & Allavena, P. Current Strategies to Target Tumor-Associated-Macrophages to Improve Anti-Tumor Immune Responses. *Cells* **9**, 46 (2020).
81. Mazet, J. & Michallet, M.-C. Le neutrophile : un agent infiltré aux nouvelles compétences antitumorales. *médecine/sciences* **33**, 744–747 (2017).
82. Powell, D. R. & Huttenlocher, A. Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol.* **37**, 41–52 (2016).
83. Shen, M. *et al.* Tumor-Associated Neutrophils as a New Prognostic Factor in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* **9**, (2014).
84. Bekes, E. M. *et al.* Tumor-Recruited Neutrophils and Neutrophil TIMP-Free MMP-9 Regulate Coordinately the Levels of Tumor Angiogenesis and Efficiency of Malignant Cell Intravasation. *Am. J. Pathol.* **179**, 1455–1470 (2011).

85. Eruslanov, E. B. *et al.* Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *J. Clin. Invest.* **124**, 5466–5480 (2014).
86. Takashima, A. & Yao, Y. Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 489–496 (2015).
87. Yamauchi, Y. *et al.* Circulating and Tumor Myeloid-derived Suppressor Cells in Resectable Non–Small Cell Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **198**, 777–787 (2018).
88. Blattner, C. *et al.* CCR5+ Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Enriched and Activated in Melanoma Lesions. *Cancer Res.* **78**, 157–167 (2018).
89. Kaplan, M. J. & Radic, M. Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 2689–2695 (2012).
90. Tohme, S. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer Res.* **76**, 1367–1380 (2016).
91. Albrengues, J. *et al.* Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science* **361**, eaao4227 (2018).
92. Shaul, M. E. & Fridlender, Z. G. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **16**, 601–620 (2019).
93. Kalafati, L., Mitroulis, I., Verginis, P., Chavakis, T. & Kourtzelis, I. Neutrophils as Orchestrators in Tumor Development and Metastasis Formation. *Front. Oncol.* **0**, (2020).
94. Pretlow, T. P. *et al.* Eosinophil Infiltration of Human Colonic Carcinomas as a Prognostic Indicator. *Cancer Res.* **43**, 2997–3000 (1983).
95. Ishibashi, S. *et al.* Tumor-associated Tissue Eosinophilia in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res.* **26**, 1419–1424 (2006).

96. Luna-Moré, S., Florez, P., Ayala, A., Diaz, F. & Santos, A. Neutral and Acid Mucins and Eosinophil and Argyrophil Crystalloids in Carcinoma and Atypical Adenomatous Hyperplasia of the Prostate. *Pathol. - Res. Pract.* **193**, 291–298 (1997).
97. Fujii, M., Yamashita, T., Ishiguro, R., Tashiro, M. & Kameyama, K. Significance of epidermal growth factor receptor and tumor associated tissue eosinophilia in the prognosis of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Auris. Nasus. Larynx* **29**, 175–181 (2002).
98. Caruso, R. A. *et al.* Ultrastructural Descriptions of Heterotypic Aggregation between Eosinophils and Tumor Cells in Human Gastric Carcinomas. *Ultrastruct. Pathol.* **35**, 145–149 (2011).
99. Cormier, S. A. *et al.* Pivotal Advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 1131–1139 (2006).
100. Davis, B. P. & Rothenberg, M. E. Eosinophils and Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 1–8 (2014).
101. Seder, R. A. *et al.* Mouse splenic and bone marrow cell populations that express high-affinity Fc epsilon receptors and produce interleukin 4 are highly enriched in basophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 2835–2839 (1991).
102. Ochensberger, B., Daepf, G. C., Rihs, S. & Dahinden, C. A. Human blood basophils produce interleukin-13 in response to IgE-receptor-dependent and -independent activation. *Blood* **88**, 3028–3037 (1996).
103. Schroeder, J. T., Chichester, K. L. & Bieneman, A. P. Human Basophils Secrete IL-3: Evidence of Autocrine Priming for Phenotypic and Functional Responses in Allergic Disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 2432–2438 (2009).
104. de Paulis, A. *et al.* Expression and functions of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 7322–7331 (2006).

105. Yousefi, S. *et al.* Basophils exhibit antibacterial activity through extracellular trap formation. *Allergy* **70**, 1184–1188 (2015).
106. Cohen, M. *et al.* Lung Single-Cell Signaling Interaction Map Reveals Basophil Role in Macrophage Imprinting. *Cell* **175**, 1031-1044.e18 (2018).
107. Marone, G. *et al.* Is There a Role for Basophils in Cancer? *Front. Immunol.* **11**, 2103 (2020).
108. Ostrand-Rosenberg, S., Beury, D. W., Parker, K. H. & Horn, L. A. Survival of the fittest: how myeloid-derived suppressor cells survive in the inhospitable tumor microenvironment. *Cancer Immunol. Immunother.* **69**, 215–221 (2020).
109. Condamine, T., Mastio, J. & Gabrilovich, D. I. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 913–922 (2015).
110. Veglia, F., Sanseviero, E. & Gabrilovich, D. I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 1–14 (2021) doi:10.1038/s41577-020-00490-y.
111. Corzo, C. A. *et al.* HIF-1 $\alpha$  regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J. Exp. Med.* **207**, 2439–2453 (2010).
112. Groth, C. *et al.* Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. *Br. J. Cancer* **120**, 16–25 (2019).
113. Yang, Y., Li, C., Liu, T., Dai, X. & Bazhin, A. V. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumors: From Mechanisms to Antigen Specificity and Microenvironmental Regulation. *Front. Immunol.* **0**, (2020).
114. Mattner, J. & Wirtz, S. Friend or Foe? The Ambiguous Role of Innate Lymphoid Cells in Cancer Development. *Trends Immunol.* **38**, 29–38 (2017).
115. Dadi, S. *et al.* Cancer Immun surveillance by Tissue-Resident Innate Lymphoid Cells and Innate-like T Cells. *Cell* **164**, 365–377 (2016).

116. Fuchs, A. *et al.* Intraepithelial Type 1 Innate Lymphoid Cells Are a Unique Subset of IL-12- and IL-15-Responsive IFN- $\gamma$ -Producing Cells. *Immunity* **38**, 769–781 (2013).
117. Lakatos, P. L. & Lakatos, L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: Changes, causes and management strategies. *World J. Gastroenterol.* **14**, 3937–3947 (2008).
118. Salimi, M. *et al.* Activated innate lymphoid cell populations accumulate in human tumour tissues. *BMC Cancer* **18**, 341 (2018).
119. Bie, Q. *et al.* Polarization of ILC2s in Peripheral Blood Might Contribute to Immunosuppressive Microenvironment in Patients with Gastric Cancer. *J. Immunol. Res.* **2014**, e923135 (2014).
120. Trabanelli, S. *et al.* Tumour-derived PGD2 and NKp30-B7H6 engagement drives an immunosuppressive ILC2-MDSC axis. *Nat. Commun.* **8**, 593 (2017).
121. Zaiss, D. M. W., Gause, W. C., Osborne, L. C. & Artis, D. Emerging Functions of Amphiregulin in Orchestrating Immunity, Inflammation, and Tissue Repair. *Immunity* **42**, 216–226 (2015).
122. Suzuki, A., Leland, P., Joshi, B. H. & Puri, R. K. Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. *Cytokine* **75**, 79–88 (2015).
123. Carrega, P. *et al.* NCR + ILC3 concentrate in human lung cancer and associate with intratumoral lymphoid structures. *Nat. Commun.* **6**, 8280 (2015).
124. Dieu-Nosjean, M.-C. *et al.* Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **26**, 4410–4417 (2008).
125. Huber, S. *et al.* IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* **491**, 259–263 (2012).
126. Wang, K. & Karin, M. The IL-23 to IL-17 cascade inflammation-related cancers. *Clin. Exp. Rheumatol.* **33**, (2015).

127. Kirchberger, S. *et al.* Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *J. Exp. Med.* **210**, 917–931 (2013).
128. Quatrini, L. *et al.* Human NK cells, their receptors and function. *Eur. J. Immunol.* **51**, 1566–1579 (2021).
129. Wu, S.-Y., Fu, T., Jiang, Y.-Z. & Shao, Z.-M. Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol. Cancer* **19**, 120 (2020).
130. Toubert, A., Turhan, A., Guerci-Bresler, A., Dulphy, N. & Réa, D. Lymphocytes NK : un rôle majeur dans le contrôle immunologique de la leucémie myéloïde chronique. *médecine/sciences* **34**, 540–546 (2018).
131. Moretta, L. *et al.* Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur. J. Immunol.* **32**, 1205–1211 (2002).
132. Maghazachi, A. A. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **341**, 37–58 (2010).
133. Wu, J. & Lanier, L. L. Natural Killer Cells and Cancer. in *Advances in Cancer Research* vol. 90 127–156 (Academic Press, 2003).
134. Coudert, J. D., Scarpellino, L., Gros, F., Vivier, E. & Held, W. Sustained NKG2D engagement induces cross-tolerance of multiple distinct NK cell activation pathways. *Blood* **111**, 3571–3578 (2008).
135. Wilson, E. B. *et al.* Human tumour immune evasion via TGF- $\beta$  blocks NK cell activation but not survival allowing therapeutic restoration of anti-tumour activity. *PLoS One* **6**, e22842 (2011).
136. Holt, D., Ma, X., Kundu, N. & Fulton, A. Prostaglandin E(2) (PGE(2)) suppresses natural killer cell function primarily through the PGE(2) receptor EP4. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **60**, 1577–1586 (2011).

137. Pietra, G. *et al.* Melanoma Cells Inhibit Natural Killer Cell Function by Modulating the Expression of Activating Receptors and Cytolytic Activity. *Cancer Res.* **72**, 1407–1415 (2012).
138. Morvan, M. G. & Lanier, L. L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 7–19 (2016).
139. Kinjo, Y. *et al.* Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat. Immunol.* **12**, 966–974 (2011).
140. Zhou, D. *et al.* Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* **306**, 1786–1789 (2004).
141. Kumar, V. & Delovitch, T. L. Different subsets of natural killer T cells may vary in their roles in health and disease. *Immunology* **142**, 321–336 (2014).
142. Godfrey, D. I., MacDonald, H. R., Kronenberg, M., Smyth, M. J. & Van Kaer, L. NKT cells: what's in a name? *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 231–237 (2004).
143. Lee, P. T., Benlagha, K., Teyton, L. & Bendelac, A. Distinct Functional Lineages of Human V $\alpha$ 24 Natural Killer T Cells. *J. Exp. Med.* **195**, 637–641 (2002).
144. Gumperz, J. E., Miyake, S., Yamamura, T. & Brenner, M. B. Functionally Distinct Subsets of CD1d-restricted Natural Killer T Cells Revealed by CD1d Tetramer Staining. *J. Exp. Med.* **195**, 625–636 (2002).
145. Moreira-Teixeira, L. *et al.* Rapamycin Combined with TGF- $\beta$  Converts Human Invariant NKT Cells into Suppressive Foxp3+ Regulatory Cells. *J. Immunol.* **188**, 624–631 (2012).
146. Brennan, P. J., Brigl, M. & Brenner, M. B. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 101–117 (2013).
147. Marrero, I., Ware, R. & Kumar, V. Type II NKT Cells in Inflammation, Autoimmunity, Microbial Immunity, and Cancer. *Front. Immunol.* **0**, (2015).

148. Vliet, H. J. J. van der *et al.* Circulating Myeloid Dendritic Cells of Advanced Cancer Patients Result in Reduced Activation and a Biased Cytokine Profile in Invariant NKT Cells. *J. Immunol.* **180**, 7287–7293 (2008).
149. Gapin, L. Development of invariant natural killer T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **39**, 68–74 (2016).
150. Hayakawa, Y., Rovero, S., Forni, G. & Smyth, M. J.  $\alpha$ -Galactosylceramide (KRN7000) suppression of chemical- and oncogene-dependent carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 9464–9469 (2003).
151. Toura, I. *et al.* Cutting Edge: Inhibition of Experimental Tumor Metastasis by Dendritic Cells Pulsed with  $\alpha$ -Galactosylceramide. *J. Immunol.* **163**, 2387–2391 (1999).
152. Nishimura, T. *et al.* The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.* **12**, 987–994 (2000).
153. Haraguchi, K. *et al.* CD1d expression level in tumor cells is an important determinant for anti-tumor immunity by natural killer T cells. *Leuk. Lymphoma* **47**, 2218–2223 (2006).
154. Kuylensstierna, C. *et al.* NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: Direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d. *Eur. J. Immunol.* **41**, 1913–1923 (2011).
155. Song, L. *et al.* Va24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages. *J. Clin. Invest.* **119**, 1524–1536 (2009).
156. Courtney, A. N. *et al.* Cross-talk between NKT cells and tumor associated macrophages in the tumor microenvironment. *J. Immunol.* **196**, 142.7–142.7 (2016).
157. Terabe, M. *et al.* Transforming Growth Factor- $\beta$  Production and Myeloid Cells Are an Effector Mechanism through Which CD1d-restricted T Cells Block Cytotoxic T Lymphocyte-mediated

- Tumor Immunosurveillance : Abrogation Prevents Tumor Recurrence. *J. Exp. Med.* **198**, 1741–1752 (2003).
158. Terabe, M. *et al.* NKT cell–mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R–STAT6 pathway. *Nat. Immunol.* **1**, 515–520 (2000).
159. Park, J. M., Terabe, M., Broeke, L. T. van den, Donaldson, D. D. & Berzofsky, J. A. Unmasking immunosurveillance against a syngeneic colon cancer by elimination of CD4+ NKT regulatory cells and IL-13. *Int. J. Cancer* **114**, 80–87 (2005).
160. Burdin, N., Brossay, L. & Kronenberg, M. Immunization with  $\alpha$ -galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis. *Eur. J. Immunol.* **29**, 2014–2025 (1999).
161. Quintin, J., Cheng, S.-C., van der Meer, J. W. & Netea, M. G. Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* **29**, 1–7 (2014).
162. Benn, C. S., Netea, M. G., Selin, L. K. & Aaby, P. A small jab – a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines. *Trends Immunol.* **34**, 431–439 (2013).
163. Jiang, S. & Dong, C. A complex issue on CD4+ T-cell subsets. *Immunol. Rev.* **252**, 5–11 (2013).
164. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 445–489 (2010).
165. Lee, J. *et al.* The Multifaceted Role of Th1, Th9, and Th17 Cells in Immune Checkpoint Inhibition Therapy. *Front. Immunol.* **12**, 74 (2021).
166. Basu, R. *et al.* Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing. *Cell* **165**, 100–110 (2016).
167. Fu, Q. *et al.* Structural Basis and Functional Role of Intramembrane Trimerization of the Fas/CD95 Death Receptor. *Mol. Cell* **61**, 602–613 (2016).

168. Martinet, L. *et al.* Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* **71**, 5678–5687 (2011).
169. Galon, J. *et al.* Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* **313**, 1960–1964 (2006).
170. Dudley, M. E. *et al.* Adoptive Cell Therapy for Patients With Metastatic Melanoma: Evaluation of Intensive Myeloablative Chemoradiation Preparative Regimens. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5233–5239 (2008).
171. Mahmoud, S. M. A. *et al.* Tumor-Infiltrating CD8+ Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1949–1955 (2011).
172. Idos, G. E. *et al.* The Prognostic Implications of Tumor Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci. Rep.* **10**, 3360 (2020).
173. Kmiecik, J. *et al.* Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. *J. Neuroimmunol.* **264**, 71–83 (2013).
174. Pagès, F. *et al.* International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet Lond. Engl.* **391**, 2128–2139 (2018).
175. Nakanishi, M. & Rosenberg, D. W. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Semin. Immunopathol.* **35**, 123–137 (2013).
176. Kano, A. Tumor cell secretion of soluble factor(s) for specific immunosuppression. *Sci. Rep.* **5**, 8913 (2015).
177. Staveley-O'Carroll, K. *et al.* Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 1178–1183 (1998).

178. Lanitis, E., Dangaj, D., Irving, M. & Coukos, G. Mechanisms regulating T-cell infiltration and activity in solid tumors. *Ann. Oncol.* **28**, xii18–xii32 (2017).
179. Kouidhi, S., Noman, M. Z., Kieda, C., Elgaaied, A. B. & Chouaib, S. Intrinsic and Tumor Microenvironment-Induced Metabolism Adaptations of T Cells and Impact on Their Differentiation and Function. *Front. Immunol.* **0**, (2016).
180. Aerts, J. G. & Hegmans, J. P. Tumor-Specific Cytotoxic T Cells Are Crucial for Efficacy of Immunomodulatory Antibodies in Patients with Lung Cancer. *Cancer Res.* **73**, 2381–2388 (2013).
181. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 745–763 (2004).
182. Djenidi, F. *et al.* CD8+CD103+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Are Tumor-Specific Tissue-Resident Memory T Cells and a Prognostic Factor for Survival in Lung Cancer Patients. *J. Immunol.* **194**, 3475–3486 (2015).
183. Amsen, D., van Gisbergen, K. P. J. M., Hombrink, P. & van Lier, R. A. W. Tissue-resident memory T cells at the center of immunity to solid tumors. *Nat. Immunol.* **19**, 538–546 (2018).
184. Update, C.-19. *Janeway's Immunobiology ( 8th Edition )*.
185. Protti, M. P. & De Monte, L. Cross-talk within the tumor microenvironment mediates Th2-type inflammation in pancreatic cancer. *Oncoimmunology* **1**, 89–91 (2012).
186. De Monte, L. *et al.* Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* **208**, 469–478 (2011).
187. Le, L. *et al.* Th2 cell infiltrations predict neoadjuvant chemotherapy response of estrogen receptor-positive breast cancer. *Gland Surg.* **10**, 154–165 (2021).
188. Ellyard, J. I., Simson, L. & Parish, C. R. Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens* **70**, 1–11 (2007).

189. Tepper, R. I., Coffman, R. L. & Leder, P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* **257**, 548–551 (1992).
190. Shen, M., Sun, Q., Wang, J., Pan, W. & Ren, X. Positive and negative functions of B lymphocytes in tumors. *Oncotarget* **7**, 55828–55839 (2016).
191. Bruno, T. C. *et al.* Antigen-Presenting Intratumoral B Cells Affect CD4+ TIL Phenotypes in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 898–907 (2017).
192. Rossetti, R. A. M. *et al.* B lymphocytes can be activated to act as antigen presenting cells to promote anti-tumor responses. *PLoS One* **13**, e0199034 (2018).
193. Sautès-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J. & Fridman, W. H. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **19**, 307–325 (2019).
194. Nielsen, J. S. *et al.* CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 3281–3292 (2012).
195. Iglesia, M. D. *et al.* Prognostic B-cell signatures using mRNA-seq in patients with subtype-specific breast and ovarian cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 3818–3829 (2014).
196. Ladányi, A. *et al.* Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **60**, 1729–1738 (2011).
197. Lu, Y. *et al.* Complement Signals Determine Opposite Effects of B Cells in Chemotherapy-Induced Immunity. *Cell* **180**, 1081-1097.e24 (2020).
198. Zhang, Y. *et al.* Mammary-tumor-educated B cells acquire LAP/TGF- $\beta$  and PD-L1 expression and suppress anti-tumor immune responses. *Int. Immunol.* **28**, 423–433 (2016).
199. Shalapour, S. *et al.* Immunosuppressive plasma cells impede T cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature* **521**, 94–98 (2015).

200. Cai, C. *et al.* Interleukin 10-expressing B cells inhibit tumor-infiltrating T cell function and correlate with T cell Tim-3 expression in renal cell carcinoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **37**, 8209–8218 (2016).
201. Shen, P. *et al.* IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* **507**, 366–370 (2014).
202. Catalán, D. *et al.* Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells. *Front. Immunol.* **0**, (2021).
203. Yolanda, L.-V. *et al.* Gastric cancer progression associated with local humoral immune responses. *BMC Cancer* **15**, 924 (2015).
204. Wang, S. *et al.* Tumor-infiltrating B cells: their role and application in anti-tumor immunity in lung cancer. *Cell. Mol. Immunol.* **16**, 6–18 (2019).
205. Weigmann, B. & Neurath, M. F. Th9 cells in inflammatory bowel diseases. *Semin. Immunopathol.* **39**, 89–95 (2017).
206. Elyaman, W. & Khoury, S. J. Th9 cells in the pathogenesis of EAE and multiple sclerosis. *Semin. Immunopathol.* **39**, 79–87 (2017).
207. Vyas, S. P. & Goswami, R. A Decade of Th9 Cells: Role of Th9 Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Front. Immunol.* **0**, (2018).
208. Végran, F., Apetoh, L. & Ghiringhelli, F. Th9 Cells: A Novel CD4 T-cell Subset in the Immune War against Cancer. *Cancer Res.* **75**, 475–479 (2015).
209. Purwar, R. *et al.* Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat. Med.* **18**, 1248–1253 (2012).
210. Lu, Y. *et al.* Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *J. Clin. Invest.* **122**, 4160–4171 (2012).

211. Zhao, Y. *et al.* Dectin-1-activated dendritic cells trigger potent antitumour immunity through the induction of Th9 cells. *Nat. Commun.* **7**, 12368 (2016).
212. Park, J. *et al.* Murine Th9 cells promote the survival of myeloid dendritic cells in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **63**, 835–845 (2014).
213. Végran, F. *et al.* The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of T H 9 cells. *Nat. Immunol.* **15**, 758–766 (2014).
214. Lu, Y. *et al.* Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4+ T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell* **33**, 1048-1060.e7 (2018).
215. Fang, Y. *et al.* IL-9 inhibits HTB-72 melanoma cell growth through upregulation of p21 and TRAIL. *J. Surg. Oncol.* **111**, 969–974 (2015).
216. Miao, B.-P. *et al.* Inhibition of squamous cancer growth in a mouse model by Staphylococcal enterotoxin B-triggered Th9 cell expansion. *Cell. Mol. Immunol.* **14**, 371–379 (2017).
217. Nagato, T. *et al.* Expression of Interleukin-9 in Nasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma Cell Lines and Patients. *Clin. Cancer Res.* **11**, 8250–8257 (2005).
218. Ju, W. *et al.* CP-690,550, a therapeutic agent, inhibits cytokine-mediated Jak3 activation and proliferation of T cells from patients with ATL and HAM/TSP. *Blood* **117**, 1938–1946 (2011).
219. Glimelius, I. *et al.* IL-9 expression contributes to the cellular composition in Hodgkin lymphoma. *Eur. J. Haematol.* **76**, 278–283 (2006).
220. Qiu, L. *et al.* Autocrine release of interleukin-9 promotes Jak3-dependent survival of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma cells. *Blood* **108**, 2407–2415 (2006).
221. Chen, N., Lv, X., Li, P., Lu, K. & Wang, X. Role of high expression of IL-9 in prognosis of CLL. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 716–721 (2014).

