



HAL
open science

Bloquer le TNF en combinaison avec les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire pour traiter le mélanome avancé

Mathieu Virazels

► To cite this version:

Mathieu Virazels. Bloquer le TNF en combinaison avec les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire pour traiter le mélanome avancé. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30264 . tel-04762926

HAL Id: tel-04762926

<https://theses.hal.science/tel-04762926v1>

Submitted on 1 Nov 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.



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Mathieu VIRAZELS

Le 25 octobre 2023

**Bloquer le TNF en combinaison avec les inhibiteurs de point de
contrôle immunitaire pour traiter le mélanome avancé**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **CANCEROLOGIE**

Unité de recherche :
CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par
Bruno SEGUI et Céline COLACIOS

Jury

Mme Marie-Alix POUL, Rapporteur
M. Olivier ADOTEVI, Rapporteur
M. Eric TARTOUR, Rapporteur
Mme Maha AYYOUB, Examinatrice
M. Bruno SEGUI, Directeur de thèse
Mme Céline COLACIOS, Co-directrice de thèse

Remerciements

Je remercie les membres de mon jury les **Professeurs Marie-Alix Poul, Maha Ayyoub, Olivier Adotévi et Éric Tartour** d'avoir accepté d'évaluer et de discuter mes travaux de thèse. Merci pour votre temps et votre enthousiasme.

Merci **Maha** d'avoir accepté de présider ce jury, ce fut un réel honneur. Les interactions que nous avons eu pendant ma thèse ont toujours été instructives et enrichissantes.

Je veux remercier particulièrement mes directeurs de thèse : le **Pr Bruno Ségui** et le **Dr Céline Colacios**, pour la confiance qu'ils m'ont accordé en me confiant ce projet de thèse, ce choix n'était pas évident. Vous m'avez servi sur un plateau d'argent la thèse que je n'aurais pas osé demander.

Bruno, merci d'avoir cru en moi et d'avoir renouvelé ton soutien lorsque c'était nécessaire. Tu as été mon prof avant d'être mon directeur de thèse et, depuis mes années de PACES en passant par le Master, tu as été une grande source d'inspiration pour l'aspirant (enseignant ?)-chercheur que je suis.

Céline, notre relation a été difficile au début et je te remercie beaucoup d'avoir fait en sorte que cela se finisse bien. Tu es une personne entière, très chaleureuse et humaine. Merci de m'avoir fait profiter de tes connaissances de vraie immunologiste, cela a contribué à consolider mon attrait pour l'immuno fondamentale !

Merci à tous les deux de m'avoir soutenu dans mon investissement pour l'enseignement et la vie du labo, cela me tenait à cœur et je ne suis jamais senti bridé pour m'y engager autant que je le pouvais.

Je tiens à remercier la **Fondation Toulouse Cancer Santé** pour avoir soutenu ce projet et financé ma thèse.

Merci au **Dr Anne Dejean** et au **Pr François Ghiringhelli** d'avoir accepté de participer à mon comité de thèse, les discussions scientifiques étaient passionnantes et je me suis senti écouté et soutenu pour parler des difficultés que j'ai rencontrées pendant cette thèse.

Merci à toute l'**équipe 4** de m'avoir accueilli et soutenu pendant plus de quatre ans ! J'ai beaucoup mûri et grandi à votre contact, j'ai appris énormément de vous tant sur le plan humain que scientifique.

Anne, tu étais à la fois la moitié du bicéphale que l'on formait tous les deux et la troisième tête de ma direction de thèse ! Merci de m'avoir formé à tant de gestes techniques et de concepts théoriques, merci pour ton calme et ta patience au quotidien et pour ta douceur dans les moments compliqués. Merci aussi pour ton exigence et ta rigueur qui font grandir plus vite. J'étais très heureux pour toi (et soulagé pour moi) que tu obtiennes un poste de chercheuse pendant ma thèse, c'est largement mérité, et j'espère que tu pourras bientôt te consacrer à ta passion de toujours : les lymphocytes ennuyeux.