222. Feng, L.-L., Gao, J.-M., Li, P.-P. & Wang, X. IL-9 Contributes to Immunosuppression Mediated by Regulatory T Cells and Mast Cells in B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *J. Clin. Immunol.* **31**, 1084–1094 (2011).
223. Chen, T. *et al.* Th9 Cell Differentiation and Its Dual Effects in Tumor Development. *Front. Immunol.* **0**, (2020).
224. Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* **6**, 1123–1132 (2005).
225. Ouyang, W., Kolls, J. K. & Zheng, Y. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity* **28**, 454–467 (2008).
226. Yang, L. *et al.* IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* **454**, 350–352 (2008).
227. Manel, N., Unutmaz, D. & Littman, D. R. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat. Immunol.* **9**, 641–649 (2008).
228. Zambrano-Zaragoza, J. F., Romo-Martínez, E. J., Durán-Avelar, M. de J., García-Magallanes, N. & Vibanco-Pérez, N. Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. *Int. J. Inflamm.* **2014**, 651503 (2014).
229. Chae, W.-J. *et al.* Ablation of IL-17A abrogates progression of spontaneous intestinal tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 5540–5544 (2010).
230. Grivennikov, S. I. *et al.* Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* **491**, 254–258 (2012).
231. Zhang, Q. *et al.* Interleukin-17 promotes formation and growth of prostate adenocarcinoma in mouse models. *Cancer Res.* **72**, 2589–2599 (2012).

232. Chang, S. H. *et al.* T helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 5664–5669 (2014).
233. McAllister, F. *et al.* Oncogenic Kras activates a hematopoietic-to-epithelial IL-17 signaling axis in preinvasive pancreatic neoplasia. *Cancer Cell* **25**, 621–637 (2014).
234. Coffelt, S. B. *et al.* IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* **522**, 345–348 (2015).
235. Gomes, A. L. *et al.* Metabolic Inflammation-Associated IL-17A Causes Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell* **30**, 161–175 (2016).
236. Numasaki, M. *et al.* IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 6177–6189 (2005).
237. Kato, T. *et al.* Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 735–738 (2001).
238. Umemura, M. *et al.* Involvement of IL-17 in Fas ligand-induced inflammation. *Int. Immunol.* **16**, 1099–1108 (2004).
239. Martin-Orozco, N. *et al.* T Helper 17 Cells Promote Cytotoxic T Cell Activation in Tumor Immunity. *Immunity* **31**, 787–798 (2009).
240. Muranski, P. *et al.* Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* **112**, 362–373 (2008).
241. Muranski, P. *et al.* Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity* **35**, 972–985 (2011).
242. Spranger, S. *et al.* Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Sci. Transl. Med.* **5**, 200ra116 (2013).

243. Garcia-Diaz, A. *et al.* Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep.* **19**, 1189–1201 (2017).
244. Guery, L. & Hugues, S. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *BioMed Res. Int.* **2015**, 1–11 (2015).
245. Eyerich, S. *et al.* Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J. Clin. Invest.* **119**, 3573–3585 (2009).
246. Duhon, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* **10**, 857–863 (2009).
247. Liudahl, S. M. & Coussens, L. M. Chapter 8 - To Help or To Harm: Dynamic Roles of CD4+ T Helper Cells in Solid Tumor Microenvironments. in *Immunology* (ed. Hayat, M. A.) 97–116 (Academic Press, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-809819-6.00008-3.
248. Sabat, R., Ouyang, W. & Wolk, K. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 21–38 (2014).
249. Kryczek, I. *et al.* IL-22(+)CD4(+) T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L. *Immunity* **40**, 772–784 (2014).
250. Di Lullo, G. *et al.* Th22 cells increase in poor prognosis multiple myeloma and promote tumor cell growth and survival. *Oncoimmunology* **4**, e1005460 (2015).
251. Zhuang, Y. *et al.* Increased intratumoral IL-22-producing CD4(+) T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival. *Cancer Immunol. Immunother. Clin* **61**, 1965–1975 (2012).

252. Xu, X. *et al.* Increased intratumoral interleukin 22 levels and frequencies of interleukin 22-producing CD4<sup>+</sup> T cells correlate with pancreatic cancer progression. *Pancreas* **43**, 470–477 (2014).
253. Shevach, E. M. & Thornton, A. M. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol. Rev.* **259**, 88–102 (2014).
254. Pallandre, J.-R. *et al.* Role of STAT3 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Regulatory Lymphocyte Generation: Implications in Graft-versus-Host Disease and Antitumor Immunity. *J. Immunol.* **179**, 7593–7604 (2007).
255. Kim, J.-H., Kim, B. S. & Lee, S.-K. Regulatory T Cells in Tumor Microenvironment and Approach for Anticancer Immunotherapy. *Immune Netw.* **20**, (2020).
256. Saito, T. *et al.* Two FOXP3<sup>(+)</sup>CD4<sup>(+)</sup> T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat. Med.* **22**, 679–684 (2016).
257. Kotsakis, A. *et al.* Prognostic value of circulating regulatory T cell subsets in untreated non-small cell lung cancer patients. *Sci. Rep.* **6**, 39247 (2016).
258. Shang, B., Liu, Y., Jiang, S. & Liu, Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **5**, 15179 (2015).
259. Paluskiewicz, C. M. *et al.* T Regulatory Cells and Priming the Suppressive Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **0**, (2019).
260. Buchbinder, E. I. & Desai, A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am. J. Clin. Oncol.* **39**, 98–106 (2016).
261. Munn, D. H. & Mellor, A. L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol.* **34**, 137–143 (2013).
262. Selby, M. J. *et al.* Anti-CTLA-4 Antibodies of IgG2a Isotype Enhance Antitumor Activity through Reduction of Intratumoral Regulatory T Cells. *Cancer Immunol. Res.* **1**, 32–42 (2013).

263. Liang, B. *et al.* Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 5916–5926 (2008).
264. Cai, J., Wang, D., Zhang, G. & Guo, X. The Role Of PD-1/PD-L1 Axis In Treg Development And Function: Implications For Cancer Immunotherapy. *OncoTargets Ther.* **12**, 8437–8445 (2019).
265. Cao, X. *et al.* Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* **27**, 635–646 (2007).
266. Dennis, K. L., Blatner, N. R., Gounari, F. & Khazaie, K. Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **25**, 637–645 (2013).
267. Wrzesinski, S. H., Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 5262–5270 (2007).
268. Romio, M. *et al.* Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and T<sub>H</sub>17 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **301**, C530-539 (2011).
269. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat. Immunol.* **8**, 1353–1362 (2007).
270. Motz, G. T. & Coukos, G. Deciphering and Reversing Tumor Immune Suppression. *Immunity* **39**, 61–73 (2013).
271. Kim, K.-D. *et al.* Targeted calcium influx boosts cytotoxic T lymphocyte function in the tumour microenvironment. *Nat. Commun.* **8**, 15365 (2017).
272. Schmidt, A., Oberle, N. & Krammer, P. H. Molecular Mechanisms of Treg-Mediated T Cell Suppression. *Front. Immunol.* **0**, (2012).
273. Togashi, Y., Shitara, K. & Nishikawa, H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **16**, 356–371 (2019).

274. Fernandez, E. M. *et al.* Cancer-Specific Thresholds Adjust for Whole Exome Sequencing–Based Tumor Mutational Burden Distribution. *JCO Precis. Oncol.* **3**, PO.18.00400 (2019).
275. Gupta, S., Artomov, M., Goggins, W., Daly, M. & Tsao, H. Gender Disparity and Mutation Burden in Metastatic Melanoma. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **107**, (2015).
276. Rizvi, N. A. *et al.* Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non–small cell lung cancer. *Science* **348**, 124–128 (2015).
277. McGrail, D. J. *et al.* High tumor mutation burden fails to predict immune checkpoint blockade response across all cancer types. *Ann. Oncol.* **32**, 661–672 (2021).
278. Gabory, A., Attig, L. & Junien, C. Developmental programming and epigenetics. *Am. J. Clin. Nutr.* **94**, 1943S-1952S (2011).
279. Baylin, S. B. & Jones, P. A. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, a019505 (2016).
280. West, A. C. & Johnstone, R. W. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *J. Clin. Invest.* **124**, 30–39 (2014).
281. Tsai, H.-C. *et al.* Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. *Cancer Cell* **21**, 430–446 (2012).
282. Bader, J. E., Voss, K. & Rathmell, J. C. Targeting Metabolism to Improve the Tumor Microenvironment for Cancer Immunotherapy. *Mol. Cell* **78**, 1019–1033 (2020).
283. Voss, K., Larsen, S. E. & Snow, A. L. Metabolic reprogramming and apoptosis sensitivity: Defining the contours of a T cell response. *Cancer Lett.* **408**, 190–196 (2017).
284. Macintyre, A. N. *et al.* The Glucose Transporter Glut1 Is Selectively Essential for CD4 T Cell Activation and Effector Function. *Cell Metab.* **20**, 61–72 (2014).
285. Choi, S. Y. C., Collins, C. C., Gout, P. W. & Wang, Y. Cancer-generated lactic acid: a regulatory, immunosuppressive metabolite? *J. Pathol.* **230**, 350–355 (2013).

286. Colegio, O. R. *et al.* Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* **513**, 559–563 (2014).
287. Sun, X. *et al.* Clinicopathological Significance and Prognostic Value of Lactate Dehydrogenase A Expression in Gastric Cancer Patients. *PLOS ONE* **9**, e91068 (2014).
288. Girgis, H. *et al.* Lactate Dehydrogenase A is a potential prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *Mol. Cancer* **13**, 101 (2014).
289. Nasi, A. *et al.* Dendritic Cell Reprogramming by Endogenously Produced Lactic Acid. *J. Immunol.* **191**, 3090–3099 (2013).
290. Fischer, K. *et al.* Inhibitory effect of tumor cell–derived lactic acid on human T cells. *Blood* **109**, 3812–3819 (2007).
291. Gottfried, E. *et al.* Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* **107**, 2013–2021 (2006).
292. Husain, Z., Huang, Y., Seth, P. & Sukhatme, V. P. Tumor-Derived Lactate Modifies Antitumor Immune Response: Effect on Myeloid-Derived Suppressor Cells and NK Cells. *J. Immunol.* **191**, 1486–1495 (2013).
293. Angelin, A. *et al.* Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metab.* **25**, 1282-1293.e7 (2017).
294. Lukey, M. J., Katt, W. P. & Cerione, R. A. Targeting amino acid metabolism for cancer therapy. *Drug Discov. Today* **22**, 796–804 (2017).
295. Klysz, D. *et al.* Glutamine-dependent  $\alpha$ -ketoglutarate production regulates the balance between T helper 1 cell and regulatory T cell generation. *Sci. Signal.* **8**, ra97–ra97 (2015).
296. Oh, M.-H. *et al.* Targeting glutamine metabolism enhances tumor-specific immunity by modulating suppressive myeloid cells. *J. Clin. Invest.* **130**, 3865–3884 (2020).

297. Mondanelli, G., Iacono, A., Allegrucci, M., Puccetti, P. & Grohmann, U. Immunoregulatory Interplay Between Arginine and Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Front. Immunol.* **10**, 1565 (2019).
298. Zou, S., Wang, X., Liu, P., Ke, C. & Xu, S. Arginine metabolism and deprivation in cancer therapy. *Biomed. Pharmacother.* **118**, 109210 (2019).
299. Fletcher, M. *et al.* L-Arginine Depletion Blunts Antitumor T-cell Responses by Inducing Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.* **75**, 275–283 (2015).
300. Carmona-Fontaine, C. *et al.* Metabolic origins of spatial organization in the tumor microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 2934–2939 (2017).
301. Sektioglu, I. M. *et al.* Macrophage-derived nitric oxide initiates T-cell diapedesis and tumor rejection. *Oncotarget* **5**, e1204506 (2016).
302. Keshet, R. & Erez, A. Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. *Dis. Model. Mech.* **11**, (2018).
303. Platten, M., Nollen, E. A. A., Röhrig, U. F., Fallarino, F. & Opitz, C. A. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 379–401 (2019).
304. Heng, B. *et al.* Understanding the role of the kynurenine pathway in human breast cancer immunobiology. *Oncotarget* **7**, 6506–6520 (2015).
305. Ino, K. *et al.* Inverse Correlation between Tumoral Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Endometrial Cancer: Its Association with Disease Progression and Survival. *Clin. Cancer Res.* **14**, 2310–2317 (2008).
306. Frumento, G. *et al.* Tryptophan-derived Catabolites Are Responsible for Inhibition of T and Natural Killer Cell Proliferation Induced by Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *J. Exp. Med.* **196**, 459–468 (2002).

307. Munn, D. H. *et al.* GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Immunity* **22**, 633–642 (2005).
308. Fallarino, F. *et al.* Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 1206–1212 (2003).
309. Labadie, B. W., Bao, R. & Luke, J. J. Reimagining IDO Pathway Inhibition in Cancer Immunotherapy via Downstream Focus on the Tryptophan–Kynurenine–Aryl Hydrocarbon Axis. *Clin. Cancer Res.* **25**, 1462–1471 (2019).
310. Wegiel, B., Vuerich, M., Daneshmandi, S. & Seth, P. Metabolic Switch in the Tumor Microenvironment Determines Immune Responses to Anti-cancer Therapy. *Front. Oncol.* **0**, (2018).
311. Beloribi-Djefafia, S., Vasseur, S. & Guillaumond, F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis* **5**, e189–e189 (2016).
312. Le Bourgeois, T. *et al.* Targeting T Cell Metabolism for Improvement of Cancer Immunotherapy. *Front. Oncol.* **0**, (2018).
313. Wu, H. *et al.* Lipid droplet-dependent fatty acid metabolism controls the immune suppressive phenotype of tumor-associated macrophages. *EMBO Mol. Med.* **11**, (2019).
314. Herber, D. L. *et al.* Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nat. Med.* **16**, 880–886 (2010).
315. Jiang, L., Fang, X., Wang, H., Li, D. & Wang, X. Ovarian Cancer-Intrinsic Fatty Acid Synthase Prevents Anti-tumor Immunity by Disrupting Tumor-Infiltrating Dendritic Cells. *Front. Immunol.* **0**, (2018).
316. Michalek, R. D. *et al.* Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4<sup>+</sup> T Cell Subsets. *J. Immunol.* **186**, 3299–3303 (2011).

317. Pearce, E. L., Poffenberger, M. C., Chang, C.-H. & Jones, R. G. Fueling Immunity: Insights into Metabolism and Lymphocyte Function. *Science* **342**, (2013).
318. O’Sullivan, D. *et al.* Memory CD8<sup>+</sup> T Cells Use Cell-Intrinsic Lipolysis to Support the Metabolic Programming Necessary for Development. *Immunity* **49**, 375–376 (2018).
319. Wang, H. *et al.* CD36-mediated metabolic adaptation supports regulatory T cell survival and function in tumors. *Nat. Immunol.* **21**, 298–308 (2020).
320. Schroeder, B. *et al.* Fatty acid synthase (FASN) regulates the mitochondrial priming of cancer cells. *Cell Death Dis.* **12**, 1–10 (2021).
321. Eichner, L. J. *et al.* Genetic Analysis Reveals AMPK Is Required to Support Tumor Growth in Murine Kras-Dependent Lung Cancer Models. *Cell Metab.* **29**, 285-302.e7 (2019).
322. Ma, E. H., Poffenberger, M. C., Wong, A. H.-T. & Jones, R. G. The role of AMPK in T cell metabolism and function. *Curr. Opin. Immunol.* **46**, 45–52 (2017).
323. Bengsch, B. *et al.* Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8<sup>+</sup> T Cell Exhaustion. *Immunity* **45**, 358–373 (2016).
324. Scharping, N. E. *et al.* The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity* **45**, 374–388 (2016).
325. Rao, E. *et al.* Deficiency of AMPK in CD8<sup>+</sup> T cells suppresses their anti-tumor function by inducing protein phosphatase-mediated cell death. *Oncotarget* **6**, 7944–7958 (2015).
326. Clambey, E. T. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 alpha–dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E2784–E2793 (2012).

327. Chiu, D. K.-C. *et al.* Hypoxia inducible factor HIF-1 promotes myeloid-derived suppressor cells accumulation through ENTPD2/CD39L1 in hepatocellular carcinoma. *Nat. Commun.* **8**, 517 (2017).
328. Deng, J. *et al.* Hypoxia-Induced VISTA Promotes the Suppressive Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Cancer Immunol. Res.* **7**, 1079–1090 (2019).
329. Winning, S. & Fandrey, J. Dendritic Cells under Hypoxia: How Oxygen Shortage Affects the Linkage between Innate and Adaptive Immunity. *J. Immunol. Res.* **2016**, e5134329 (2016).
330. Cho, S. H. *et al.* Germinal centre hypoxia and regulation of antibody qualities by a hypoxia response system. *Nature* **537**, 234–238 (2016).
331. Di Virgilio, F., Sarti, A. C., Falzoni, S., De Marchi, E. & Adinolfi, E. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 601–618 (2018).
332. Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P. & Haskó, G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 842–857 (2013).
333. Ohta, A. *et al.* The development and immunosuppressive functions of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Front. Immunol.* **3**, 190 (2012).
334. Hegde, P. S., Karanikas, V. & Evers, S. The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **22**, 1865–1874 (2016).
335. Liu, Y.-T. & Sun, Z.-J. Turning cold tumors into hot tumors by improving T-cell infiltration. *Theranostics* **11**, 5365–5386 (2021).
336. Herbst, R. S. *et al.* Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* **515**, 563–567 (2014).
337. Galon, J. & Bruni, D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 197–218 (2019).

338. Chen, D. S. & Mellman, I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* **541**, 321–330 (2017).
339. Khong, H. T. & Restifo, N. P. Natural selection of tumor variants in the generation of ‘tumor escape’ phenotypes. *Nat. Immunol.* **3**, 999–1005 (2002).
340. Cornel, A. M., Mimpfen, I. L. & Nierkens, S. MHC Class I Downregulation in Cancer: Underlying Mechanisms and Potential Targets for Cancer Immunotherapy. *Cancers* **12**, 1760 (2020).
341. Lutz, M. B. & Schuler, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* **23**, 445–449 (2002).
342. Massagué, J. TGFbeta in Cancer. *Cell* **134**, 215–230 (2008).
343. Batlle, E. & Massagué, J. Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* **50**, 924–940 (2019).
344. Kim, B.-G., Malek, E., Choi, S. H., Ignatz-Hoover, J. J. & Driscoll, J. J. Novel therapies emerging in oncology to target the TGF- $\beta$  pathway. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **14**, 55 (2021).
345. Carmeliet, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* **69 Suppl 3**, 4–10 (2005).
346. Li, Y.-L., Zhao, H. & Ren, X.-B. Relationship of VEGF/VEGFR with immune and cancer cells: staggering or forward? *Cancer Biol. Med.* **13**, 206–214 (2016).
347. Yang, J., Yan, J. & Liu, B. Targeting VEGF/VEGFR to Modulate Antitumor Immunity. *Front. Immunol.* **9**, 978 (2018).
348. Chan, A. T., Ogino, S. & Fuchs, C. S. Aspirin Use and Survival After Diagnosis of Colorectal Cancer. *JAMA* **302**, 649–658 (2009).
349. Yang, L. *et al.* Host and direct antitumor effects and profound reduction in tumor metastasis with selective EP4 receptor antagonism. *Cancer Res.* **66**, 9665–9672 (2006).

350. Kawamori, T. *et al.* Chemopreventive effects of ONO-8711, a selective prostaglandin E receptor EP(1) antagonist, on breast cancer development. *Carcinogenesis* **22**, 2001–2004 (2001).
351. Wang, D. & DuBois, R. N. Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 181–193 (2010).
352. Immune Checkpoint Proteins. <https://www.sinobiological.com/category/immune-checkpoint-proteins-elite>.
353. Brunet, J. F. *et al.* A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* **328**, 267–270 (1987).
354. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* **11**, 3887–3895 (1992).
355. Solinas, C. *et al.* Programmed Cell Death-Ligand 2: A Neglected But Important Target in the Immune Response to Cancer? *Transl. Oncol.* **13**, 100811 (2020).
356. Yi, M., Niu, M., Xu, L., Luo, S. & Wu, K. Regulation of PD-L1 expression in the tumor microenvironment. *J. Hematol. Oncol.* **14**, 10 (2021).
357. Patsoukis, N., Wang, Q., Strauss, L. & Boussiotis, V. A. Revisiting the PD-1 pathway. *Sci. Adv.* **6**, eabd2712 (2020).
358. Burr, M. L. *et al.* CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity. *Nature* **549**, 101–105 (2017).
359. Mezzadra, R. *et al.* Identification of CMTM6 and CMTM4 as PD-L1 protein regulators. *Nature* **549**, 106–110 (2017).
360. Gato-Cañas, M. *et al.* PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity. *Cell Rep.* **20**, 1818–1829 (2017).
361. Diskin, B. *et al.* PD-L1 engagement on T cells promotes self-tolerance and suppression of neighboring macrophages and effector T cells in cancer. *Nat. Immunol.* **21**, 442–454 (2020).

362. Takeuchi, M. *et al.* Soluble PD-L1 with PD-1-binding capacity exists in the plasma of patients with non-small cell lung cancer. *Immunol. Lett.* **196**, 155–160 (2018).
363. Mahoney, K. M. *et al.* A secreted PD-L1 splice variant that covalently dimerizes and mediates immunosuppression. *Cancer Immunol. Immunother.* **68**, 421–432 (2019).
364. Patsoukis, N. *et al.* Selective Effects of PD-1 on Akt and Ras Pathways Regulate Molecular Components of the Cell Cycle and Inhibit T Cell Proliferation. *Sci. Signal.* **5**, ra46–ra46 (2012).
365. Francisco, L. M. *et al.* PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **206**, 3015–3029 (2009).
366. Mizuno, R. *et al.* PD-1 Primarily Targets TCR Signal in the Inhibition of Functional T Cell Activation. *Front. Immunol.* **0**, (2019).
367. Hui, E. *et al.* T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1–mediated inhibition. *Science* **355**, 1428–1433 (2017).
368. Rota, G. *et al.* Shp-2 Is Dispensable for Establishing T Cell Exhaustion and for PD-1 Signaling In Vivo. *Cell Rep.* **23**, 39–49 (2018).
369. Schatton, T. *et al.* Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* **451**, 345–349 (2008).
370. Kleffel, S. *et al.* Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth. *Cell* **162**, 1242–1256 (2015).
371. Patsoukis, N. *et al.* PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat. Commun.* **6**, 1–13 (2015).
372. Pearce, E. L. *et al.* Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature* **460**, 103–107 (2009).
373. Gordon, S. R. *et al.* PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* **545**, 495–499 (2017).

374. Strauss, L. *et al.* Targeted deletion of PD-1 in myeloid cells induces antitumor immunity. *Sci. Immunol.* **5**, (2020).
375. Guo, L., Wei, R., Lin, Y. & Kwok, H. F. Clinical and Recent Patents Applications of PD-1/PD-L1 Targeting Immunotherapy in Cancer Treatment—Current Progress, Strategy, and Future Perspective. *Front. Immunol.* **11**, 1508 (2020).
376. He, Y. *et al.* TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy. *OncoTargets Ther.* **11**, 7005–7009 (2018).
377. Lecocq, Q., Keyaerts, M., Devoogdt, N. & Breckpot, K. The Next-Generation Immune Checkpoint LAG-3 and Its Therapeutic Potential in Oncology: Third Time’s a Charm. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 75 (2020).
378. Marinelli, O. *et al.* ICOS-L as a Potential Therapeutic Target for Cancer Immunotherapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* **19**, 1107–1113 (2018).
379. Alard, E. *et al.* Advances in Anti-Cancer Immunotherapy: Car-T Cell, Checkpoint Inhibitors, Dendritic Cell Vaccines, and Oncolytic Viruses, and Emerging Cellular and Molecular Targets. *Cancers* **12**, 1826 (2020).
380. Denis, H. *et al.* Les immunothérapies spécifiques dans le traitement des cancers. *Bull. Cancer (Paris)* **106**, 37–47 (2019).
381. Denis, M., Duruisseaux, M., Brevet, M. & Dumontet, C. How Can Immune Checkpoint Inhibitors Cause Hyperprogression in Solid Tumors? *Front. Immunol.* **11**, 492 (2020).
382. Seymour, L. *et al.* iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *Lancet Oncol.* **18**, e143–e152 (2017).
383. Lemiale, V. *et al.* Severe toxicity from checkpoint protein inhibitors: What intensive care physicians need to know? *Ann. Intensive Care* **9**, 25 (2019).

384. Wei, S. C. *et al.* Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. *Cell* **170**, 1120-1133.e17 (2017).
385. Riaz, N. *et al.* Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. *Cell* **171**, 934-949.e16 (2017).
386. Chen, P.-L. *et al.* Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discov.* **6**, 827–837 (2016).
387. Topalian, S. L. *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2443–2454 (2012).
388. Mansfield, A. S. *et al.* Temporal and spatial discordance of programmed cell death-ligand 1 expression and lymphocyte tumor infiltration between paired primary lesions and brain metastases in lung cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **27**, 1953–1958 (2016).
389. Yuza, K., Nagahashi, M., Watanabe, S., Takabe, K. & Wakai, T. Hypermutation and microsatellite instability in gastrointestinal cancers. *Oncotarget* **8**, 112103–112115 (2017).
390. Kim, S. T. *et al.* Correlating programmed death ligand 1 (PD-L1) expression, mismatch repair deficiency, and outcomes across tumor types: implications for immunotherapy. *Oncotarget* **8**, 77415–77423 (2017).
391. Jin, Z. & Yoon, H. H. The promise of PD-1 inhibitors in gastro-esophageal cancers: microsatellite instability vs. PD-L1. *J. Gastrointest. Oncol.* **7**, 771–788 (2016).
392. Eggink, F. A. *et al.* Immunological profiling of molecularly classified high-risk endometrial cancers identifies POLE-mutant and microsatellite unstable carcinomas as candidates for checkpoint inhibition. *Oncoimmunology* **6**, e1264565 (2017).
393. McGranahan, N. *et al.* Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* **351**, 1463–1469 (2016).

394. Petrelli, F. *et al.* Clinical and Molecular Predictors of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Lung Cancer* **19**, 315–322 (2018).
395. Jiang, L. *et al.* PD-L1 expression and its relationship with oncogenic drivers in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Oncotarget* **8**, 26845–26857 (2017).
396. Cha, Y. J. & Shim, H. S. PD-L1 expression and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes are associated with ALK rearrangement and clinicopathological features in inflammatory myofibroblastic tumors. *Oncotarget* **8**, 89465–89474 (2017).
397. Gainor, J. F. *et al.* EGFR Mutations and ALK Rearrangements Are Associated with Low Response Rates to PD-1 Pathway Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer: A Retrospective Analysis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **22**, 4585–4593 (2016).
398. Dong, Z.-Y. *et al.* Potential Predictive Value of TP53 and KRAS Mutation Status for Response to PD-1 Blockade Immunotherapy in Lung Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**, 3012–3024 (2017).
399. Skoulidis, F. *et al.* STK11/LKB1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Cancer Discov.* **8**, 822–835 (2018).
400. Gopalakrishnan, V. *et al.* Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* **359**, 97–103 (2018).
401. Routy, B. *et al.* Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* **359**, 91–97 (2018).
402. Yi, M. *et al.* Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors. *Mol. Cancer* **17**, 1–14 (2018).
403. Macek Jilkova, Z. *et al.* Immunologic Features of Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma Before and During Sorafenib or Anti-programmed Death-1/Programmed Death-L1 Treatment. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **10**, e00058 (2019).

404. Bagley, S. J. *et al.* Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio as a marker of outcomes in nivolumab-treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* **106**, 1–7 (2017).
405. Kazandjian, D., Gong, Y., Keegan, P., Pazdur, R. & Blumenthal, G. M. Prognostic Value of the Lung Immune Prognostic Index for Patients Treated for Metastatic Non–Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* **5**, 1481–1485 (2019).
406. Boutsikou, E. *et al.* Tumour necrosis factor, interferon-gamma and interleukins as predictive markers of antiprogrammed cell-death protein-1 treatment in advanced non-small cell lung cancer: a pragmatic approach in clinical practice. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **10**, 1758835918768238 (2018).
407. Ayers, M. *et al.* IFN- $\gamma$ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J. Clin. Invest.* **127**, 2930–2940 (2017).
408. Liu, X.-D. *et al.* PBRM1 loss defines a nonimmunogenic tumor phenotype associated with checkpoint inhibitor resistance in renal carcinoma. *Nat. Commun.* **11**, 2135 (2020).
409. Lee, J. H. *et al.* Circulating tumour DNA predicts response to anti-PD1 antibodies in metastatic melanoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **28**, 1130–1136 (2017).
410. Zhou, J. *et al.* Soluble PD-L1 as a Biomarker in Malignant Melanoma Treated with Checkpoint Blockade. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 480–492 (2017).
411. Bai, R., Lv, Z., Xu, D. & Cui, J. Predictive biomarkers for cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. *Biomark. Res.* **8**, 34 (2020).
412. Frelaut, M., Le Tourneau, C. & Borcoman, E. Hyperprogression under Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2674 (2019).

413. Ferrara, R. *et al.* Hyperprogressive Disease in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Treated With PD-1/PD-L1 Inhibitors or With Single-Agent Chemotherapy. *JAMA Oncol.* **4**, 1543–1552 (2018).
414. Bai, R. *et al.* Mechanisms of Cancer Resistance to Immunotherapy. *Front. Oncol.* **10**, 1290 (2020).
415. Kluger, H. M. *et al.* Defining tumor resistance to PD-1 pathway blockade: recommendations from the first meeting of the SITC Immunotherapy Resistance Taskforce. *J. Immunother. Cancer* **8**, e000398 (2020).
416. Ngiew, S. F. *et al.* A Threshold Level of Intratumor CD8+ T-cell PD1 Expression Dictates Therapeutic Response to Anti-PD1. *Cancer Res.* **75**, 3800–3811 (2015).
417. Kim, K. *et al.* Single-cell transcriptome analysis reveals TOX as a promoting factor for T cell exhaustion and a predictor for anti-PD-1 responses in human cancer. *Genome Med.* **12**, 22 (2020).
418. Wang, X. *et al.* TOX promotes the exhaustion of antitumor CD8+ T cells by preventing PD1 degradation in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **71**, 731–741 (2019).
419. Khan, O. *et al.* TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion. *Nature* **571**, 211–218 (2019).
420. Limagne, E. *et al.* Tim-3/galectin-9 pathway and mMDSC control primary and secondary resistances to PD-1 blockade in lung cancer patients. *Oncoimmunology* **8**, e1564505 (2019).
421. Yeon Yeon, S. *et al.* Immune checkpoint blockade resistance-related B2M hotspot mutations in microsatellite-unstable colorectal carcinoma. *Pathol. Res. Pract.* **215**, 209–214 (2019).
422. Sade-Feldman, M. *et al.* Resistance to checkpoint blockade therapy through inactivation of antigen presentation. *Nat. Commun.* **8**, 1136 (2017).

423. Bancroft, C. C. *et al.* Coexpression of proangiogenic factors IL-8 and VEGF by human head and neck squamous cell carcinoma involves coactivation by MEK-MAPK and IKK-NF-kappaB signal pathways. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **7**, 435–442 (2001).
424. Corte, C. M. D. *et al.* Effect of MEK inhibition on PD-L1 and MCH-1 expression and on cytokines production profile in NSCLC cells and in human lymphocytes. *Ann. Oncol.* **28**, v423 (2017).
425. Stutvoet, T. S. *et al.* MAPK pathway activity plays a key role in PD-L1 expression of lung adenocarcinoma cells. *J. Pathol.* **249**, 52–64 (2019).
426. Stahl, J. M. *et al.* Loss of PTEN Promotes Tumor Development in Malignant Melanoma. *Cancer Res.* **63**, 2881–2890 (2003).
427. Wu, H., Goel, V. & Haluska, F. G. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* **22**, 3113–3122 (2003).
428. Chen, L. & Guo, D. The functions of tumor suppressor PTEN in innate and adaptive immunity. *Cell. Mol. Immunol.* **14**, 581–589 (2017).
429. Lin, Z. *et al.* PTEN loss correlates with T cell exclusion across human cancers. *BMC Cancer* **21**, 429 (2021).
430. Xue, J. *et al.* Intrinsic  $\beta$ -catenin signaling suppresses CD8<sup>+</sup> T-cell infiltration in colorectal cancer. *Biomed. Pharmacother.* **115**, 108921 (2019).
431. Shen, J. *et al.* ARID1A deficiency promotes mutability and potentiates therapeutic antitumor immunity unleashed by immune checkpoint blockade. *Nat. Med.* **24**, 556–562 (2018).
432. Pan, D. *et al.* A major chromatin regulator determines resistance of tumor cells to T cell-mediated killing. *Science* **359**, 770–775 (2018).
433. Li, H. *et al.* Metabolomic adaptations and correlates of survival to immune checkpoint blockade. *Nat. Commun.* **10**, 4346 (2019).

434. Reinhardt, J. *et al.* MAPK Signaling and Inflammation Link Melanoma Phenotype Switching to Induction of CD73 during Immunotherapy. *Cancer Res.* **77**, 4697–4709 (2017).
435. Shin, D. S. *et al.* Primary Resistance to PD-1 Blockade Mediated by JAK1/2 Mutations. *Cancer Discov.* **7**, 188–201 (2017).
436. Jerby-Arnon, L. *et al.* A Cancer Cell Program Promotes T Cell Exclusion and Resistance to Checkpoint Blockade. *Cell* **175**, 984-997.e24 (2018).
437. Hugo, W. *et al.* Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* **165**, 35–44 (2016).
438. Schachter, J. *et al.* Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet Lond. Engl.* **390**, 1853–1862 (2017).
439. Schoenfeld, A. J. & Hellmann, M. D. Acquired Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Cell* **37**, 443–455 (2020).
440. Anagnostou, V. *et al.* Evolution of Neoantigen Landscape during Immune Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov.* **7**, 264–276 (2017).
441. Zaretsky, J. M. *et al.* Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1604958>  
<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1604958> (2016) doi:10.1056/NEJMoa1604958.
442. Gettinger, S. *et al.* Impaired HLA Class I Antigen Processing and Presentation as a Mechanism of Acquired Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Cancer. *Cancer Discov.* **7**, 1420–1435 (2017).
443. Torrejon, D. Y. *et al.* Overcoming genetically-based resistance mechanisms to PD-1 blockade. *Cancer Discov.* **10**, 1140–1157 (2020).

444. Oweida, A. *et al.* Resistance to Radiotherapy and PD-L1 Blockade Is Mediated by TIM-3 Upregulation and Regulatory T-Cell Infiltration. *Clin. Cancer Res.* **24**, 5368–5380 (2018).
445. Johnson, D. B. *et al.* Tumor-specific MHC-II expression drives a unique pattern of resistance to immunotherapy via LAG-3/FCRL6 engagement. *JCI Insight* **3**, 120360 (2018).
446. Kakavand, H. *et al.* Negative immune checkpoint regulation by VISTA: a mechanism of acquired resistance to anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma patients. *Mod. Pathol.* **30**, 1666–1676 (2017).
447. Reinhardt, J. *et al.* MAPK Signaling and Inflammation Link Melanoma Phenotype Switching to Induction of CD73 during Immunotherapy. *Cancer Res.* **77**, 4697–4709 (2017).
448. Ribas, A. *et al.* PD-1 Blockade Expands Intratumoral Memory T Cells. *Cancer Immunol. Res.* **4**, 194–203 (2016).
449. O'Donnell, J. S., Long, G. V., Scolyer, R. A., Teng, M. W. L. & Smyth, M. J. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition. *Cancer Treat. Rev.* **52**, 71–81 (2017).
450. Jenkins, R. W., Barbie, D. A. & Flaherty, K. T. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br. J. Cancer* **118**, 9–16 (2018).
451. Pauken, K. E. *et al.* Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science* **354**, 1160–1165 (2016).
452. Tang, J. *et al.* The clinical trial landscape for PD1/PDL1 immune checkpoint inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 854–855 (2018).
453. Amoozgar, Z. *et al.* Targeting Treg cells with GITR activation alleviates resistance to immunotherapy in murine glioblastomas. *Nat. Commun.* **12**, 2582 (2021).
454. Villarreal, D. O., Chin, D., Smith, M. A., Luistro, L. L. & Snyder, L. A. Combination GITR targeting/PD-1 blockade with vaccination drives robust antigen-specific antitumor immunity. *Oncotarget* **8**, 39117–39130 (2017).

455. Wang, M., Liu, Y., Cheng, Y., Wei, Y. & Wei, X. Immune checkpoint blockade and its combination therapy with small-molecule inhibitors for cancer treatment. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1871**, 199–224 (2019).
456. Pires, A., Burnell, S. & Gallimore, A. Exploiting ECM remodelling to promote immune-mediated tumour destruction. *Curr. Opin. Immunol.* **74**, 32–38 (2022).
457. Peng, D. H. *et al.* Collagen promotes anti-PD-1/PD-L1 resistance in cancer through LAIR1-dependent CD8+ T cell exhaustion. *Nat. Commun.* **11**, 4520 (2020).
458. Nicolas-Boluda, A. *et al.* Tumor stiffening reversion through collagen crosslinking inhibition improves T cell migration and anti-PD-1 treatment. *eLife* **10**, e58688 (2021).
459. Becerra, S. P. & Notario, V. The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 258–271 (2013).
460. Nwani, N. G. *et al.* Melanoma Cells Block PEDF Production in Fibroblasts to Induce the Tumor-Promoting Phenotype of Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Res.* **76**, 2265–2276 (2016).
461. Hong, H. *et al.* Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits breast cancer metastasis by down-regulating fibronectin. *Breast Cancer Res. Treat.* **148**, 61–72 (2014).
462. Hou, J. *et al.* Pigment epithelium-derived factor promotes tumor metastasis through an interaction with laminin receptor in hepatocellular carcinomas. *Cell Death Dis.* **8**, e2969–e2969 (2017).
463. Yin, J. *et al.* Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) Expression Induced by EGFRVIII Promotes Self-renewal and Tumor Progression of Glioma Stem Cells. *PLoS Biol.* **13**, e1002152 (2015).
464. Carnagarin, R., Dharmarajan, A. M. & Dass, C. R. PEDF-induced alteration of metabolism leading to insulin resistance. *Mol. Cell. Endocrinol.* **401**, 98–104 (2015).

465. Chen, Z. *et al.* Upregulation of PEDF Predicts a Poor Prognosis and Promotes Esophageal Squamous Cell Carcinoma Progression by Modulating the MAPK/ERK Signaling Pathway. *Front. Oncol.* **0**, (2021).
466. Li, C. *et al.* The contrary intracellular and extracellular functions of PEDF in HCC development. *Cell Death Dis.* **10**, (2019).
467. Huang, K.-T., Lin, C.-C., Tsai, M.-C., Chen, K.-D. & Chiu, K.-W. Pigment epithelium-derived factor in lipid metabolic disorders. *Biomed. J.* **41**, 102–108 (2018).
468. Dierge, E. *et al.* Peroxidation of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in the acidic tumor environment leads to ferroptosis-mediated anticancer effects. *Cell Metab.* **33**, 1701-1715.e5 (2021).
469. Pascual, G. *et al.* Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature* **541**, 41–45 (2017).
470. Ma, X. *et al.* CD36-mediated ferroptosis dampens intratumoral CD8+ T cell effector function and impairs their antitumor ability. *Cell Metab.* **33**, 1001-1012.e5 (2021).
471. Gaboriau-Routhiau, V. & Cerf-Bensussan, N. Microbiote intestinale et développement du système immunitaire. *médecine/sciences* **32**, 961–967 (2016).
472. Bain, C. C. *et al.* Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat. Immunol.* **15**, 929–937 (2014).
473. Champiat, S. *et al.* Hyperprogressive Disease Is a New Pattern of Progression in Cancer Patients Treated by Anti-PD-1/PD-L1. *Clin. Cancer Res.* **23**, 1920–1928 (2017).
474. Denis, M., Duruisseaux, M., Brevet, M. & Dumontet, C. How Can Immune Checkpoint Inhibitors Cause Hyperprogression in Solid Tumors? *Front. Immunol.* **11**, 492 (2020).

475. Piotrowska, Z. *et al.* Landscape of Acquired Resistance to Osimertinib in EGFR-Mutant NSCLC and Clinical Validation of Combined EGFR and RET Inhibition with Osimertinib and BLU-667 for Acquired RET Fusion. *Cancer Discov.* **8**, 1529–1539 (2018).
476. Mok, T. S. *et al.* Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in EGFR T790M–Positive Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **376**, 629–640 (2017).
477. Schoenfeld, A. J. *et al.* Tumor Analyses Reveal Squamous Transformation and Off-Target Alterations As Early Resistance Mechanisms to First-line Osimertinib in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **26**, 2654–2663 (2020).
478. Mestas, J. & Hughes, C. C. W. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J. Immunol.* **172**, 2731–2738 (2004).
479. Devaud, C. *et al.* Foxp3 expression in macrophages associated with RENCA tumors in mice. *PloS One* **9**, e108670 (2014).
480. Devaud, C., Darcy, P. K. & Kershaw, M. H. Foxp3 expression in T regulatory cells and other cell lineages. *Cancer Immunol. Immunother.* **63**, 869–876 (2014).
481. Taylor, M. A. *et al.* Longitudinal immune characterization of syngeneic tumor models to enable model selection for immune oncology drug discovery. *J. Immunother. Cancer* **7**, 328 (2019).
482. Yu, J. *et al.* RhoGDI SUMOylation at Lys-138 Increases Its Binding Activity to Rho GTPase and Its Inhibiting Cancer Cell Motility\*. *J. Biol. Chem.* **287**, 13752–13760 (2012).
483. Vu, H. L., Rosenbaum, S., Purwin, T. J., Davies, M. A. & Aplin, A. E. RAC1 P29S regulates PD-L1 expression in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **28**, 590–598 (2015).
484. Marques, C. A. *et al.* An immune escape screen reveals Cdc42 as regulator of cancer susceptibility to lymphocyte-mediated tumor suppression. *Blood* **111**, 1413–1419 (2008).
485. Li, Y. *et al.* Nucleo-cytoplasmic shuttling of PAK4 modulates  $\beta$ -catenin intracellular translocation and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 465–475 (2012).

486. Jin, R. *et al.* The metastasis suppressor NDRG1 modulates the phosphorylation and nuclear translocation of  $\beta$ -catenin through mechanisms involving FRAT1 and PAK4. *J. Cell Sci.* **127**, 3116–3130 (2014).
487. Zaretsky, J. M. *et al.* Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **375**, 819–829 (2016).
488. Cheli, Y. *et al.* ITGBL1 is a new immunomodulator that favors development of melanoma tumors by inhibiting natural killer cells cytotoxicity. *Mol. Cancer* **20**, 12 (2021).
489. Song, J., Yang, P. & Lu, J. Upregulation of ITGBL1 predicts poor prognosis and promotes chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Biomark.* **27**, 51–61 (2020).
490. Gettinger, S. N. *et al.* Clinical Features and Management of Acquired Resistance to PD-1 Axis Inhibitors in 26 Patients With Advanced Non–Small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **13**, 831–839 (2018).