Nathalie et Joëlle, merci de m'avoir choisi pour ce stage de Master 2, c'était un pari, qui a débouché indirectement sur ce travail de thèse passionnant. **Joëlle**, à ton contact j'ai consolidé mes compétences techniques et la rigueur dans mon travail. Merci pour ton encadrement et ton soutien durant ce stage et la fin de mon master ainsi que pour toutes les discussions que l'on a eues depuis, des plus intimes aux plus sportives. Je me suis toujours senti soutenu.

Thierry, merci pour vos connaissances et votre sagesse que l'on croirait infinies, votre bienveillance et votre occasionnelle malice qui fait toujours mouche.

Laurence, merci d'avoir participé à ma préparation pour le concours de l'école doctorale et merci d'avoir renforcé l'animation scientifique de l'équipe.

Stéphanie, merci pour ton soutien lors des phases de turbulence, pour tes anecdotes complètement improbables et hilarantes et pour ton aide technique et organisationnelle, sans toi je serais toujours en train de faire des Ficoll et de vérifier des tableaux ! (Et merci pour la paëlla !)

Virginie, la mémoire du labo. Merci pour tout ce que tu fais au quotidien pour nous faciliter la vie et pour que l'on puisse travailler dans de bonnes conditions. Merci pour tes coups de gueules

occasionnels qui redressent la barre et pour tes éclats de rire qui sont contagieux et qui traversent les murs.

Elodie, merci pour ton calme et ta patience à toute épreuve, ta vigilance discrète mais ferme sur notre sécurité au travail et pour tes anecdotes historiques sur l'équipe qui, si elles ne sortaient pas de ta bouche, seraient invraisemblables !

Stéphane et Patricia, merci pour votre soutien technique qui nous fait gagner un temps précieux !

Laura, merci pour rien.

Carine, tu as été ma première amie de science et j'espère que cela durera longtemps ! Merci pour ton soutien et pour tes encouragements tout au long de ma thèse et en dehors du labo. Merci pour tes blagues de papa dont toi seule a le secret et auxquelles tu ris toi-même ! Merci d'avoir ouvert le chemin devant moi et de m'avoir suivi dans toutes mes initiatives. Bravo pour ta thèse et ce que tu as réussi à accomplir contre vents et marées. J'espère que tu t'éclates bien à Amsterdam et je compte bien venir squatter ton canapé très bientôt !

Lorry et Lisa, nous sommes arrivés dans l'équipe à peu près au même moment et je n'oublierai jamais cette soirée où nous buvions des bières dans le bureau en assistant en direct à la déclaration de guerre de notre président. La période n'a pas été simple mais j'ai apprécié les discussions et les soirées mais aussi les galères que nous avons partagées.

Matthieu, le Jack Black de l'équipe. Merci pour ton sens de l'humour et de l'autodérision qui sont hilarants. Merci aussi pour ton aide et ta patience quand il s'agit de trouver un langage commun pour réconcilier la biologie et l'informatique.

Les anciens : **Justine, Elie, Patricia** (*aka* Patoche ou PDD), merci de m'avoir inclus dans le cercle lors des fameuses pauses de 16h (qui n'ont malheureusement pas survécu à votre départ). Merci pour vos encouragements et pour votre soutien lors de mon stage de M2 et au moment de passer le concours !

Merci **Elie** et **Guigui** d'organiser le *touch rugby* et les *scienti' ludo*, c'est génial pour le CRCT et cela m'a inspiré à concrétiser mes idées.

Jean, compagnon de master 2 avec qui j'ai partagé cette période charnière ! Merci pour ta bonne humeur et ton enthousiasme contagieux, et merci pour m'avoir initié à l'escalade et fait rencontrer Lorraine et Lulu à cette occasion.

Les jeunes : **Tania, Océane, Benjamin et Ludivine**, merci pour votre fraîcheur et votre enthousiasme. Il y a un vrai gap générationnel entre nous mais j'espère que j'aurai réussi à vous transmettre certaines choses. En tous cas, la relève est assurée !

Sérieusement, merci **Laura** pour ton humour et ta bonne humeur de toutes les heures. Ta simple présence détend l'atmosphère et fait du bien au moral. Ma dernière année de thèse aurait été beaucoup plus triste et difficile si tu n'avais pas été là avec tes blagues à deux balles... Merci pour ton ingénuité assumée et ton honnêteté. Merci d'avoir été à l'écoute dans les moments difficiles et d'avoir supporté mes coups de gueule et merci pour ta confiance quand les rôles étaient inversés. Merci aussi de t'être levée (trop) souvent avant le soleil pour éclairer notre humeur les jours de grosses manips et bien sûr pour ton aide et tes leçons de couture.

Géraldine, merci pour ta compétence infaillible toujours accompagnée de ta gentillesse, ta bienveillance et ta bonne volonté qui m'ont sauvé la vie plus d'une fois au cours de ma thèse. Tu es la gestionnaire parfaite ! J'espère que tu seras plus heureuse dans ton nouvel environnement. Merci aussi à **Ambre** qui vient de prendre la relève avec brio !

Lorraine et Guillaume, *les Canetons*, merci d'avoir été là, votre soutien était inestimable et il m'a beaucoup manqué quand vous êtes partis. Merci pour tous les moments passés au labo et en dehors, à l'escalade, dans les bars, sur les routes et dans les Pyrénées. Pourvu qu'il y en ait d'autres ici ou ailleurs ! Merci d'être vous, merci pour tout.

Les anciens voisins de l'équipe 18 : **Laura, Charlotte, Charly, Estelle, Thomas, Marie (& Coco), Claudy, Ambrine, Margaux et tous les autres** ! Merci pour votre bonne humeur et pour votre accueil dans votre bande. Les soirées sushis au labo étaient rafraichissantes, comme les bières à la Cervoiserie. Merci aussi de montrer les mauvais exemples à ne pas suivre. J'ai beaucoup de respect pour ce que vous arrivez à construire dans de telles conditions.

L'équipe 10 (et ex équipe 2) : **Lulu, Guigui, Lila**, j'ai passé avec vous et les autres du « *CRCT Crew* » mes meilleurs moments pendant cette thèse, en faisant du sport ou en buvant des bières, grâce à vous je me suis enfin senti à ma place. Merci **Jérôme** pour tes blagues de tonton et

merci de faire à la fois le coach et l'arbitre au *touch rugby*, ce n'est pas pareil quand tu n'es pas là.

Les nouveaux voisins de l'équipe 17 : **Coralie, Camille, Silvia, Corentin, Benoit, Mickaël**, merci pour les (trop rares) discussions que nous avons eues au détour d'un couloir, au milieu d'un buffet ou lors d'un trajet à vélo.

L'équipe 1 : **Clara**, merci d'avoir pris le temps de m'initier à la magie des lymphocytes spécifiques de la tumeur et de me m'avoir prodigué tes précieux conseils. **Nono**, merci pour ta bonne humeur continuelle, ton sens de l'humour décalé et ton honnêteté désarçonnante ! Merci surtout pour tes encouragements.

Merci **Nadège** pour tous tes conseils précieux et pour les fréquents prêts de matériel.

Merci aux **doctorants** de m'avoir désigné pour les représenter au Conseil de laboratoire, j'y ai beaucoup appris sur le fonctionnement de la recherche et sur tous les petits rouages qui font tourner un labo, mais aussi sur moi-même. Merci à tous **les membres du Conseil de laboratoire** pour votre accueil et pour toutes ces discussions parfois mouvementées mais toujours enrichissantes. Je me suis toujours senti soutenu malgré les mésententes et les incompréhensions. Merci aussi à tous les membres du CRCT qui ne font pas partie du Colab mais qui m'ont manifesté leur soutien personnellement.

Merci particulièrement à **Sébastien** qui a, je pense, porté le labo entier sur ses larges épaules pendant la pandémie et qui m'a personnellement et discrètement soutenu, au Colab et en dehors, pour toutes mes initiatives, scientifiques ou non.

Merci aux personnels du **pôle technologique**, pour leur aide et leur disponibilité. Merci particulièrement **Manon** pour ta gentillesse et ta patience, ta réactivité et ton efficacité qui sont venus à bout de la plupart de mes problèmes de cytométrie ! Merci d'avoir assuré les trop longues séances de tri ! Merci **Carine** et **Emeline** d'avoir pris le temps qu'il fallait pour organiser les manips de transcriptomique qui me stressaient tant ! Merci pour votre gentillesse et pour votre compétence.