# How Can Immune Checkpoint Inhibitors Cause Hyperprogression in Solid Tumors?

Morgane Denis<sup>1,2</sup>, Michael Duruisseaux<sup>1,3</sup>, Marie Brevet<sup>1,4</sup> and Charles Dumontet<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM 1052/CNRS 5286/UCBL - Cancer Research Center of Lyon, Anticancer Antibodies Laboratory, Lyon, France, <sup>2</sup>Antineo, Lyon, France, <sup>3</sup>Respiratory Department, Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon Cancer Institute, Bron, France, <sup>4</sup>Institut de Pathologie Multisites des HCL - Site Est- Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Zlatko Trajanoski,  
Innsbruck Medical University, Austria

### Reviewed by:

Loredana Ruggeri,  
University of Perugia, Italy  
Manel Juan,  
Hospital Clinic de Barcelona, Spain  
Alfred Zippelius,  
University of Basel, Switzerland

### \*Correspondence:

Charles Dumontet  
charles.dumontet@chu-lyon.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Cancer Immunity and Immunotherapy,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 11 December 2019

**Accepted:** 03 March 2020

**Published:** 20 March 2020

### Citation:

Denis M, Duruisseaux M, Brevet M  
and Dumontet C (2020) How Can  
Immune Checkpoint Inhibitors Cause  
Hyperprogression in Solid Tumors?  
Front. Immunol. 11:492.  
doi: 10.3389/fimmu.2020.00492

Following the administration of immune checkpoint inhibitors, an unexpected pattern of response designated as hyperprogression may be observed in certain patients. This paradoxical response corresponds to an acceleration in tumor growth and a dramatic decrease of patient survival. The reported incidence rates of hyperprogressive disease are highly variable, ranging between 4 and 29%. In this review, we have performed a literature search on hyperprogressive disease, including both retrospective studies and case reports, and discuss potential predictive biomarkers as well as potential mechanisms associated with immune-checkpoint inhibitor associated hyperprogression.

**Keywords:** hyperprogressive disease, immune checkpoint inhibitors, tumor growth, predictive factors, solid tumor

## INTRODUCTION

Since approval by the Food and Drug Administration (FDA) in 2011 of the first antibody, ipilimumab, targeting an immune checkpoint inhibitors (ICI) (1), this class of inhibitors has rapidly developed to include a large variety of cancer indications. Currently approved agents contribute to the activation of anti-tumor cytotoxic T cells by abrogating the immune checkpoint signaling triggered by tumor cells or microenvironment. Monoclonal antibodies targeting CTLA-4 (ipilimumab), PD-1 (nivolumab, pembrolizumab), and PD-L1 (atezolizumab, avelumab, and durvalumab) are currently approved for the treatment of numerous cancers, however, significant responses to immunotherapy remain restricted to a minority of patients and certain tumor types. Unsuccessful treatment may be due to primary resistance or acquired resistance (2–5). In some cases, the disease develops faster than expected and in a more aggressive manner after immune checkpoint targeting immunotherapy. This phenomenon, designated as hyperprogressive disease (HPD), corresponds to a paradoxical boost in tumor growth under treatment and has been described in non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC), head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), urothelial bladder carcinoma, hepatocellular carcinoma, gastric cancer, and anorectal melanoma (6–14), with a rate ranging between 4 and 29%. There are currently few data explaining the occurrence of HPD or allowing clinicians to identify patients at risk of developing HPD. The aim of this review is to provide an update about HPD and potential mechanisms explaining how ICI can induce this phenomenon.

## IMMUNOTHERAPY PRESCRIPTION AND MONITORING

Immunotherapies targeting immune checkpoints are increasingly used in the relapse setting and are rapidly becoming a component of first-line therapies for melanoma, NSCLC, small cell lung cancer, advanced renal cell carcinoma, triple negative breast cancer, and Merkel cell carcinoma, sometimes in combination with chemotherapy and second line therapies for many tumor types (unresectable and metastatic melanoma, NSCLC, renal cell carcinoma, HNSCC, urothelial carcinoma, colorectal cancer, prostate cancer, and Hodgkin's lymphoma) with durable clinical benefits (15–25). This innovative approach is associated with immune-related adverse events (IRAE) which can be severe (grade 3 or 4) and involve a variety of tissues and organs (26, 27). Early detection of these IRAE as well as appropriate preventive and/or curative therapies have been a major preoccupation for clinicians administering ICIs to their patients.

Unfortunately, only 15–40% of patients benefit from ICIs although some patients will experience long-lasting responses. Melanoma is the only cancer type with a high response rate to single agent ICI therapy (around 40%). A majority of patients display innate resistance to ICI treatment. This may be due to a tumor intrinsic factor, such as loss of HLA expression, target antigen down-regulation or mutation of JAK1/2. Alternatively resistance may be due to extrinsic factors, including pro-tumoral cells such as Treg or myeloid derived suppressor cells present in the tumor microenvironment, or the upregulation of alternative immune checkpoints by effector T cells present in the tumor (2–4, 28).

Accordingly, a major challenge in the field of ICI is the identification of patients which have the greatest chance to benefit from these costly and potentially toxic therapies. A variety of biomarkers have been explored to determine which patients are most likely to respond to therapy (29, 30). PDL1 over-expression has been used as a criterion to prescribe ICIs in patients with NSCLC (18). Additional biomarkers are also considered to predict the responsiveness to treatments, such as FOXP1 methylation status in NSCLC patients or tumor mutation burden (TMB) (31, 32).

Conventional RECIST 1.1 criteria are not optimal to evaluate immunotherapy efficacy (26). Studies have demonstrated that RECIST1.1 criteria under-evaluated the response rate in a series of 160 patients with NSCLC treated by ICIs (33). In a cohort of 655 melanoma patients, RECIST criteria underestimated the benefit of pembrolizumab in 15% of patients (34). This is due in part to the fact that some patients will present pseudoprogression (cf. infra) and will not be considered as responders, at least in the early phases of evaluation of response. Importantly, conventional criteria are not adapted to distinguish patients with pseudoprogression from non-responders, while both categories require distinct patient management. New criteria, created especially for these treatments, such as irRC (immune related Response Criteria)

or iRECIST are better adapted to evaluate response to immunotherapy and to discriminate the pseudoprogression profile (26, 35).

## PSEUDOPROGRESSION

An apparent increase of tumor volume or tumor-associated symptoms has been described in various settings. "Tumor flare" has been described in hormonal therapy of metastatic breast carcinoma and does not require treatment interruption (36). In the case of cytotoxic agents, the concept of pseudoprogression was first described by Brandsma in brain tumors treated by temozolomide, and was defined as an increase of contrast-enhancement and/or edema on MRI without true tumor progression (37). While rarely observed with conventional cytotoxic agents, pseudoprogression is relatively frequent after ICI administration. For tumor types for which there is the largest follow-up after ICI-based therapies, namely melanoma and NSCLC, the pseudoprogression rates are 3.7–15.8 and 5%, respectively (38–41). This observation was highlighted in advanced NSCLC, Ferrara's study suggesting that pseudoprogression associated with immunotherapies involves a specific mechanism since no pseudoprogression case was observed in the chemotherapy cohort study (10).

Pseudoprogression is totally different from hyperprogression in terms of patient outcome. In the case of ICI therapy, pseudoprogression is defined as an initial increase of tumor size followed by a response to treatment, resulting from an exacerbated immune cell infiltration in the tumor bed, including CD103+ CD8+ cells (42). Pseudoprogression remains a rare response pattern as its average occurrence rate is only 10% in melanoma (11, 41, 43–45). Interestingly, Cohen et al. reported a case of brain metastasis pseudoprogression after pembrolizumab in a patient with melanoma, the histological evaluation having shown that lesions were not true progression but an inflammatory reaction. They identified isolated clusters of tumor cells surrounded by reactive astrocytosis and inflammatory cells (43).

Pseudoprogression has been associated with a high likelihood of 1 year survival when compared to authentic disease progression and partial response patterns, in 21 patients (46). Considering their favorable prognosis, it is important to identify these patients to avoid premature treatment interruption. Unfortunately, detecting pseudoprogessors from non-responders is challenging, and requires additional confirmation by imaging. To address this problem, iRECIST evaluation includes tumor size checkup 4 weeks after disease progression detection, in order to differentiate authentic progression from a pseudoprogression (26, 35).

## HYPERPROGRESSION

Hyperprogression, or hyperprogressive disease (HPD), is defined as an accelerated tumor growth after ICI with an increase in the absolute mass of tumor cells superior to what is expected in the

setting of conventional progression on treatment, as opposed to pseudoprogression. One of the first publications describing this process reported a patient cohort of 131 patients with various types of cancers from the Gustave Roussy cancer center, 12 of which (9%) were considered as hyperprogressors. In this series HPD was not associated with increased tumor burden at baseline nor with a specific tumor type but was more common in patients older than 65 (6). HPD was defined in this study as a two-fold increase in tumor growth rate after initiation of ICI therapy. Hyperprogression after ICI therapy has been described in multiple type of cancers, including lung, head and neck, anorectal, gastric, and hepatic tumors. Hyperprogression is thus not associated with a single type of cancer (6–14) (Table 1). Most of these patients were diagnosed using RECIST criteria, with the biases involved with this method. HPD was thus observed in 4–29% of cases suggesting that the rate of HPD depends on the type of cancer and is specific to each type of disease.

Since then, several studies have described HPD on homogeneous cohorts of patients. Ferrara et al. performed a comparative study of 406 patients receiving anti PD1 or anti PDL1 inhibitors for lung cancer, mainly in the relapse setting (93%). These authors found that HPD is more frequent in the cohort of patients treated with immunotherapy, when compared to chemotherapy (13.8 vs. 5.1%) (10). Gandara et al. analyzed 850 patients receiving docetaxel or atezolizumab for NSCLC and found a similar proportion of “fast progressors” in each arm (~10%), suggesting that hyperprogression may result from a very poor prognosis of patients, rather than being due to immunotherapy *per se*. In this study, the number of patients with > 50% growth within 6 weeks was higher in patients receiving anti-PD-L1 therapy (45%,  $n = 20/44$ ) than in those receiving chemotherapy (29%,  $n = 12/41$ ) (49).

In clinical practice defining an HPD remains extremely arduous since only retrospective studies have described this pattern and the acceleration of tumor growth associated with HPD is usually associated with a degradation of the performance status of the patient and death. Moreover, the definition of hyperprogression is not currently consensual. While most studies use the aforementioned definition of HPD, i.e., a tumor growth rate (TGR) twice greater post-treatment than before, other investigators suggest that the tumor growth kinetics (TGK) corresponding of the difference between pre (or post) baseline and baseline of the sum of the largest diameters of the target lesions per unit of time, or a score including multiple parameters such as time to treatment failure (TTF) or appearance of 2 or more new lesions should be used (50–53).

To sum up, HPD appears to be a distinct response pattern. However, it remains unclear whether it is a consequence of immunotherapy or not. HPD is likely to be caused by different mechanisms depending on the cancer type and the immune microenvironment. Thus, we can hypothesize that the nature of the immune microenvironment prior to therapy may play an important role in the occurrence of the HPD phenotype. It has been reported for example that the immune microenvironment is extremely different between lung and gastric cancers. An

important determinant of HPD could therefore be the cancer type and its specific microenvironment.

## FACTORS PREDICTIVE OF HYPERPROGRESSION

There are currently few available data regarding potential biomarkers predictive of an HPD phenotype. Kato and his team first reported the association between MDM2 family member amplification and EGFR aberrations and HPD in a first series of 155 patients, among which six with MDM2/MDM4 amplification demonstrated an HPD phenotype, while 2 out of 10 with EGFR alterations had an HPD phenotype (47). In a molecular profiling study of 102,878 patients, this same group identified the amplification of MDM2 in 3.5%, with large variations among tumor types (63.6% in liposarcoma and <1% in thyroid carcinoma and adenocarcinoma of colon and rectum). Interestingly most patients with MDM2 amplification had a low Tumor Mutational Burden (54).

Other factors have been suggested to constitute risk factors for HPD such as patient age. Champiat et al. observed a higher incidence of HPD in patients older than 65 in their series (6); Sasaki et al. reported that liver metastases, a good performance status and a large sum of target lesion diameters at baseline were associated with a greater risk of HPD (13). These authors also observed that an early increase of neutrophil counts and C reactive protein after initiation of ICIs was only observed in HPD patients. Currently available data for clinical and biological parameters are limited by the retrospective nature of the studies and/or the limited number of patients with an HPD phenotype. Jensen et al. have recently described a genome-wide sequencing of cell-free plasma DNA and suggest that the computed genome instability number (GIN) could help identify HPD, but this study also included a limited number of patients (55). Further prospective studies are needed to confirm these observations and to identify novel markers of HPD.

## HYPERPROGRESSION MECHANISMS

Several hypotheses have been advanced to explain the underlying mechanisms of hyperprogression. Since HPD is not only a lack of response but an actual acceleration of tumor growth under ICI therapy, it is likely that HPD results from the convergence of several factors including the characteristics of the tumor cells themselves, the status of the patient's immune system and the patient's current or prior therapeutic history.

In the majority of cases, patients received cytotoxic agents before initiation of immunotherapies. In preclinical models we have shown that conventional chemotherapy can in some cases reduce the antitumor activity of immunotherapy (56). We can hypothesize that following chemotherapy treatments, resistant clones were selected due to their ability to escape. It is therefore possible that chemotherapy-resistant clones which are undetectable by immune system are unleashed when ICIs are administrated instead. A better understanding of the possible

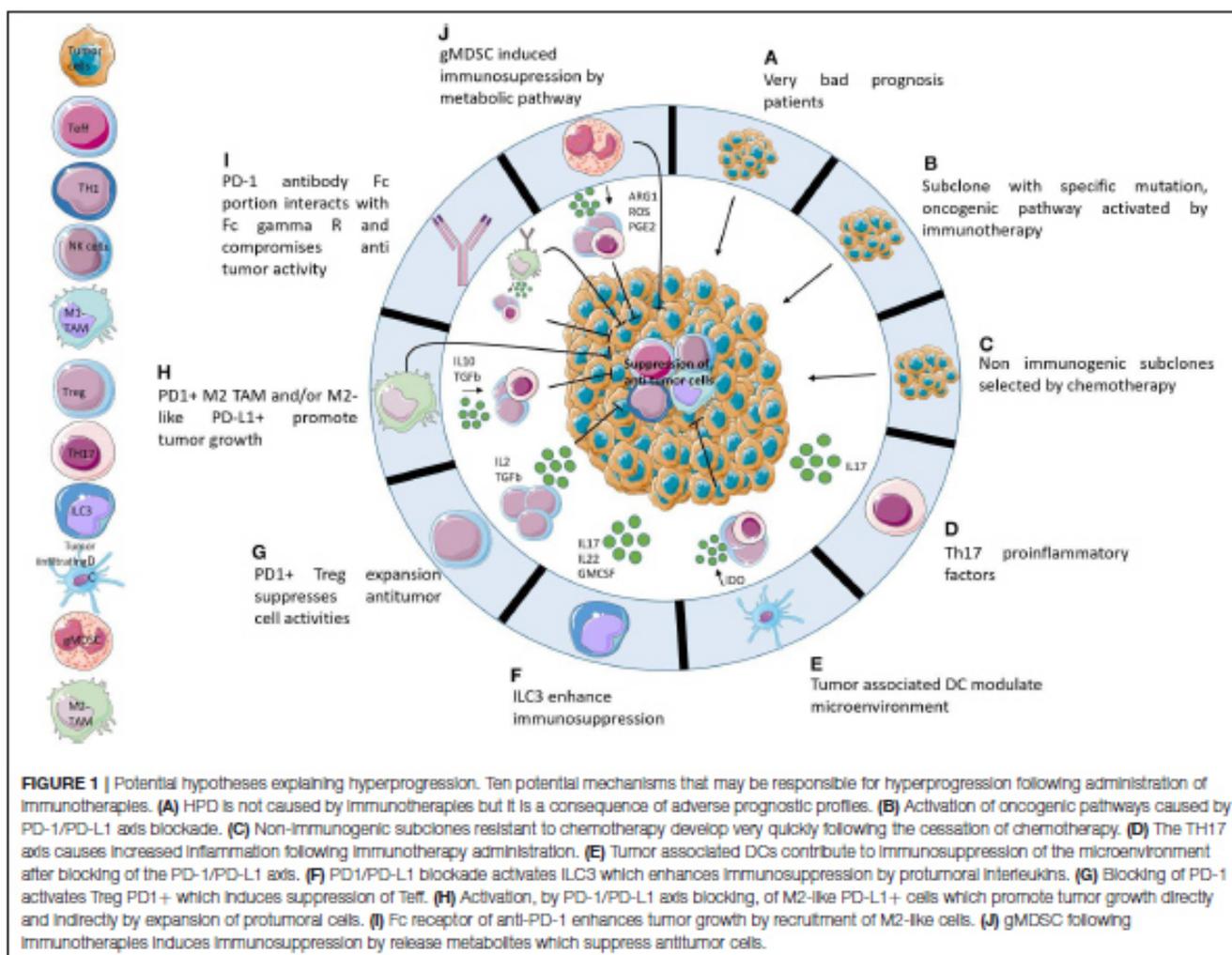
TABLE 1 | Studies reporting hyperprogressive disease patterns.

References	Cancer types	Immunotherapy	Previous therapies	RECIST1.1			Detection HPD		Rate HPD	Characteristic/explanation
				TGR	TGK	TTF	Survival HPD	Other burden		
Champliat et al. (6)	Multiple type of cancer (Melanoma, lung, renal, colorectal, urothelial, lymphoma, HCC)	PD-1/PD-L1 inhibitors	Chemotherapy/radiotherapy /targeted therapy/ immunotherapy	Yes	Yes	Median OS 4.6 months (p = 0.19)		9% (12/131)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Older age (p = 0.007)</li> </ul>	
Kato et al. (47)	Multiple type of cancer (Melanoma, NSCLC, SOCHN, CSCC, renal, colorectal)	PD-1/PD-L1/CTLA-4 inhibitors	Chemotherapy/radiotherapy /targeted therapy/ immunotherapy	Yes	Yes			4% (6/156)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MDM2/4 amplification (p = 0.007)</li> <li>• EGFR alteration (p = 0.006)</li> </ul>	
Saïda-Bouzdî et al. (7)	HNSCC	PD-1/PD-L1 inhibitors	ND	Yes	Yes	PFS 2.5 months (p = 0.003) RECIST 1.1 and 2.9 months (p = 0.02) IRECIST		29% (10/34)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presence of cervical nodes at diagnosis (ns)</li> <li>• Presence of regional recurrence (p = 0.008)</li> <li>• Hypothesis with a role of monocytes</li> </ul>	
Faure et al. (8)	Anorectal malignant melanoma	PD-1 inhibitors	Chemotherapy	Yes	Yes			Case report	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PET scanner imaging at baseline and after three cycles</li> <li>• Two metastatic sites before PD1/PDL1</li> <li>• Very early treatment discontinuation</li> </ul>	
Ferrara et al. (10)	NSCLC	PD-1/PD-L1 inhibitors	Chemotherapy/radiotherapy	Yes	Yes	Median OS 3.4 months (p = 0.03)		14% (56/406)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metastatic sites &gt; 2 (p = 0.006)</li> </ul>	
Boiland et al. (8)	Epithelial ovarian cancer	PD-1/PD-L1/CTLA-4/LAG3 inhibitors	ND	Yes	Yes			33.7% (30/89)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liver parenchymal metastases (p = 0.001)</li> <li>• Neutrophil to lymphocyte ratio &gt; 4 (p = 0.017)</li> <li>• Absolute neutrophil count increased (p = 0.002)</li> <li>• C-reactive protein increased (p = 0.006)</li> <li>• Hypothesis that previous radiotherapy treatment contributed to HPD</li> <li>• PS &gt; 2 at nivolumab initiation (p &lt; 0.0001)</li> </ul>	
Sasaki et al. (13)	Advanced Gastric cancer	PD-1 inhibitors	Chemotherapy/radiotherapy	Yes	Yes	Median OS 2.3 months (p < 0.001)		21% (13/62)		
Wong et al. (14)	Hepatocellular carcinoma	PD-1/CTLA-4 inhibitors	Chemotherapy/radiotherapy	Yes	Yes			Case report		
Costantini et al. (12)	NSCLC	PD-1 inhibitors	Radiotherapy	Yes	Yes	OS 1.4 months (p < 0.0001)		20% (57/292)		
Ji et al. (48)	Malignant tumors of digestive system	PD-1/PD-L1/CTLA-4 inhibitors	ND	Yes	Yes			20% (5/25)	ND	

antagonistic effects of conventional agents and immunotherapy will help apprehend this phenomenon. The lack of currently validated immunomonitoring tools does not allow a predictive evaluation of the patient's pretherapeutic status on the risk of developing HPD.

Alterations in tumor cells induced by ICIs may be involved in the HPD phenotype. We can hypothesize that PD-L1 binding in itself may in some cases cause tumor cell alterations leading to increased progression. Alternatively, some molecular characteristics of tumor cells may be associated with HPD. While JAK1/2 mutations have been shown to be associated with primary resistance to ICIs (4), it is possible that a particular mutation causes HPD, as suggested by Kato with the amplification of MDM2 or the EGFR mutation (47). Xiong et al. analyzed post-therapy HPD tumors and identified somatic mutations in various tumor suppressor genes such as TSC2 and VHL as well as upregulation of oncogenic pathways and reduced immunogenicity (57). An alternative intriguing hypothesis could be that the binding of PDL1 expressed by tumor cells could in itself in some cases enhance tumor cell proliferation.