Merci aux personnels du **CREFRE** pour leur disponibilité et leur réactivité et sans qui cette thèse n'aurait pas été possible. Merci à tous pour votre travail et pour votre humanité. Merci **Sarah** de m'avoir formé aux gestes de base avec humour et bienveillance. Merci **Cédric**

d'organiser tout ça pour nous assurer une telle qualité de service. Merci **Thi Lan, Charlène, Amanda, Fraha, Ibou et Paul-Louis** d'avoir assuré le soin et le suivi des souris au quotidien et d'avoir été à l'écoute de mes besoins. Merci **Tristan, Charlotte et Pilar** pour votre travail et surtout votre bonne humeur et votre humour qui m'ont souvent remonté le moral. Grâce à vous j'ai trouvé une bouffée d'air frais dans les locaux isolés de l'expé ! Merci particulièrement à **Emilie**, la boss de l'expé. Merci de t'être toujours rendue disponible et attentive, merci d'avoir pris le temps de discuter, de m'expliquer mais aussi d'écouter et de prendre en compte mes besoins. Merci surtout pour les bavardages anodins qui font du bien et pour m'avoir écouté quand j'avais besoin de vider mon sac.

Mina, merci pour tout ce que tu fais très tôt le matin pour que les gens se sentent bien quand ils arrivent au labo. Ton sourire est solaire et tes pâtisseries pas moins.

Merci **Arantxa** pour ta disponibilité et ton aide sur cette fameuse manip !

Merci au **Dr Arnaud Labrousse** avec qui j'ai eu la chance d'enseigner la Biologie Cellulaire pendant une année. Tu étais un des meilleurs profs quand j'étais sur les bancs de la fac et tu as été un très bon mentor qui m'a montré, tout en bienveillance, le métier d'enseignant chercheur tel qu'il est réellement : passionnant mais très ingrat. Une pensée aussi pour tous les étudiants que j'ai eus en TD ou TP et avec qui les interactions furent toujours valorisantes et enrichissantes.

Merci au **Dr Béata Jady** qui m'a fait confiance pour mon premier stage de recherche. J'ai laissé la biologie moléculaire derrière moi pour l'instant mais tu es la première à m'avoir enseigné la rigueur dans les gestes et les idées. Je te dois beaucoup. Merci aussi à toute l'équipe KISS du LBME pour leur accueil lors de ce stage et particulièrement au **Dr Patrice Vitali**, toujours enthousiaste, et qui m'a accueilli comme l'enfant prodigue quand je l'ai surpris à retourner sur les bancs de la fac.

Merci au **Dr François Frugier** qui m'a fait profiter de ses talents de psychanalyste au moment où j'en avais le plus besoin. Merci d'avoir trouvé les mots pour m'encourager et de m'avoir parlé à cœur ouvert malgré mon aversion pour les commerciaux !

Merci à mes amis de la fac (et extensions) : **Claire Coustal, Camille, Momo, Valé, Gabby, Lou et Tiago** pour votre fidélité et pour tous les moments passés en votre bonne compagnie,

devant un match de rugby, une raclette, une piste de ski, une partie de Mario Kart ou simplement devant une bière. J'espère qu'il y en aura beaucoup d'autres !

Merci à mes vieux potes : **Cédric, Eddy, Thibaut, Thomas** (le cinq majeur) plus **Alex et Antoine**. Je suis un peu absent et je le regrette mais merci d'être là pour les moments importants et de faire comme si on s'était vus la veille.

Francis et Hugué, compagnons de cuisine et de geekerie, merci d'être fidèles à vous-même ! Merci pour votre soutien et votre écoute lors des moments difficiles. Merci pour les discussions que je ne peux avoir qu'avec vous sur les sujets les plus pointus, les plus exotiques ou les plus débiles !

Un grand MERCI à **ma famille**. Votre soutien et votre amour inconditionnels m'ont porté et poussé tout au long de cette thèse. Vous m'avez aussi aidé à relativiser les déceptions et les coups durs. Je sais que vous êtes fiers de moi et cela me rend heureux. Je vous aime.