The role of the immune system, both inside and outside the tumor microenvironment, as a mechanism of hyperprogression remains largely unexplained. Lead suspects are immune cells which favor tumor evasion and progression. Lo Russo et al. analyzed the immune infiltrate of HPD cases and analyzed the evolution of PDX from these patients reimplanted in mice then treated with nivolumab (53). These authors found that pretreatment lesions from all patients classified as HPD showed tumor infiltration by clustered epithelioid macrophages characterized by a CD163+CD33+PD-L1+ profile. Wang et al. showed that tumor-derived exosomes induce PD1+ macrophages which produce IL-10 and block CD8+T cells function (58). Xiong et al. found that innate lymphoid cells 3 (ILC3) are specifically upregulated in HPD tumors (57). Innate lymphoid cells respond to cytokine stimulation in the absence of a specific antigen. Dual roles are described for this particular cell type. ILC3 have been reported to secrete IL-17, IL-22, and GM-CSF, and thus can support cancer development (59). In a colon cancer mouse model it has been shown that depletion of IL-22 produced by ILC3 cells reduced the growth of gastro-intestinal



cancers (60). Irshad et al. reported a correlation between the presence of ILC3 cells in the tumor microenvironment and an increased risk of lymph node metastasis in breast cancer (61). Conversely Carrega et al. reported that natural cytotoxicity receptors were present in ILC3 cells and that these NCR+ILC3 cells contributed to the formation of tertiary lymphoid structures (TLS) which were associated with less advanced tumor stages in NSCLC patients (62). Therefore, the potential role of ILC3 in hyperprogression needs to be analyzed in depth.

Zuazo-Ibarra et al. analyzed circulating “highly differentiated human cells” ( $T_{HD}$ ) defined by a CD28-CD27-CD4+ phenotype, both at baseline and after therapy. They concluded that low baseline  $T_{HD}$  values identified non-responders and HPD patients, with a proliferative burst of this cell type under therapy (63). Kamada et al. analyzed the role of PD-1 regulatory T cells in gastric cancer patients and found that HPD patients underwent a marked increase in intratumoral proliferating Tregs (64). It is possible to imagine that if PD-1 regulatory T cells are present; these may be activated by ICI therapy. PD-1 regulatory T cells can proliferate and inhibit anti-tumor immune cells. This vicious circle would then allow an exacerbated tumor progression. This mechanism is called contra-suppression in immunoregulation (65, 66). This may suppose that other pro-tumoral cells are upregulated and amplify this phenomenon.

## CONCLUSION

There is a growing consensus that the HPD phenotype is a clinically meaningful entity describing patients whose evolution and prognosis is worse in case of ICI therapy. Additional studies are required to better understand the concept of hyperprogression and hopefully prevent it or identify patients at risk. Many hypotheses remain to be elucidated (Figure 1). To clarify the mechanism, extensive studies of the tumor and immune microenvironment should be performed. A study with pre- and post-treatment patient samples will help to decipher the underlying mechanisms and identify new biomarkers. However, the hyperprogression phenotype being rare, it will take very large cohorts of patients to first identify then validate these observations. Thus, *in vivo* murine models may be a good alternative to generate hypotheses, as some highly resistant syngeneic models mimic hyperprogression. Characterizing the immune and tumor microenvironment of syngeneic tumor mouse models may provide initial explanations of the mechanisms involved (53).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MDe wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

## REFERENCES

- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* (2010) 363:711–23. doi: 10.1056/NEJMoa1003466
- Koyama S, Akbay EA, Li YY, Herter-Sprie GS, Buczkowski KA, Richards WG, et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat Commun.* (2016) 7:10501. doi: 10.1038/ncomms10501
- Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell.* (2017) 168:707–23. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.017
- Shin DS, Zaretsky JM, Escuin-Ordinas H, Garcia-Diaz A, Hu-Lieskovan S, Kalbasi A, et al. Primary resistance to PD-1 blockade mediated by JAK1/2 Mutations. *Cancer Discov.* (2017) 7:188–201. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-1223
- Draghi A, Chamberlain CA, Furness A, Donia M. Acquired resistance to cancer immunotherapy. *Semin Immunopathol.* (2019) 41:31–40. doi: 10.1007/s00281-018-0692-y
- Champiat S, Derle L, Ammari S, Massard C, Hollebecque A, Postel-Vinay S, et al. Hyperprogressive disease is a new pattern of progression in cancer patients treated 0062y anti-PD-1/PD-L1. *Clin Cancer Res.* (2017) 23:1920–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1741
- Saïda-Bouziid E, Defaucheux C, Karabajakian A, Coloma VP, Servois V, Paoletti X, et al. Hyperprogression during anti-PD-1/PD-L1 therapy in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol.* (2017) 28:1605–11. doi: 10.1093/annonc/mdx178
- Boland JL, Zhou Q, Martin M, Callahan MK, Konner J, O'Ceirbhail RE, et al. Early disease progression and treatment discontinuation in patients with advanced ovarian cancer receiving immune checkpoint blockade. *Gynecol Oncol.* (2018) 152:251–8. doi: 10.1016/j.ygyno.2018.11.025
- Faure M, Rochigneux P, Olive D, Taix S, Brenot-Rossi I, Gilibert M. Hyperprogressive disease in anorectal melanoma treated by PD-1 inhibitors. *Front Immunol.* (2018) 9:797. doi: 10.3389/fimmu.2018.00797
- Ferrara R, Mezquita L, Texier M, Lahmar J, Audigier-Valette C, Tessonier L, et al. Hyperprogressive disease in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with PD-1/PD-L1 inhibitors or with single-agent chemotherapy. *JAMA Oncol.* (2018) 4:1543–52. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.3676
- Soria F, Beleni AI, D'Andrea D, Resch I, Gust KM, Gontero P, et al. Pseudoprogression and hyperprogression during immune checkpoint inhibitor therapy for urothelial and kidney cancer. *World J Urol.* (2018) 36:1703–9. doi: 10.1007/s00345-018-2264-0
- Costantini A, Fallet V, Corny J, Priard S, Chouaid C, Duchemann B, et al. Nivolumab-refractory patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* (2019) 130:128–34. doi: 10.1016/j.lungcan.2019.01.015
- Sasaki A, Nakamura Y, Mishima S, Kawazoe A, Kuboki Y, Bando H, et al. Predictive factors for hyperprogressive disease during nivolumab as anti-PD1 treatment in patients with advanced gastric cancer. *Gastric Cancer.* (2019) 22:793–802. doi: 10.1007/s10120-018-00922-8
- Wong DJ, Lee J, Choo SP, Thng CH, Henneidge T. Hyperprogressive disease in hepatocellular carcinoma with immune checkpoint inhibitor use: a case series. *Immunotherapy.* (2019) 11:167–75. doi: 10.2217/imt-2018-0126
- Barker CA, Postow MA, Khan SA, Beal K, Parhar PK, Yamada Y, et al. Concurrent radiotherapy and ipilimumab immunotherapy for patients with melanoma. *Cancer Immunol Res.* (2013) 1:92–8. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0082
- Kaufman HL, Kirkwood JM, Hodi FS, Agarwala S, Amatruda T, Bines SD, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumour immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma. *Nat Rev Clin Oncol.* (2013) 10:588–98. doi: 10.1038/nrclinonc.2013.153
- Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* (2015) 372:311–9. doi: 10.1056/NEJMoa1411087
- Socinski MA. Incorporating immunotherapy into the treatment of non-small cell lung cancer: practical guidance for the clinic. *Semin Oncol.* (2015) 42:S19–28. doi: 10.1053/j.seminoncol.2015.09.017

19. McNeel DG, Bander NH, Beer TM, Drake CG, Fong L, Harrelson S, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of prostate carcinoma. *J Immunother Cancer*. (2016) 4:92. doi: 10.1186/s40425-016-0198-x
20. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*. (2016) 387:1909–20. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00561-4
21. Bauman JE, Cohen E, Ferris RL, Adelstein DJ, Brizel DM, Ridge JA, et al. Immunotherapy of head and neck cancer: emerging clinical trials from a National Cancer Institute Head and Neck Cancer Steering Committee Planning Meeting. *Cancer*. (2017) 123:1259–71. doi: 10.1002/cncr.30449
22. Boland PM, Ma WW. Immunotherapy for colorectal cancer. *Cancers*. (2017) 9:50. doi: 10.3390/cancers9050050
23. Gupta S, Gill D, Poole A, Agarwal N. Systemic immunotherapy for urothelial cancer: current trends and future directions. *Cancers*. (2017) 9:E15. doi: 10.3390/cancers9020015
24. Cella D, Grönwald V, Escudier B, Hammers HJ, George S, Nathan P, et al. Patient-reported outcomes of patients with advanced renal cell carcinoma treated with nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib (CheckMate 214): a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. (2019) 20:297–310. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30778-2
25. Nizam A, Aragon-Ching JB. Frontline immunotherapy treatment with nivolumab and ipilimumab in metastatic renal cell cancer: a new standard of care. *Cancer Biol Ther*. (2019) 20:6–7. doi: 10.1080/15384047.2018.1507260
26. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S, Weber JS, Hamid O, Lebbé C, et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res*. (2009) 15:7412–20. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1624
27. Putanov I, Diab A, Abdallah K, Bingham CO, Brogdon C, Dadu R, et al. Managing toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: consensus recommendations from the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) Toxicity Management Working Group. *J Immunother Cancer*. (2017) 5:95. doi: 10.1186/s40425-017-0300-z
28. Pitt JM, Vétizou M, Daillère R, Roberti MP, Yamazaki T, Routy B, et al. Resistance mechanisms to immune-checkpoint blockade in cancer: tumor-intrinsic and -extrinsic factors. *Immunity*. (2016) 44:1255–69. doi: 10.1016/j.immuni.2016.06.001
29. Ascierto PA, Capone M, Urba WJ, Bifulco CB, Botti G, Lugli A, et al. The additional facet of immunoscore: immunoprofiling as a possible predictive tool for cancer treatment. *J Transl Med*. (2013) 11:54. doi: 10.1186/1479-5876-11-54
30. Blank CU, Haanen JB, Ribas A, Schumacher TN. The “cancer immunogram.” *Science*. (2016) 352:658–60. doi: 10.1126/science.aaf2834
31. Duruisseaux M, Martínez-Cardús A, Calleja-Cervantes ME, Moran S, Castro de Moura M, Davalos V, et al. Epigenetic prediction of response to anti-PD-1 treatment in non-small-cell lung cancer: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Respir Med*. (2018) 6:771–81. doi: 10.1016/S2213-2600(18)30284-4
32. Hellmann MD, Ciuleanu T-E, Pluzanski A, Lee JS, Otterson GA, Audigier-Valette C, et al. Nivolumab plus ipilimumab in lung cancer with a high tumor mutational burden. *N Engl J Med*. (2018) 378:2093–104. doi: 10.1056/NEJMoa1801946
33. Tazdait M, Mezquita L, Lahmar J, Ferrara R, Bidault F, Ammari S, et al. Patterns of responses in metastatic NSCLC during PD-1 or PDL-1 inhibitor therapy: comparison of RECIST 1.1, irRECIST and iRECIST criteria. *Eur J Cancer*. (2018) 88:38–47. doi: 10.1016/j.ejca.2017.10.017
34. Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, Weber JS, Daud A, Hamid O, et al. Evaluation of immune-related response criteria and RECIST v1.1 in patients with advanced melanoma treated with pembrolizumab. *J Clin Oncol*. (2016) 34:1510–7. doi: 10.1200/JCO.2015.64.0391
35. Seymour L, Bogaerts J, Perrone A, Ford R, Schwartz LH, Mandrekar S, et al. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *Lancet Oncol*. (2017) 18:e143–52. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30074-8
36. Vogel CL, Schoenfelder J, Sherman I, Hayes DF, Gams RA. Worsening bone scan in the evaluation of antitumor response during hormonal therapy of breast cancer. *J Clin Oncol*. (1995) 13:1123–8. doi: 10.1200/JCO.1995.13.5.1123
37. Brandsma D, van den Bent MJ. Pseudoprogression and pseudoresponse in the treatment of gliomas. *Curr Opin Neurol*. (2009) 22:633. doi: 10.1097/WCO.0b013e328332363e
38. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced non-squamous non-small cell lung cancer. *N Engl J Med*. (2015) 373:1627–39. doi: 10.1056/NEJMoa1507643
39. Ribas A, Wolchok JD, Robert C, Kefford R, Hamid O, Daud A, et al. P0116 Updated clinical efficacy of the anti-PD-1 monoclonal antibody pembrolizumab (MK-3475) in 411 patients with melanoma. *Eur J Cancer*. (2015) 51:e24. doi: 10.1016/j.ejca.2015.06.072
40. Nishino M, Giobbie-Hurder A, Manos MP, Bailey ND, Buchbinder EI, Ott PA, et al. Immune-related tumor response dynamics in melanoma patients treated with pembrolizumab: Identifying markers for clinical outcome and treatment decisions. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. (2017) 23:4671–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0114
41. Wang Q, Gao J, Wu X. Pseudoprogression and hyperprogression after checkpoint blockade. *Int Immunopharmacol*. (2018) 58:125–35. doi: 10.1016/j.intimp.2018.03.018
42. Rocha JV, Hardy-Werbin M, Naranjo D, Taus Á, Rodrigo M, Zuccarino F, et al. CD103+CD8+ lymphocytes characterize the immune infiltration in a case with pseudoprogression in squamous NSCLC. *J Thorac Oncol*. (2018) 13:e193–6. doi: 10.1016/j.jtho.2018.05.008
43. Cohen JV, Alomari AK, Vortmeyer AO, Jilaveanu LB, Goldberg SB, Mahajan A, et al. Melanoma brain metastasis pseudoprogression after pembrolizumab treatment. *Cancer Immunol Res*. (2016) 4:179–82. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0160
44. Hochmair MJ, Schwab S, Burghuber OC, Krenbek D, Prosch H. Symptomatic pseudo-progression followed by significant treatment response in two lung cancer patients treated with immunotherapy. *Lung Cancer*. (2017) 113:4–6. doi: 10.1016/j.lungcan.2017.08.020
45. Izumida T, Kawagishi Y, Tsuji H. Pseudoprogression in lung adenocarcinoma during treatment with nivolumab. *BMJ Case Rep*. (2017) 2017:bcr2017219919. doi: 10.1136/bcr-2017-219919
46. Kurra V, Sullivan RJ, Gainor JF, Hodi FS, Gandhi L, Sadow CA, et al. Pseudoprogression in cancer immunotherapy: rates, time course and patient outcomes. *J Clin Oncol*. (2016) 34:6580. doi: 10.1200/JCO.2016.34.15\_suppl.6580
47. Kato S, Goodman A, Walavalkar V, Barkauskas DA, Sharabi A, Kurtzrock R. Hyperprogressors after immunotherapy: analysis of genomic alterations associated with accelerated growth rate. *Clin Cancer Res*. (2017) 23:4242–50. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3133
48. Ji Z, Peng Z, Gong J, Zhang X, Li J, Lu M, et al. Hyperprogression after immunotherapy in patients with malignant tumors of digestive system. *BMC Cancer*. (2019) 19:705. doi: 10.1186/s12885-019-5921-9
49. Gandara DR, Reck M, Morris S, Cardona A, Mendus D, Ballinger M, et al. LBA1Fast progression in patients treated with a checkpoint inhibitor (cpi) vs chemotherapy in OAK, a phase III trial of atezolizumab (atezo) vs docetaxel (doc) in 2L+ NSCLC. *Ann Oncol*. (2018) 29:mdy511. doi: 10.1093/annonc/mdy511
50. Denaro N. Hyperprogression after immunotherapy in HNC: literature review and our experience. *Int J Radiat Radiat Oncol*. (2018) 1–2. doi: 10.17352/ijro.000026
51. Fuentes-Antrás J, Provencio M, Díaz-Rubio E. Hyperprogression as a distinct outcome after immunotherapy. *Cancer Treat Rev*. (2018) 70:16–21. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.07.006
52. Knoer DA, Ravetch JV. Immunotherapy and hyperprogression: unwanted outcomes, unclear mechanism. *Clin Cancer Res*. (2018) 25:904–6. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3144
53. Lo Russo G, Moro M, Sommariva M, Cancila V, Boeri M, Centonze G, et al. Antibody-Fc/FcR interaction on macrophages as a mechanism for hyperprogressive disease in non-small cell lung cancer subsequent to PD-1/PD-L1 blockade. *Clin Cancer Res*. (2018) 25:989–99. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1390
54. Kato S, Ross JS, Gay L, Dayyani F, Rostrik J, Subbiah V, et al. Analysis of MDM2 amplification: next-generation sequencing of patients with diverse malignancies. *JCO Precis Oncol*. (2018) 2018:00235. doi: 10.1200/PO.17.00235

55. Jensen TJ, Goodman AM, Kato S, Ellison CK, Daniels GA, Kim I, et al. Genome-wide sequencing of cell-free DNA identifies copy number alterations that can be used for monitoring response to immunotherapy in cancer patients. *Mol Cancer Ther.* (2018) 18:448–58. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-18-0535
56. Grasselli C, Denis M, Bourguignon A, Talhi N, Mathe D, Tourette A, et al. The antitumor activity of combinations of cytotoxic chemotherapy and immune checkpoint inhibitors is model-dependent. *Front Immunol.* (2018) 9:2100. doi: 10.3389/fimmu.2018.02100
57. Xiong D, Wang Y, Singavi AK, Mackinnon AC, George B, You M. Immunogenomic landscape contributes to hyperprogressive disease after Anti-PD-1 immunotherapy for cancer. *iScience.* (2018) 9:258–77. doi: 10.1016/j.isci.2018.10.021
58. Wang F, Li B, Wei Y, Zhao Y, Wang L, Zhang P, et al. Tumor-derived exosomes induce PD1+ macrophage population in human gastric cancer that promotes disease progression. *Oncogenesis.* (2018) 7:41. doi: 10.1038/s41389-018-0049-3
59. Fung KY, Nguyen PM, Putoczki T. The expanding role of innate lymphoid cells and their T-cell counterparts in gastrointestinal cancers. *Mol Immunol.* (2019) 110:48–56. doi: 10.1016/j.molimm.2017.11.013
60. Kirchberger S, Royston DJ, Boulard O, Thornton E, Franchini F, Stabady RL, et al. Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *J Exp Med.* (2013) 210:917–31. doi: 10.1084/jem.20122308
61. Irshad S, Flores-Borja F, Lawler K, Monypenny J, Evans R, Male V, et al. RORγt+ innate lymphoid cells promote lymph node metastasis of breast cancers. *Cancer Res.* (2017) 77:1083–96. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0598
62. Carrega P, Loiacono F, Di Carlo E, Scaramuccia A, Mora M, Conte R, et al. NCR+ILC3 concentrate in human lung cancer and associate with intratumoral lymphoid structures. *Nat Commun.* (2015) 6:8280. doi: 10.1038/ncomms9280
63. Zuazo-Ibarra M, Arasanz H, Fernandez-Hinojal G, Gato-Canas M, Hernandez-Marin B, Martinez-Aguillo M, et al. Highly differentiated CD4 T cells unequivocally identify primary resistance and risk of hyperprogression to PD-L1/PD-1 immune checkpoint blockade in lung cancer. *bioRxiv.* (2018) 320176. doi: 10.1101/320176
64. Kamada T, Togashi Y, Tay C, Ha D, Sasaki A, Nakamura Y, et al. PD-1+ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2019) 116:9999–10008. doi: 10.1073/pnas.1822001116
65. Gershon RK, Eardley DD, Durum S, Green DR, Shen FW, Yamauchi K, et al. Contrasuppression. A novel immunoregulatory activity. *J Exp Med.* (1981) 153:1533–46.
66. Lehner T. Special regulatory T cell review: the resurgence of the concept of contrasuppression in immunoregulation. *Immunology.* (2008) 123:40–4. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02780.x

**Conflict of Interest:** MDe is employed by the company Antineo. MDu reports personal fees for advisory board participation: Roche, Bristol-Myers Squibb, Takeda, Boehringer Ingelheim, Merck Sharp & Dohme, AstraZeneca, and AbbVie. Pfizer and grants for institutional research project: Nanostring, Blueprint, Boehringer Ingelheim.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Denis, Duruisseau, Brevet and Dumontet. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



# The Antitumor Activity of Combinations of Cytotoxic Chemotherapy and Immune Checkpoint Inhibitors Is Model-Dependent

Chloé Grasselly<sup>1,2</sup>, Morgane Denis<sup>1,2</sup>, Aurore Bourguignon<sup>1,2</sup>, Nolan Talhi<sup>2</sup>, Doriane Mathe<sup>2</sup>, Anne Tourette<sup>2</sup>, Laurent Serre<sup>3</sup>, Lars Petter Jordheim<sup>1</sup>, Eva Laure Matera<sup>1</sup> and Charles Dumontet<sup>1,4\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Giovanna Schiavoni,  
Istituto Superiore di Sanità (ISS), Italy

### Reviewed by:

Fabio Grizzi,  
Humanitas Research Hospital, Italy  
Benedetto Bruno,  
Università degli Studi di Torino, Italy  
Gabriele Multhoff,  
Technische Universität München,  
Germany

### \*Correspondence:

Charles Dumontet  
charles.dumontet@chu-lyon.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Cancer Immunity and Immunotherapy,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 22 May 2018

**Accepted:** 24 August 2018

**Published:** 09 October 2018

### Citation:

Grasselly C, Denis M, Bourguignon A, Talhi N, Mathe D, Tourette A, Serre L, Jordheim LP, Matera EL and Dumontet C (2018) The Antitumor Activity of Combinations of Cytotoxic Chemotherapy and Immune Checkpoint Inhibitors Is Model-Dependent.  
*Front. Immunol.* 9:2100.  
doi: 10.3389/fimmu.2018.02100

<sup>1</sup> Anticancer Antibodies, CRCL, INSERM U1052, CNRS UMR 5286, CLB, UCBL, Lyon, France, <sup>2</sup> ANTINEO, Lyon, France, <sup>3</sup> Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, France, <sup>4</sup> Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

In spite of impressive response rates in multiple cancer types, immune checkpoint inhibitors (ICIs) are active in only a minority of patients. Alternative strategies currently aim to combine immunotherapies with conventional agents such as cytotoxic chemotherapies. Here, we performed a study of PD-1 or PDL-1 blockade in combination with reference chemotherapies in four fully immunocompetent mouse models of cancer. We analyzed both the *in vivo* antitumor response, and the tumor immune infiltrate 4 days after the first treatment. *in vivo* tumor growth experiments revealed variable responsiveness to ICIs between models. We observed enhanced antitumor effects of the combination of immunotherapy with chemotherapy in the MC38 colon and MB49 bladder models, a lack of response in the 4T1 breast model, and an inhibition of ICIs activity in the MBT-2 bladder model. Flow cytometry analysis of tumor samples showed significant differences in all models between untreated and treated mice. At baseline, all the tumor models studied were predominantly infiltrated with cells harboring an immunosuppressive phenotype. Early alterations of the tumor immune infiltrate after treatment were found to be highly variable. We found that the balance between effector cells and immunosuppressive cells in the tumor microenvironment could be altered with some treatment combinations, but this effect was not always correlated with an impact on *in vivo* tumor growth. These results show that the combination of cytotoxic chemotherapy with ICIs may result in enhanced, similar or reduced antitumor activity, in a model- and regimen-dependent fashion. The present investigations should help to select appropriate combination regimens for ICIs.

**Keywords:** combination therapy, PD-1, PD-L1, chemotherapy, oncology, tumor microenvironment, preclinical mouse models

## INTRODUCTION

Immune checkpoint inhibitors (ICI), such as anti-PD-1 (Programmed cell death 1) or anti-PD-L1 (Programmed death-ligand 1) antibodies, are among the most important recent breakthroughs in oncology. As an example, monoclonal anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies (mAb) showed impressive efficacy in clinical trials for the treatment of unresectable or metastatic melanoma, metastatic non-small cell lung cancer, renal cancer, and more recently for urothelial carcinoma and Hodgkin's lymphoma (1–7). These monoclonal antibodies block the interaction between PD-1 (Programmed Death 1) molecule, expressed at the surface of T cells and other immune cells, and PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1), expressed in multiple types of cancer cells. The PD-1/PD-L1 axis induces an inhibitory signal in T cells, and PD-1/PD-L1 pathway blockade restores T cell function resulting in increased proliferation and cytotoxic activity, subsequently improving anti-tumor immune response (8).

Unfortunately, a non-negligible proportion of patients presents with innate resistance to PD-1/PD-L1 axis blockade, particularly because of lack of expression of PD-L1 by tumor cells or to the immunosuppressive effect of the tumor microenvironment. As a consequence some common cancer types have very low response rates, such as breast and prostate cancer (9, 10). More alarmingly, a significant subpopulation of patients treated with ICI who presented an initial response to therapy will develop acquired resistance, with disease progression after some period of time. Zaretsky et al. highlighted mutations in beta-2-microglobulin, resulting in reduced HLA class I surface expression, as a cause for acquired resistance to anti-PD-1 mAb therapy. In an additional study, they described mutations in JAK1 and JAK2, involving the interferon gamma pathway (10–12). Further hypotheses for this resistance phenotype include genetic alterations (mutations, deletions, epigenetic modifications) which can lead to altered expression of tumor neo-antigens (10). Expression of alternative checkpoints such as LAG-3, TIGIT, TIM-3, and ICOS in the tumor microenvironment may also play a key role regarding clinical outcomes and are currently being explored. Evidence of immune checkpoint expression modulation in association with acquired resistance to anti-PD-1 has been shown by Koyama et al., with an up-regulation of TIM-3 (13).

For this reason, it is crucial to develop new therapeutic approaches to enhance the therapeutic effects of PD-1/PD-L1 blockade, and to avoid resistance phenomena. To this end, efforts are currently engaged including the use of conventional chemotherapies to improve the anti-tumor activity of monoclonal antibodies. Some of these combination strategies are currently studied in various cancer types (14–20). One of the aims of combining chemotherapy with ICIs is to trigger antigen release via the cytotoxic cell death activity of chemotherapy leading to immune stimulation and improving the activity of PD-1 / PD-L1 blocking agents. Moreover, the impact of chemotherapies on the leucocyte composition of the tumor infiltrate might be crucial: as an example, cyclophosphamide has been described to decrease the proportion

of regulatory T cells (Treg) and gemcitabine has been outlined to reduce MDSC, two immunosuppressive cell populations usually associated with bad prognosis in cancer (21–23). Several clinical phase I trials combining ICI and chemotherapies are currently ongoing, in particular in NSCLC, with nivolumab in combination with associations of cisplatin and gemcitabine, cisplatin and pemetrexed, or carboplatin and paclitaxel, as well as pembrolizumab in combination with two different chemotherapies (15). Overall, the cytotoxic role of chemotherapy potentially drives immune activation, supporting the study of combinations between ICI and chemotherapies (20, 24, 25).

To explore the possible interaction between conventional regimens and ICIs, we evaluated four preclinical models in order to determine the impact on the *in vivo* efficacy of these combinations, and to analyse the consequences on the tumor microenvironment.

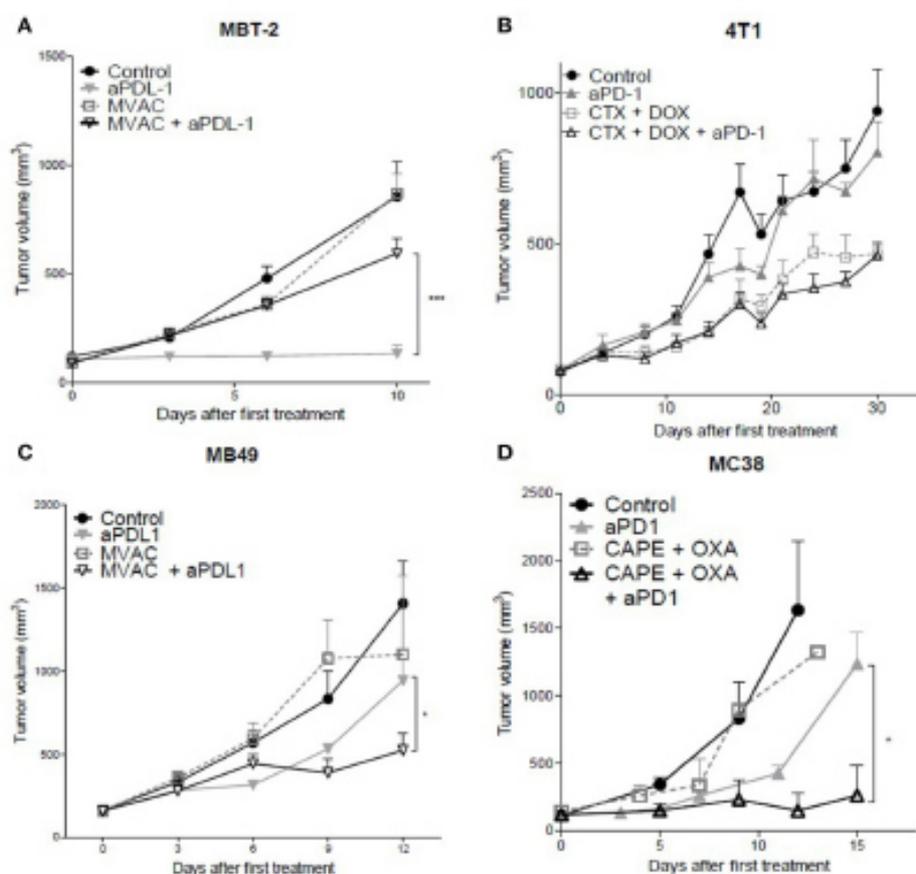
## RESULTS

### The Combination of Cytotoxic Chemotherapy Regimens With Anti-PD-1 or Anti-PD-L1 Antibodies Impacts Differently on Anti-Tumor Activity

We performed an exploratory study of various combination regimens of chemotherapies with immune checkpoint blockers anti-PD-1 and anti-PD-L1, in several murine syngeneic preclinical models. The chemotherapeutic regimens were chosen in order to be similar to those used in the chosen tumor types in patients: capecitabine and oxaliplatin for MC38 colon cancer, methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin (MVAC regimen) for MB49 and MBT-2 bladder cancers, and cyclophosphamide and doxorubicin for 4T1 breast cancer. These combination regimens were first evaluated at different dose levels chosen in order to induce acceptable toxicity (no impact on animal well-being and less than 10% loss of body weight). In some cases however these maximally tolerated chemotherapy regimens did not significantly impact on the tumor growth of established tumors in some models (MC38, MB49, and MBT-2).

The combination of the ICI with cytotoxic regimens proved to be more effective than either regimen used separately for the combination of capecitabine/oxaliplatin with anti-PD-1 Mab in the MC38 colorectal cancer model (Figure 1D) as well as with the combination of MVAC with anti-PD-L1 Mab in the MB49 bladder cancer (Figure 1C) while anti-PD-1 in combination with the MVAC regimen did not show any improved activity in the MB49 model (Figure S2B). In the 4T1 breast cancer model, the combination of cyclophosphamide/doxorubicin with anti-PD-1 or anti-PD-L1 Mabs did not show any increased anti-tumor effect (Figures 1B, S2A). Conversely, the combination of MVAC regimen with anti-PD-L1 in the MBT-2 bladder cancer model significantly reduced anti-tumor activity in comparison to single agent anti-PD-L1 (Figure 1A).

These results show that the combination of a cytotoxic regimen with an ICI may have different consequences, including enhanced activity, no impact of the combination, or a reduced anti-tumor activity. Remarkably the MVAC regimen had a



**FIGURE 1** | *In vivo* tumor growth in mice treated with ICI alone or in combination with chemotherapy. Anti-PD1 (clone RMP1.14) or anti-PDL1 (clone 10F.9G2) mAb (12.5 mg/kg, ip, q1wk) were administered in combination with (A,C) methotrexate (1 mg/kg, ip, q1wk), vincristine (0.1 mg/kg, ip, q1wk), doxorubicin (1 mg/kg, ip, q1wk) and cisplatin (1 mg/kg, ip, q1wk, MVAC) in SC bladder cancer MB49 and MBT-2, and with (B) cyclophosphamide (CTX, 100 mg/kg, ip, q1wk) and doxorubicin (DOX, 2 mg/kg, ip, q1wk) in SC metastatic breast cancer 4T1, and with (D) capecitabine (CAPE, 250 mg/kg, po 5 days a week) and oxaliplatin (OXA, 5 mg/kg, ip, q1wk) in SC colorectal cancer MC38. Data shown are mean tumor volumes + SEM.  $n = 5$  to 6 mice/group (A),  $n = 6$  mice/group (B),  $n = 6$  mice/group (C),  $n = 3$  to 6 mice/group (D). \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  using Student's *t*-test.

different impact when combined with anti-PD-L1 Mab in the MB49 bladder model and in the MBT2 bladder model, supporting an influence of the model on the sensitivity to combination regimens.

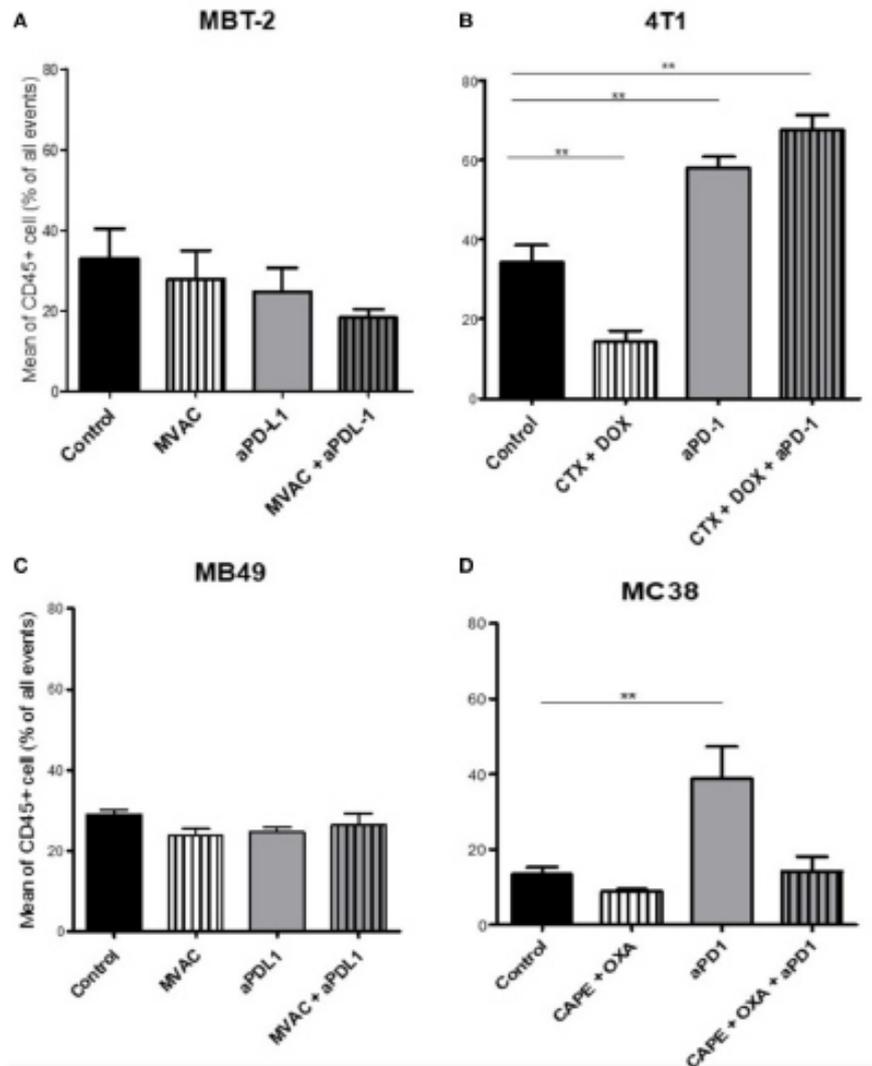
## Flow Cytometry Analysis of Tumor Immune Infiltrate Shows a Strong Model-Dependent Heterogeneity

We characterized the tumor immune infiltrate profiles by flow cytometry for each tumor type and for each treatment condition, 4 days after the first administration of treatment (Table S2, Figures S1, S3). This included total immune infiltrate (Figure 2), effector cells such as CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells, Type 1 macrophages (Figure 3) and activated CD8<sup>+</sup> T cells with TNF $\alpha$ + cells (Figure 4). Additionally, we quantified « pro-tumor » cells including Granulocytic and Monocytic Myeloid Derived Suppressor Cells (respectively G-MDSC and M-MDSC), Type 2 macrophages (Figure 3)

and T reg cells (Figure 5). The following results are expressed as the mean of the percentages of cells in each treatment group, normalized to total CD45<sup>+</sup> cells (except for total leukocyte infiltrate which is expressed as a percentage of all events, and for TNF $\alpha$ + cells which is presented as the percentage of CD8<sup>+</sup> T cells). Individual data are shown on Figure S5.

## Total Leukocyte Infiltrate

The baseline total leukocyte infiltrate, evaluated by CD45 labeling, was similar in three of the models from untreated mice with values of 36 % in 4T1, 33% in MBT2, 29% in MB49, but was lower in MC38 with a lower baseline level of 13 % (Figure 2). Among the chemotherapy regimens used only doxorubicin/cyclophosphamide induced a significant decrease of the total leukocyte infiltrate while MVAC and capecitabine/oxaliplatin had no significant impact. Anti-PD-1 therapy was associated with an increase of the total infiltrate in the MC38 and 4T1 models while anti-PD-L1 therapy had



**FIGURE 2 |** Total leukocyte infiltrate in tumors from mice treated with ICI alone or in combination with chemotherapy. Effect of chemotherapies, anti-PD1 or anti-PDL1 mAbs and their combination on total leukocyte infiltrate in various preclinical tumor models. Flow cytometry analysis of total CD45+ cells of MBT-2 tumors (A), 4T1 tumors (B), MB49 (C), and MC38 tumors (D). Mice were treated as in Figure 1. Data are shown as mean values + SEM.  $n = 5$  to 6 mice/group (A),  $n = 5$  to 6 mice/group (B),  $n = 6$  mice/group (C),  $n = 5$  mice/group (D). \*\* $p < 0.01$  using Mann-Whitney test.

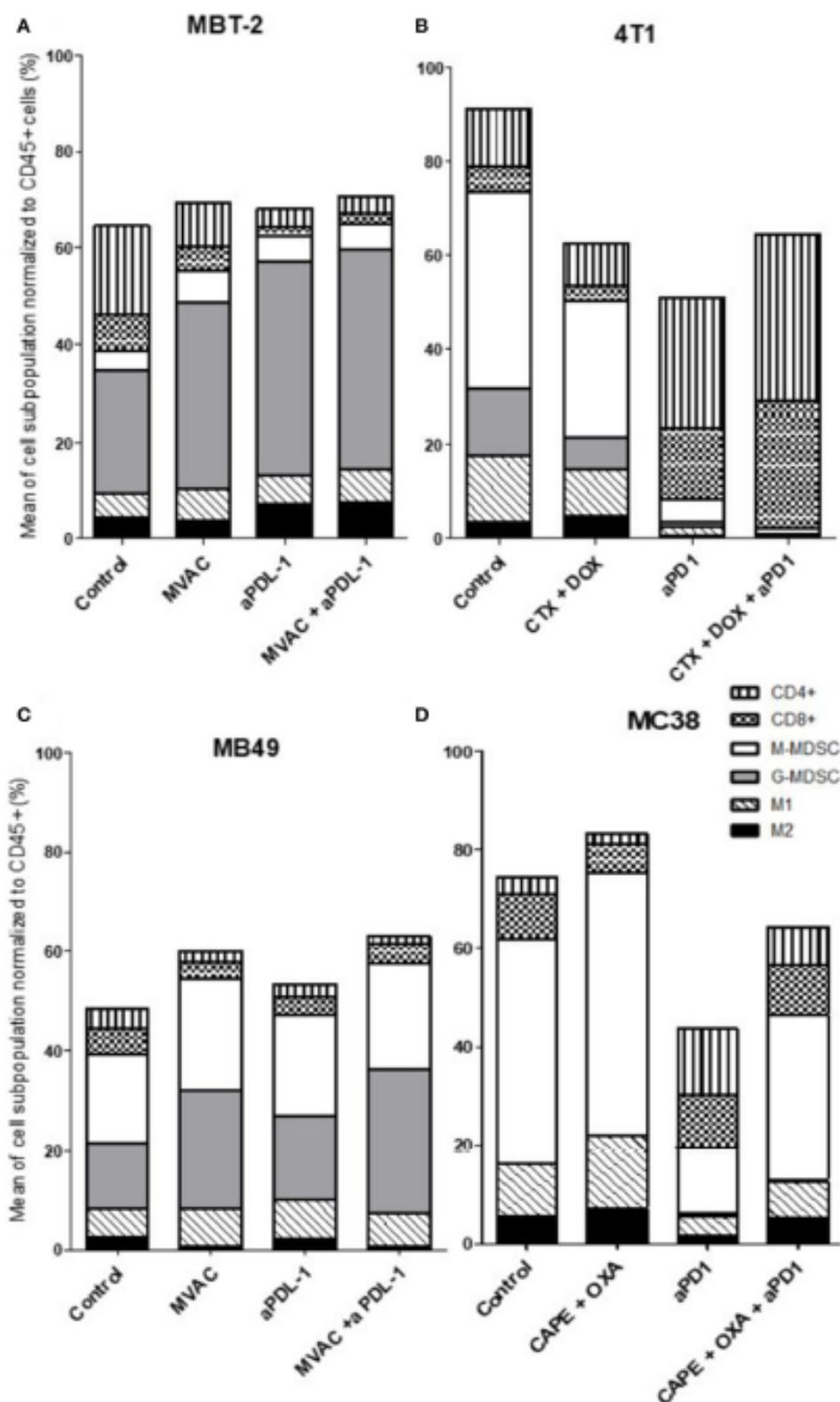
no impact. Furthermore this increase was impeded by the combination with capecitabine/oxaliplatin in the MC38 model but not by doxorubicin/cyclophosphamide in the 4T1 model.

### Immune Populations

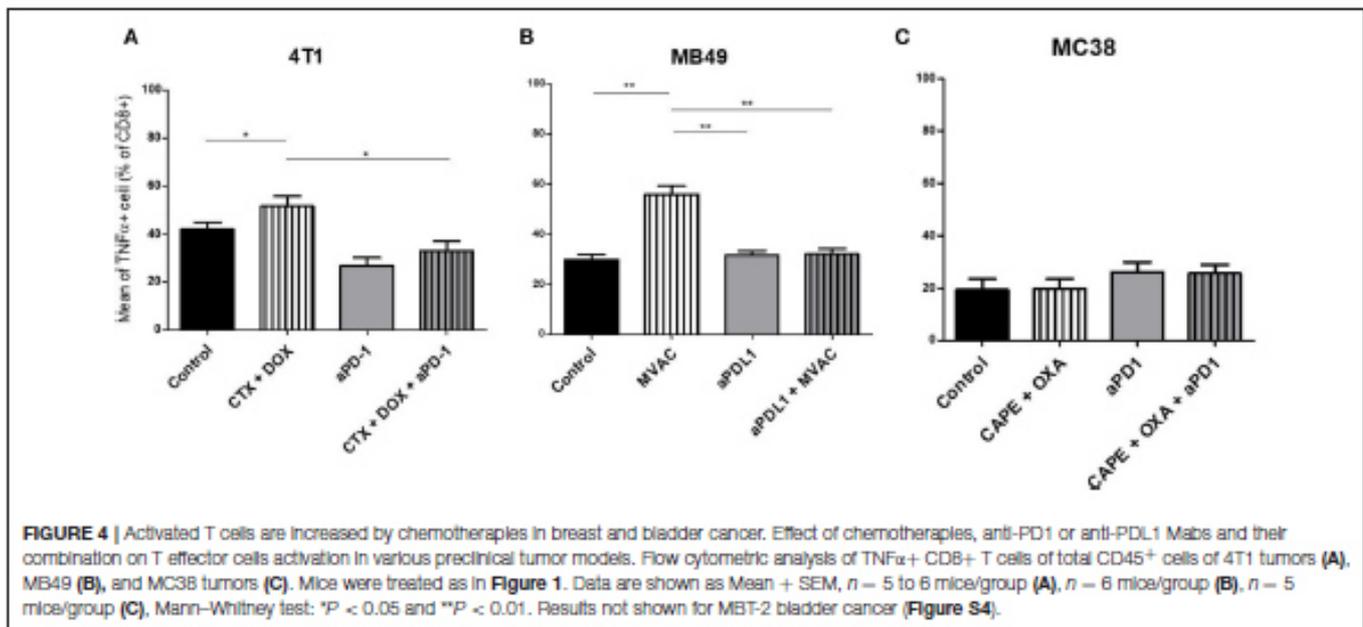
We observed baseline differences in the percentages of CD4 and CD8 infiltrates as well as in the percentages of M1 macrophages. MDSCs were abundant in all models studied but with some remarkable differences between models. G-MDSCs were abundant in MBT-2 tumors but absent in MC38 tumors. M-MDSCs were present in all tumors and represented almost half of the immune infiltrate in MC38 tumors, as previously described (Figure 3) (26). Macrophages were present at baseline

in all tumor types, representing 8 to 18% of all immune cells with a relative preponderance of M1 macrophages in comparison with M2 cells (ratios of 1.5 to 4 depending on tumor model).

Several alterations in immune populations were observed in response to a single administration of therapy. These include a decrease of the CD4+ and CD8+ T cell infiltrates with the different chemotherapy regimens used and a strong decrease of MDSCs after treatment with anti-PD-1 antibodies but not with anti-PD-L1 antibodies. T cell infiltrates were increased after exposure to chemotherapy + anti-PD-1, to a stronger extent in the 4T1 model than in the MC38 model. Conversely T cells tended to be quantitatively reduced in mice exposed to chemotherapy + anti-PD-L1. Macrophage infiltrates (both



**FIGURE 3** | All the preclinical models studied are predominantly infiltrated with cells considered as « immunosuppressive », particularly MDSCs. Effect of chemotherapies, anti-PD1 or anti-PDL1 Mabs and their combination on immune cells subpopulations in various preclinical tumor models. Flow analysis of immune cells subpopulations of total CD45<sup>+</sup> cells of MBT-2 tumors (A), 4T1 tumors (B), MB49 (C), and MC38 tumors (D). Mice were treated as in Figure 1. Data are shown as Mean of immune cells in each group normalized from total CD45<sup>+</sup> cells,  $n = 5$  to 6 mice/group (A),  $n = 5$  to 6 mice/group (B),  $n = 6$  mice/group (C),  $n = 5$  mice/group (D).



M1 and M2) were reduced after exposure to anti-PD-1 but not to anti-PD-L1 antibodies. The analysis of activated CD8 cells (Figure 4) found a significant difference in 4T1 and MB49 bearing mice exposed to chemotherapies, with an increase of the activated cells in these groups. Treg cells were found to be significantly altered in MB49 bearing mice after exposure to anti-PDL-1 + MVAC, and an increase in 4T1 bearing mice exposed to anti-PD-1 alone or in combination with chemotherapy was observed (Figure 5).

Overall our observations reveal strong differences between models in the relative proportions of immune cell populations at the basal level as well as in variations to therapy which appear to be both dependent on the model and on the treatment administered.

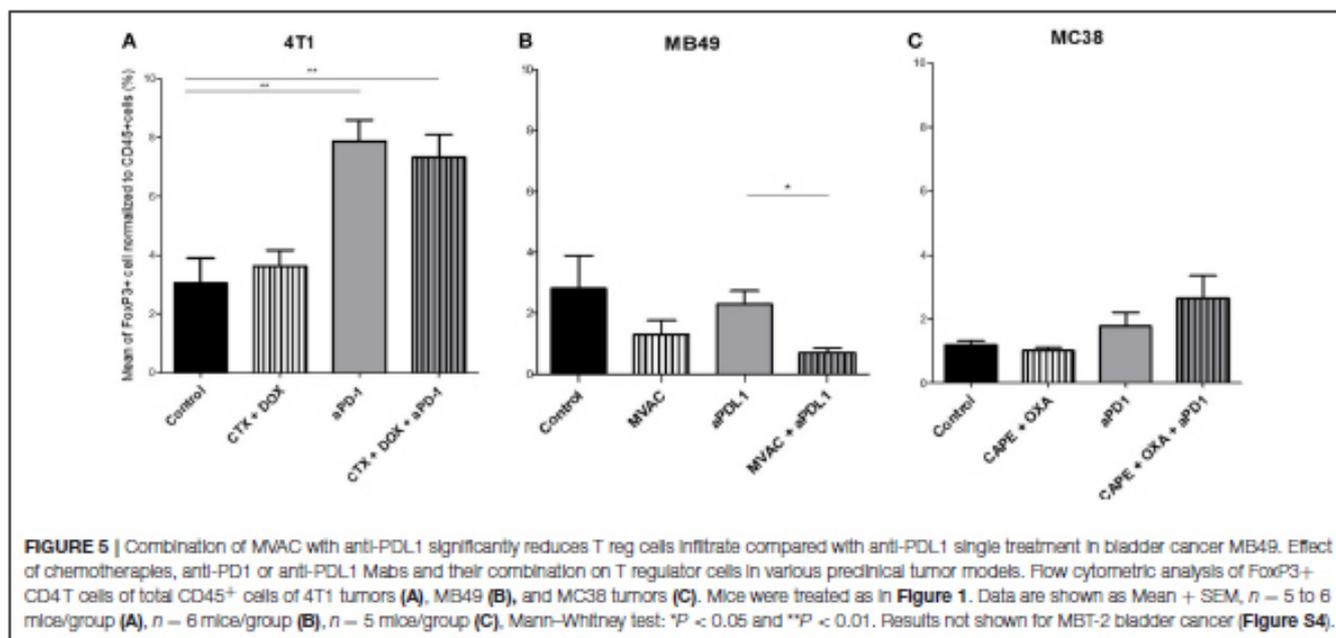
## Effect of Therapy on Immune Checkpoint Expression

In parallel to intra-tumor T cell and immunosuppressive cell quantifications, we used our mouse models of combination regimens to investigate the expression of T cell exhaustion markers such as the T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM-3), the Lymphocyte-activation gene 3 (LAG3) and the T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT). We also evaluated PD-1 expression on the T cell surface. In addition, we also looked at the T cell activation marker, Inducible T-cell costimulator (ICOS). Indeed, some studies already described upregulation of TIM-3 as a mechanism of adaptive resistance to anti-PD-1 therapy (27). Therefore, we sought to evaluate the impact of chemotherapies and combination of chemotherapies in addition to PD-1/PD-L1 axis disruption on alternative checkpoint expression. In this way, we analyzed these checkpoints in CD4+ and CD8+ T cells (Figures 6, 7), as well as their expression

on tumor cells (Figure 8). Individual data are shown in Figures S6–S8.

In the case of CD4+ T cells (Figure 6), we found a strong increase of TIGIT and ICOS expression in response to single agent anti-PD-1 antibody, with mitigation of this effect on ICOS by combination with capecitabine/oxaliplatin but not doxorubicin/cyclophosphamide. MVAC tended to decrease the expression of the other immune checkpoints on CD4 cells, with no mitigating effect of PD-L1 antibody. In the case of CD8+ T cells (Figure 7), TIGIT and ICOS were increased in response to anti-PD-1 antibody in the 4T1 model and to a lesser extent in the MC38 model. MVAC reduced immune checkpoint levels similarly to what was observed in CD4+ T cells. Anti-PD-L1 antibodies had no effect on CD8 cells in the MB49 model while tending to reduce immune checkpoint expression in the MBT2 model.

Regarding immune checkpoint expression on tumor cells (Figure 8), we did not observe a strong modulation of their expression with anti-PD-1, anti-PD-L1 or the combinations in most cases (Figure 8D). However, we noticed a remarkable decrease of TIGIT expression on tumor cells after exposure to the MVAC chemotherapy regimen in the MB49 model (Figures 8C, S8). Interestingly, we did not find a similar collapse after MVAC exposure in the MBT-2 model (Figure 8A). Expression of PD-L1 on tumor cells has been reported to be correlated with improved survival and response rate in the context of anti-PD-1 and anti-PD-L1 trials, and has been suggested as a predictive biomarker (28). In our models treatments did not modify PD-L1 expression in tumor cells except for the combination cyclophosphamide/doxorubicin + anti-PD-1 in the 4T1 model (Figure 8B). On the contrary, we observed an increase of PD-L1 expression on tumor cells when anti-PD-L1 monotherapy was used in the bladder cancer model MB49 (Figure 8C).



## DISCUSSION

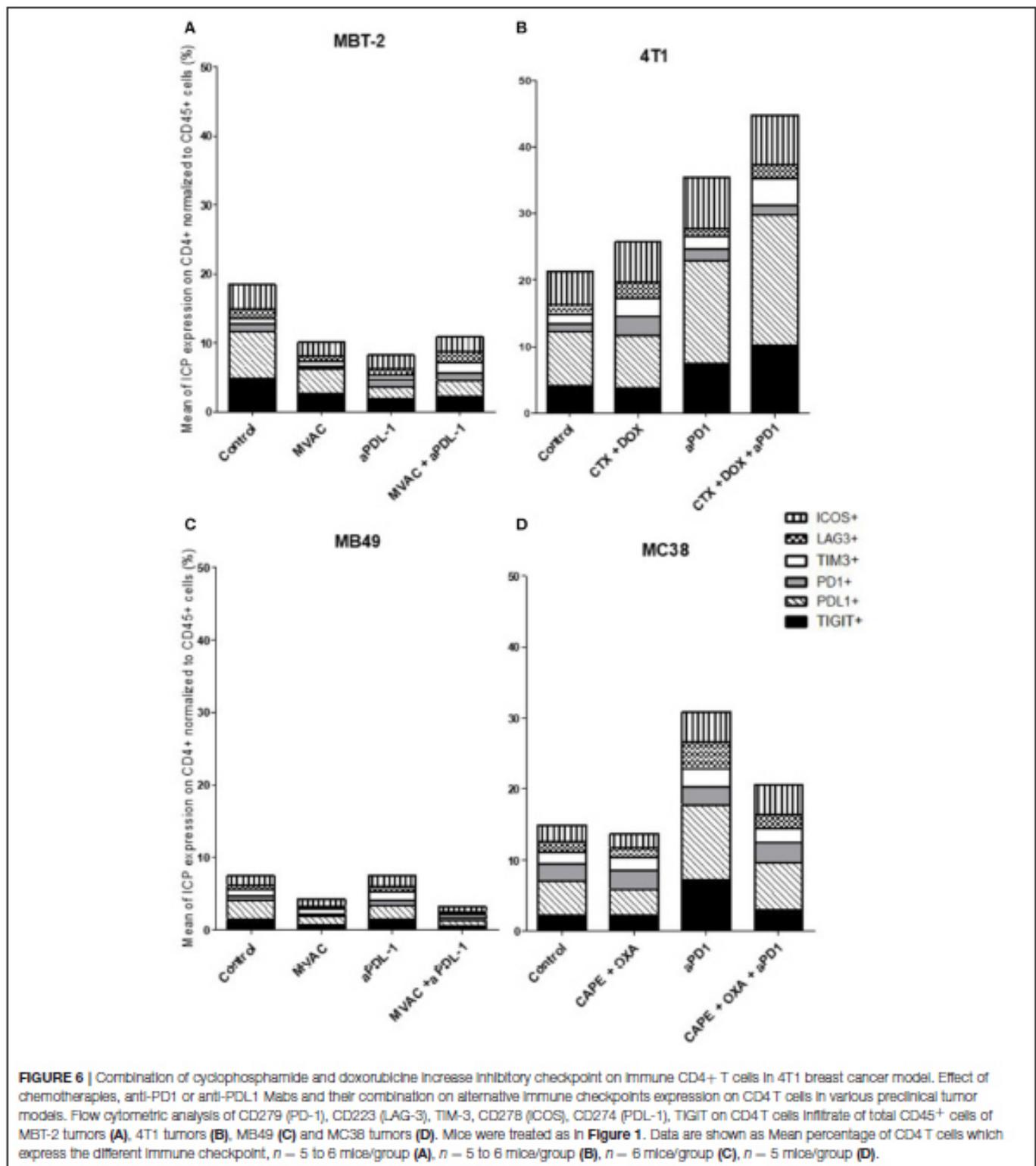
Immune checkpoint blockade is one of the most promising therapies for a wide range of cancer types. Approved therapies such as anti-PD-1 and anti-PD-L1 induce impressive responses in advanced disease and considerably improve survival in some patients. However, a non-negligible proportion of patients do not respond to these therapies. Consequently, there is an important need to find new therapeutic approaches to improve response rates. Combinations with standard regimens such as cytotoxic chemotherapy is a logical approach but raises a number of possible issues (29). As exemplified by our results combinations may have unexpected effects ranging from enhanced to reduced anti-tumor activity in comparison to single-agent therapies. We observed an improved anti-tumor activity of chemotherapies in combination with ICI in colorectal cancer and one bladder cancer model (MB49). However, in the context of a metastatic breast cancer model, chemotherapy in combination with anti-PD-1 did not show any anti-tumor efficacy. In the worst-case scenario, chemotherapy had a negative impact on tumor growth, such as we observed in another model of bladder cancer (MBT-2).

There are potentially several mechanisms through which chemotherapeutic regimens and ICIs could interact and modulate anti-tumor activity. While cytotoxic agents cause cell death by a direct effect on tumor cells, they are also likely to enhance tumor cell death indirectly by the process of immunogenic cell death, which might secondarily facilitate the anti-tumor activity of ICIs (30). As an example, cyclophosphamide (used in the 4T1 model) appears to induce tumor cell death in a preclinical model of lymphoma, and oxaliplatin increases tumor infiltration, notably by CD8+ T cells, in a preclinical prostate cancer (31, 32). Alternatively some

cytotoxic agents are known to be lymphotoxic, with potential deleterious effects when acting on anti-tumor T cells or beneficial effects when acting on pro-tumor T cells such as Tregs. It is likely that cytotoxic agents could act on other immune populations as well. Additionally cytotoxic agents have shown to prime tumor cells for granzyme-mediated death (33).

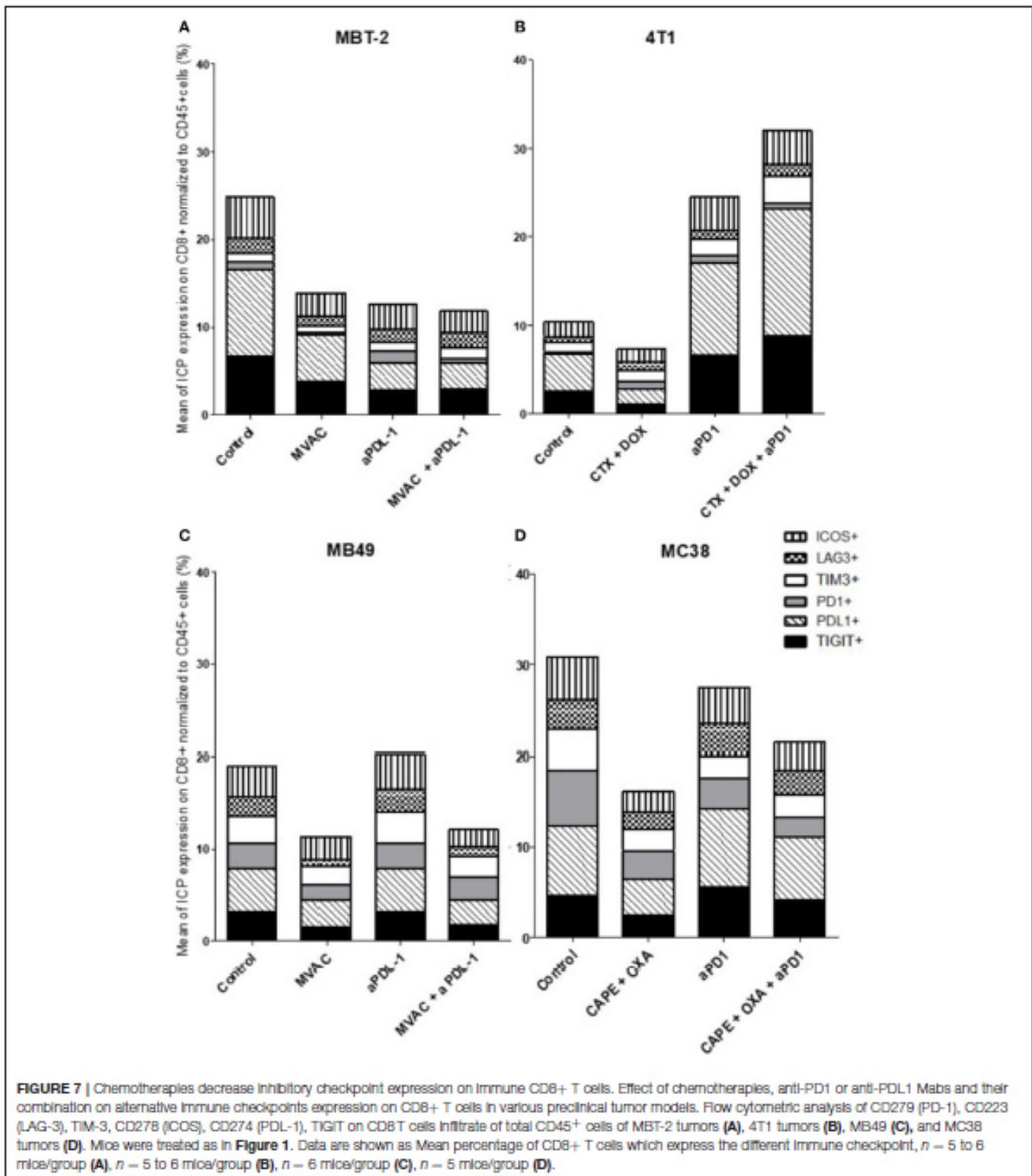
Two of our preclinical models showed enhanced activity of the combination of cytotoxic agents and ICIs, the capecitabine/oxaliplatin regimen combined with anti-PD-1 antibodies in the MC38 model and the MVAC regimen combined with anti-PD-L1 antibodies in the MB49 model. In the MC38 model basal immune cells infiltration was relatively low and was increased after treatment with anti-PD-1 antibodies but this effect was mitigated in the combination regimen. Additionally MC38 tumors had a strong content in M-MDSCs which was decreased by anti-PD-1 antibodies while the CD4+ and CD8+ T cell infiltrates were proportionally increased. In the MB49 model the most remarkable modification induced by the therapeutic combination was a modification in the proportion of MDSCs and an increase of the M1/M2 macrophages ratio from 2.5 to 9 in the combination group. Remarkably in the MC38 model, ICOS expression was increased and inhibitory checkpoint expression decreased on CD4 T cells by the combination of anti-PD-1 with capecitabine/oxaliplatin. In the MB49 model inhibitory checkpoints were decreased both on CD4+ and CD8+ T cells after exposure to the cytotoxic regimen alone and to the combination regimen. These results suggest that modulation of immune checkpoints on immune cells by cytotoxic agents could impact on the potency of ICIs when these are co-administered.

We observed no benefit of the combination in the 4T1 model exposed to doxorubicin/cyclophosphamide and anti-PD-1 antibodies and an antagonistic effect in the MBT2



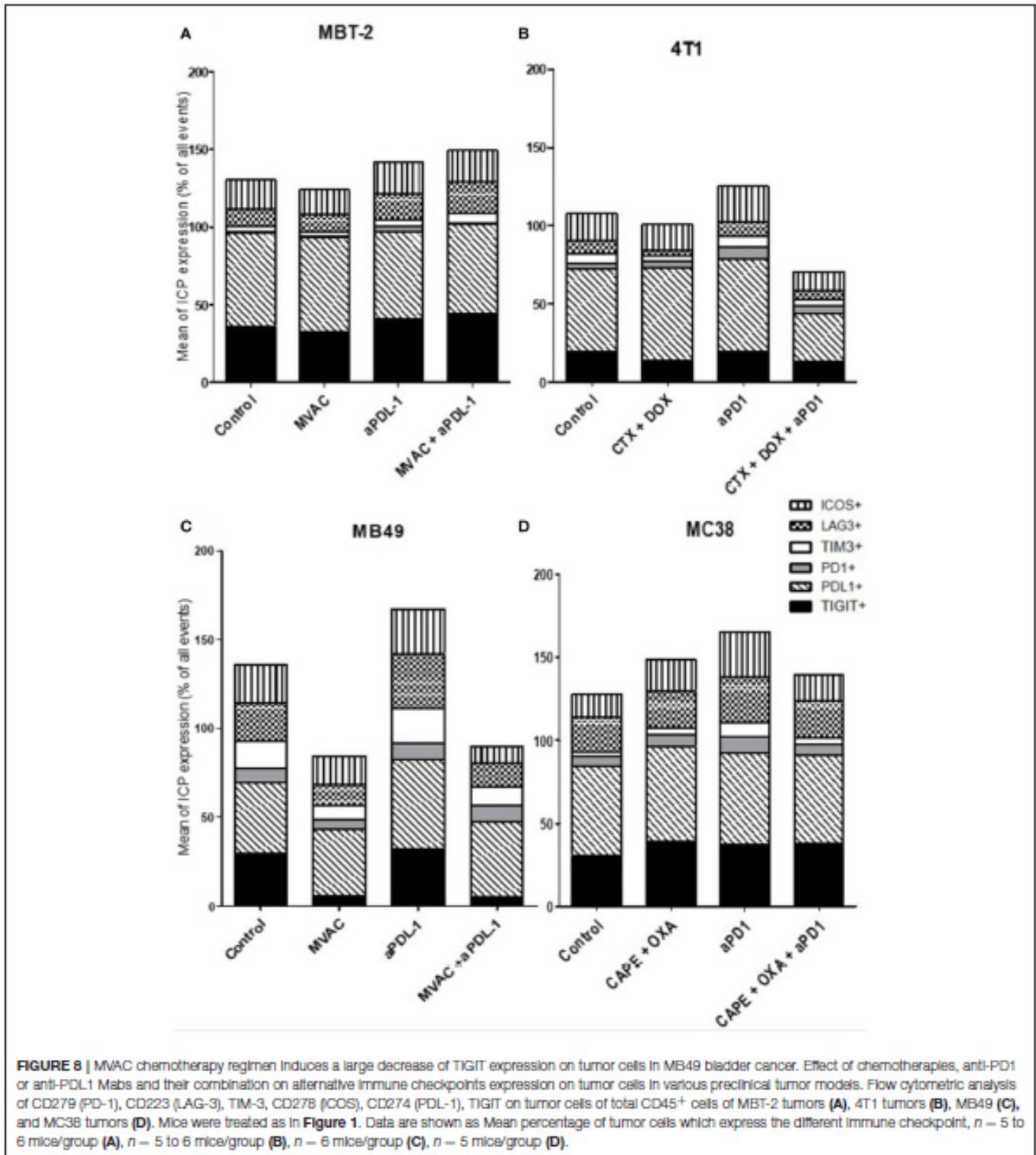
model exposed to MVAC and anti-PD-L1 antibodies. This result was unexpected in the 4T1 model as the combination profoundly modified the immune microenvironment with a strong decrease in MDSCs and a large increase in the CD4+

and CD8+ T cell infiltrates, including activated CD8+ T cells and increased Tregs. However it should be emphasized that under our treatment conditions 4T1 tumors were not sensitive to single agent anti-PD-1 suggesting that the immune alterations



observed were not sufficient to induce a response to these antibodies in the combination regimen. In the MBT2 model we also observed profound alterations in the microenvironment,

including a decrease in CD4+ and CD8+ T cells as well as a strong increase of G-MDSCs and M2 macrophages. As MBT2 was sensitive to anti-PD-L1 antibodies but not



to the MVAC regimen we hypothesize that in this case the cytotoxic agents were involved in the antagonistic effect observed. These results suggest that the same regimen, in this case MVAC, can have different consequences on the immune

microenvironment depending on the baseline situation in the tumor.

There are a number of limitations to our study. The four models studied were implanted in three different strains of mice

which may react differently at a systemic level to the therapeutic agents used. In spite of preliminary dose-ranging studies we were not always able to define a cytotoxic regimen which was active in certain models. Moreover, tumor models were established from tumor cells by subcutaneous injection, for homogeneity purpose. Variations between subcutaneous and orthotopic models has already been discussed in the literature (34, 35), and it seems to be relevant to test the combination of chemotherapies with ICIs on tumors grafted into their normal place of development.

It is important to note that different mice strains may have different immune status and thus may display different immune infiltrates in tumors. This aspect has already been shown by Sellers and al., with immune variations specific to the strain (36). However, the diversity of mice immune infiltration can also be considered to reflect the important heterogeneity observed in patients.

Additionally, immunophenotypic analyses were performed at a single time point (day 4 post-therapy) which did not allow us to compare kinetic modifications of the microenvironment in the tumor. Another key parameter is the therapeutic sequence of the cytotoxic agents and the immune checkpoint inhibitors. We chose to initiate both types of treatment simultaneously but it is likely that sequenced administration could lead to different results.

Overall our results emphasize the heterogeneity in the tumor microenvironment of syngeneic models and the diversity of response elicited by treatment combinations. While additional studies combining single agents with ICIs are required to better understand potential interactions, most ongoing clinical trials are evaluating the association of ICIs with combination chemotherapy regimens (Table S3). These trials will provide important data concerning both antitumor activity and auto-immune toxicity.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Culture

Murine colon cancer MC38 cells (Kerafast, USA) were cultured in DMEM medium with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and streptomycin. The murine metastatic breast cancer cell line 4T1 (ATCC, ATCC® CRL-2539™) and the murine bladder cancer cell lines MBT-2 and MB49 (kindly provided by Alain Bergeron, Laval University) were cultured with RPMI medium with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and streptomycin. Cells were incubated in humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

### Establishment and Measure of Syngeneic SC Tumors

MC38 cells and MB49 cells were injected in C57BL/6 mice (Janvier Lab), 4T1 cells were injected in BALB/c mice (Charles River Lab) and MBT-2 cells were injected in C3H mice (Charles River Lab). In all cases, suspensions of exponentially growing cancer cells diluted in 0.2 mL of PBS were injected subcutaneously into the right flank of mice (2.10<sup>6</sup> cells for MC38, MB49 and MBT-2 models, 1.10<sup>6</sup> cells for the 4T1 model). When

tumor volume reached 200 mm<sup>3</sup> for the MC38, MB49 and MBT-2 models, and 100 mm<sup>3</sup> for the 4T1 model, mice were randomized and the first treatment was administered ( $n = 8$  to 12 mice per group, either  $n = 3$  to 6 for tumor growth and  $n = 5$  to 6 for flow cytometry analysis). The tumor volume was measured every 3 days (length x width) with a caliper. The tumor volume was determined using the formula:  $4/3 \times \pi \times r^3$ . All mice were raised in SPF environment with free access to standard food and water. This study was approved by the Animal Ethics Committee of the University Claude Bernard of Lyon.

Four days after first administration of treatment, half of the mice in each group were sacrificed to analyze their tumor microenvironment by flow cytometry, while the other mice pursued treatment in order to determine sensitivity to therapy.

### Treatment

The combination regimen used for the MC38 colon adenocarcinoma mouse model was capecitabine (Actavis Group PTC ehf) administered per os 5 days a week at a dose of 250 mg/kg and oxaliplatin (Mylan), injected i.p. once a week at a dose of 5 mg/kg + anti-PD-1 (RMP1-14, BioXCell), injected i.p. once a week at a dose of 12.5 mg/kg. For the metastatic 4T1 breast cancer mouse model, the combination was cyclophosphamide (Baxter) injected i.p. once a week at a dose of 100 mg/kg + doxorubicin (Accord Healthcare) injected i.p. once a week at a dose of 2 mg/kg + anti-PD-1 (RMP1-14, BioXCell) or anti-PD-L1 (10F.9G2, BioXCell), injected i.p. once a week at a dose of 12.5 mg/kg. For bladder cancer mouse models, the MVAC regimen consisted in a combination of methotrexate (Mylan) injected i.p. once a week at a dose of 1 mg/kg + vinblastine (EG Labo) injected i.p. once a week at a dose of 0.1 mg/kg + doxorubicin (Accord Healthcare) injected i.p. once a week at a dose of 1 mg/kg + cisplatin (Mylan) injected i.p. once a week at a dose of 1 mg/kg + anti-PD-L1 (10F.9G2, BioXCell) injected i.p. once a week at a dose of 12.5 mg/kg and + anti-PD-1 (RMP1-14, BioXCell) injected i.p. once a week at a dose of 12.5 mg/kg for MB49 mouse model.

### Flow Cytometry

Flow cytometry was used to analyze the tumor immune microenvironment. All tumor tissue samples per groups were collected, dilacerated, counted and cells surface were stained with the following fluorescently conjugated antibodies: anti-CD45 (30F11, BD Biosciences), anti-CD4 (RM4-5, Miltenyi Biotec), anti-CD8 (53-6.7, Miltenyi Biotec), anti-CD161 (PK136, Miltenyi Biotec), anti-CD3 (REA606, Miltenyi Biotec), anti-CD68 (FA-11, Miltenyi Biotec), anti-CD206 (C068C2, BioLegend) anti-CD11b (REA592, Miltenyi Biotec), anti-Ly-6C (1G7.G10, Miltenyi Biotec), anti-Ly6G (REA526, Miltenyi Biotec), anti-PD-1 (HA2-7B1, Miltenyi Biotec), anti-LAG3 (C9B7W, Miltenyi Biotec), anti-TIM3 (REA602, Miltenyi Biotec), anti-ICOS (REA192, Miltenyi Biotec), anti-PD-L1 (10F.9G2, BioLegend), anti-TIGIT (REA536, Miltenyi Biotec), anti-TNF $\alpha$  (REA636, Miltenyi Biotec), anti-FoxP3 (3G3, Miltenyi Biotec). After surface staining, cells were fixed and permeabilized using BD Cytotfix/Cytoperm kit and then labeled with FoxP3 and TNF $\alpha$ . Flow cytometry data were acquired on the LSRII flow cytometer,

FlowJo software was used for analyses and GraphPad Prism software was used for statistical analysis (Unpaired t test). Isotype controls were from Miltenyi Biotec. Gating schemes are shown on Figures S4, S5.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

CG designed and performed the experiments, derived the models and analyzed the data. LS advised with methods and theory of experiments. MD, AB, EM, and NT assisted CG with experiments. MD and AB analyzed data. AT and DM conceived initial experiments in the lab. CG wrote the manuscript in consultation with CD, LJ, and CD supervised the project.

## FUNDING

This work was supported in part by the Lyric Grant INCa-DGOS-4664. CG was partially supported by a CIFRE grant from the French Ministry of Education, Research and Innovation.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Alain Bergeron and François Radvanyi for providing MB49 and MBT-2 cell lines.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02100/full#supplementary-material>

**Figure S1** | Experimental design of combination experiments.

**Figure S2** | Effect of anti-PD1 (clone RMP1.14) or anti-PDL1 (clone 10F.9G2) antibody, 12.5 mg/kg, i.p., q1wk, in combination with cyclophosphamide (CTX) 100 mg/kg, i.p., q1wk and doxorubicin (DOX) 2 mg/kg, i.p., q1wk in SC metastatic breast cancer 4T1 (A), methotrexate 1mg/kg, i.p., q1wk and vinblastine 0,1 mg/kg, i.p., q1wk and doxorubicin 1 mg/kg, i.p., q1wk and cisplatin 1 mg/kg i.p., q1wk (MVAC) in SC bladder cancer MB49 (B). Data are shown as Mean + SEM,  $n = 5$  to 6 (A),  $n = 6$  (B).

**Figure S3** | Example of gating strategy for immune cell infiltrate study. Example of flow cytometry analysis results: comparison between Control tumor and tumor treated with cyclophosphamide 100 mg/kg i.p. and doxorubicin 2 mg/kg i.p. and anti-PD1 12.5 mg/kg i.p. (CTX + DOX + PD1) in SC breast cancer 4T1.

## REFERENCES

- Kersten K, Salvagno C, de Visser KE. Exploiting the immunomodulatory properties of chemotherapeutic drugs to improve the success of cancer immunotherapy. *Front Immunol* (2015) 6:516. doi: 10.3389/fimmu.2015.00516
- Raedler LA. Opdivo (Nivolumab): second PD-1 inhibitor receives FDA approval for unresectable or metastatic melanoma. *Am Health Drug Benefits* (2015) 8:180–3.
- Kazandjian D, Sutzman DL, Blumenthal G, Mushti S, He K, Libeg M, et al. FDA approval summary: nivolumab for the treatment of metastatic non-small cell lung cancer with progression on or after platinum-based chemotherapy. *Oncologist* (2016) 21:634–42. doi: 10.1634/theoncologist.2015-0507
- Powles T, Eder JP, Fine GD, Braiteh FS, Loriot Y, Cruz C, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* (2014) 515:558–62. doi: 10.1038/nature13904
- Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* (2013) 369:122–33. doi: 10.1056/NEJMoa1302369
- Galanina N, Kline J, Bishop MR. Emerging role of checkpoint blockade therapy in lymphoma. *Ther Adv Hematol* (2017) 8:81–90. doi: 10.1177/2040620716673787
- Lee C-H, Motzer RJ. Immune checkpoint therapy in renal cell carcinoma. *Cancer J Sudbury Mass* (2016) 92–5. doi: 10.1097/PPC.0000000000000177
- Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* (2012) 12:252–64. doi: 10.1038/nr.c3239
- Shin D, Garcia-Diaz A, Zaretsky J, Escuin-Ordinas H, Hu-Lieskova S, Palaskas NJ, et al. Innate resistance of PD-1 blockade through loss

**Figure S4** | Effect of chemotherapies, anti-PDL1 Mab and their combination on T reg cells (A) and T effector cells activation (B) in MBT-2 preclinical tumor model. Flow cytometric analysis of TNF $\alpha$ + CD8+ T cells of total CD45+ cells (A), FoxP3+ CD4+ T cells of total CD45+ cells (B). Mice were treated as in Table S1. Data are shown as Mean + SEM,  $n = 5$  to 6, Mann-Whitney test: \* $P < 0.05$ .

**Figure S5** | Effect of chemotherapies, anti-PD1 or anti-PDL1 mAbs and their combination on leucocyte infiltrate subpopulations in MBT-2, 4T1, MB49, and MC38 preclinical tumor models. Flow cytometric analysis of total CD4+ T cells: CD45+CD3+CD4+ (A), CD8+ T cells CD45+ CD3+CD8+ (B), Granulocytic Myeloid Derived Suppressor Cells (G-MDSC): CD45+ CD3- CD11b+ Ly6G+ Ly6C- (C) Monocytic Myeloid Derived Suppressor Cells (M-MDSC): CD45+ CD3- CD11b+ Ly6G- Ly6C+ (D), M1 macrophages: CD45+ CD3- CD11b+ CD68+ CD206- (E), M2 macrophages: CD45+ CD3- CD11b+ CD68- CD206+ (F). Mice were treated as in Table S1. Data are shown as mean values+ SEM,  $n = 5$  to 6 mice/group (A),  $n = 5$  to 6 mice/group (B),  $n = 6$  mice/group (C),  $n = 5$  mice/group (D). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  using Mann-Whitney test.

**Figure S6** | Effect of chemotherapies, anti-PD1 or anti-PDL1 Mabs and their combination on alternative immune checkpoints expression on CD8+ T cells in MBT-2, 4T1, MB49 and MC38 preclinical tumor models. Flow cytometric analysis of CD278 (ICOS) (A), CD223 (LAG-3) (B), CD279 (PD-1) (C), CD274 (PDL-1) (D), TIGIT (E), and TIM-3 (F) on CD8+ T cells infiltrate of CD45+ cells. Mice were treated as in Table S1. Data are shown as mean values+ SEM,  $n = 5$  to 6 mice/group (A),  $n = 5$  to 6 mice/group (B),  $n = 6$  mice/group (C),  $n = 5$  mice/group (D).

**Figure S7** | Effect of chemotherapies, anti-PD1 or anti-PDL1 Mabs and their combination on alternative immune checkpoints expression on CD4+ T cells in MBT-2, 4T1, MB49, and MC38 preclinical tumor models. Flow cytometric analysis of CD278 (ICOS) (A), CD223 (LAG-3) (B), CD279 (PD-1) (C), CD274 (PDL-1) (D), TIGIT (E) and TIM-3 (F) on CD4+ T cells infiltrate of CD45+ cells. Mice were treated as in Table S1. Data are shown as mean values+ SEM,  $n = 5$  to 6 mice/group (A),  $n = 5$  to 6 mice/group (B),  $n = 6$  mice/group (C),  $n = 5$  mice/group (D). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  using Mann-Whitney test.

**Figure S8** | Effect of chemotherapies, anti-PD1 or anti-PDL1 Mabs and their combination on alternative immune checkpoints expression on tumor cells in MBT-2, 4T1, MB49 and MC38 preclinical tumor models. Flow cytometric analysis of CD278 (ICOS) (A), CD223 (LAG-3) (B), CD279 (PD-1) (C), CD274 (PDL-1) (D), TIGIT (E) and TIM-3 (F) on tumor cells infiltrate (CD45+ cells). Mice were treated as in Table S1. Data are shown as mean values+ SEM,  $n = 5$  to 6 mice/group (A),  $n = 5$  to 6 mice/group (B),  $n = 6$  mice/group (C),  $n = 5$  mice/group (D). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  using Mann-Whitney test.

**Table S1** | *In vivo* experiments design overview.

**Table S2** | Flow cytometry assay design overview.

**Table S3** | Current Phase I-II clinical trials using anti-PD-1 or anti-PDL-1 in breast, colorectal and bladder cancer (from [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), searched items "nivolumab" and "atezolizumab", 2018, ICI= Immune Checkpoint Inhibitor).

- of function mutations in JAK resulting in inability to express PD-L1 upon interferon exposure. *J Immunother Cancer* (2015) 3(Suppl. 2):P311. doi: 10.1186/2162-0240-3-S2-P311
10. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell* (2017) 168:707–23. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.017
  11. O'Donnell JS, Smyth MJ, Teng MWL. Acquired resistance to anti-PD1 therapy: checkmate to checkpoint blockade? *Genome Med*. (2016) 8:111. doi: 10.1186/s13073-016-0365-1
  12. Jesse M, Zaretsky BS, Garcia-Diaz A, Daniel S, Shin MD, Escuin-Ordinas H, et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *N Engl J Med*. (2016) 375:819–29. doi: 10.1056/NEJMoa1604958
  13. Koyama S, Akbay EA, Li YY, Herter-Sprie GS, Buczkowski KA, Richards WG, et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat Commun*. (2016) 7:10501. doi: 10.1038/ncomms10501
  14. Swart M, Verbrugge I, Beltman JB. Combination approaches with immune-checkpoint blockade in cancer therapy. *Front Oncol* (2016) 6:233. doi: 10.3389/fonc.2016.00233
  15. Harris SJ, Brown J, Lopez J, Yap TA. Immuno-oncology combinations: raising the tail of the survival curve. *Cancer Biol Med*. (2016) 13:171–93. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0015
  16. Bendell JC, Powderly JD, Lieu CH, Eckhardt SG, Hurwitz H, Hochster HS, et al. Safety and efficacy of MPDL3280A (anti-PDL1) in combination with bevacizumab (bev) and/or FOLFOLX in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol*. (2017) 33:704. doi: 10.1200/jco.2015.33.3\_suppl.704
  17. Amin A, Plimack ER, Infante JR, Ernstoff MS, Rini BI, McDermott DF, et al. Nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558, ONO-4538) in combination with sunitinib or pazopanib in patients (pts) with metastatic renal cell carcinoma (mRCC). *J Clin Oncol*. (2014) 32 (Suppl. 15):5010. doi: 10.1200/jco.2014.32.15\_suppl.5010
  18. Ribas A, Butler M, Lutzky J, Lawrence DP, Robert C, Miller, W, et al. Phase I study combining anti-PD-L1 (MED14736) with BRAF (dabrafenib) and/or MEK (trametinib) inhibitors in advanced melanoma. *J Clin Oncol*. (2017) 33 (Suppl. 5):3003. doi: 10.1200/jco.2015.33.15\_suppl.3003
  19. Antonia SJ, Brahmer JR, Gettinger S, Chow LQ, Jurgens R, Shepherd FA, et al. Nivolumab (Anti-PD-1; BMS-936558, ONO-4538) in combination with platinum-based doublet chemotherapy (PT-DC) in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): metastatic non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. (2014) 90:52. doi: 10.1016/j.ijrobp.2014.08.024
  20. Pfirschke C, Engblom C, Rickelt S, Cortez-Retamozo V, Garriss C, Pucci F, et al. Immunogenic chemotherapy sensitizes tumors to checkpoint blockade therapy. *Immunity* (2016) 44:343–54. doi: 10.1016/j.immuni.2015.11.024
  21. van der Most RG, Currie AJ, Mahendran S, Prosser A, Darabi A, Robinson BWS, et al. Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother CII*. (2009) 58:1219–28. doi: 10.1007/s00262-008-0628-9
  22. Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies reinstating immunosurveillance. *Immunity* (2013) 39:74–88. doi: 10.1016/j.immuni.2013.06.014
  23. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol*. (2011) 8:151–60. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.223
  24. Cui S. Immunogenic chemotherapy sensitizes renal cancer to immune checkpoint blockade therapy in preclinical models. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. (2017) 23:3360–6. doi: 10.12659/MSM.902426
  25. Dossat M, Vargas TR, Lagrange A, Boidot R, Végran F, Roussey A, et al. PD-1/PD-L1 pathway: an adaptive immune resistance mechanism to immunogenic chemotherapy in colorectal cancer. *Oncoimmunology* (2018) 7:e1433981. doi: 10.1080/2162402X.2018.1433981
  26. Mosely SIS, Prime JE, Sainson RCA, Koopmann J-O, Wang DYQ, Greenawalt DM, et al. Rational selection of syngeneic preclinical tumor models for immunotherapeutic drug discovery. *Cancer Immunol Res*. (2016) 5:29–41. doi: 10.1158/2326-6066.CCR-16-0114
  27. Shayan G, Srivastava R, Li J, Schmitt N, Kane LP, Ferris RL. Adaptive resistance to anti-PD1 therapy by Tim-3 upregulation is mediated by the PI3K-Akt pathway in head and neck cancer. *Oncoimmunology* (2017) 6:e1261779. doi: 10.1080/2162402X.2016.1261779
  28. Mino-Kenudson M. Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) expression by immunohistochemistry: could it be predictive and/or prognostic in non-small cell lung cancer? *Cancer Biol Med*. (2016) 13:157–70. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0009
  29. Wargo JA, Reuben A, Cooper ZA, Oh KS, Sullivan RJ. Immune effects of chemotherapy, radiation, and targeted therapy and opportunities for combination with immunotherapy. *Semin Oncol*. (2015) 42:601–16. doi: 10.1053/j.seminoncol.2015.05.007
  30. Kepp O, Pol J, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic stress and death of cancer cells in natural and therapy-induced immunosurveillance. In: *Oncoimmunology*. Springer (2018). p. 215–29. Available online at: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-62431-0\\_12](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-62431-0_12)
  31. Gotwals P, Cameron S, Cipolletta D, Cremasco V, Crystal A, Hewes B, et al. Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. *Nat Rev Cancer* (2017) 17:286–301. doi: 10.1038/nrc.2017.17
  32. Fournier C, Rivera Vargas T, Martin T, Melis A, Apetoh L. Immunotherapeutic properties of chemotherapy. *Curr Opin Pharmacol*. (2017) 35:83–8. doi: 10.1016/j.coph.2017.05.003
  33. Ramakrishnan R, Assudani D, Nagaraj S, Hunter T, Cho H-I, Antonia S, et al. Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *J Clin Invest*. (2010) 120:1111–24. doi: 10.1172/JCI40269
  34. Shaw TJ, Senterman MK, Dawson K, Crane CA, Vanderhyden BC. Characterization of intraperitoneal, orthotopic, and metastatic xenograft models of human ovarian cancer. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. (2004) 10:1032–42. doi: 10.1016/j.jymthe.2004.08.013
  35. Du Q, Jiang L, Wang X-Q, Pan W, She F-F, Chen Y-L. Establishment of and comparison between orthotopic xenograft and subcutaneous xenograft models of gallbladder carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. (2014) 15:3747–52. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.8.3747
  36. Sellers RS, Clifford CB, Treuting PM, Brayton C. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. *Vet Pathol*. (2012) 49:32–43. doi: 10.1177/0300985811429314

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Grasselly, Denis, Bourguignon, Talhi, Mathe, Tourette, Serre, Jordeheim, Matera and Dumontet. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.