Merci **Dominique et Martial** de m'avoir accueilli et adopté dans la famille !

Claire, tu es la découverte la plus importante de ma thèse. Merci d'avoir partagé mon quotidien dans cette dernière ligne droite et d'avoir toujours été là pour moi quand j'en avais besoin. On a franchi cette étape ensemble et je pense qu'on en sort plus forts tous les deux. J'ai hâte de pouvoir profiter des vacances avec toi et de construire notre petit foyer tous les deux à Heidelberg ! Je t'aime.

" Rien n'a de sens en biologie, si ce n'est à la lumière de l'évolution "

Theodosius Dobjansky

"Il est une chose admirable qui surpasse toujours la connaissance, l'intelligence, et même le génie, c'est l'incompréhension. »

L'Anomalie,
Victør Miesel

RÉSUMÉ

Les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (ICI) ont révolutionné la prise en charge des patients atteints de mélanome avancé. Cependant la plupart souffrent d'effets indésirables immunologiques et la moitié subissent des effets graves qui nécessitent l'arrêt du traitement et l'administration de médicaments immunosuppresseurs. Les colites réfractaires aux corticostéroïdes peuvent être traitées par infliximab, un anticorps anti-TNF. Mon équipe a démontré que l'inhibition du TNF améliore la survie des souris traitées par anti-PD-1 dans un modèle de mélanome. Ces résultats ont permis à mon équipe d'initier deux essais cliniques : MELANF α , visant à évaluer si l'évolution des taux plasmatiques de TNF permet d'identifier les patients dont le mélanome avancé ne progresse pas sous traitement par ICI ; et TICIMEL, essai de phase Ib visant à évaluer la tolérance de l'inhibition concomitante du TNF (infliximab ou certolizumab), de PD-1 (nivolumab) et de CTLA-4 (ipilimumab).

Mes objectifs de thèse sont d'évaluer (i) si le TNF est un biomarqueur prédictif de la réponse clinique et une cible thérapeutique chez les patients atteints de mélanome avancé traités par ICI ; (ii) l'impact sur la réponse immunitaire des anti-TNF en combinaison avec les ICI chez les patients et dans des modèles de mélanome murin.

Bien que l'évolution du TNF plasmatique ne permette pas de discriminer les patients selon leur réponse, les taux de TNF augmentent dans le plasma des patients traités par ICI. Pendant le traitement, ces taux sont plus importants chez les non répondeurs que chez les répondeurs. Des analyses de séquençage d'ARN sur cellules uniques indiquent une signalisation TNF accrue dans les lymphocytes T circulants chez les non répondeurs en comparaison aux répondeurs. TICIMEL démontre la sûreté de l'inhibition concomitante du TNF, de CTLA-4 et de PD-1 pour traiter les patients atteints de mélanome avancé. L'inhibition du TNF n'entrave pas la réponse aux ICI car nous avons observé une activation de la réponse immunitaire périphérique. La combinaison ipilimumab/nivolumab/certolizumab est associée à de meilleurs signaux d'efficacité mais à plus de toxicité que la combinaison ipilimumab/nivolumab/infliximab. Chez la souris, je confirme que l'inhibition du TNF permet d'améliorer l'efficacité de la combinaison anti-PD-1 + anti-CTLA-4 et d'augmenter la survie des souris porteuses d'un mélanome B16-OVA. Elle favorise aussi une mémoire immunologique à long terme dans une expérience de rechallenge. Cette augmentation d'efficacité est associée à une diminution de la proportion de lymphocytes T régulateurs (T_{reg}) et d'un ratio lymphocytes T CD8/T_{reg} plus favorable dans la tumeur. Dans le ganglion drainant la tumeur, j'ai observé que le blocage du TNF induit l'augmentation de la proportion de lymphocytes T CD8 et CD4 exprimant Slamf6 et PD-1 par rapport à la combinaison anti-PD-1 + anti-CTLA-4. Ces cellules pourraient correspondre aux lymphocytes précurseurs épuisés dont la prolifération a un impact majeur sur l'efficacité des anti-PD-1. Le séquençage des ARN totaux extraits des tumeurs de souris traitées avec anti-PD-1 + anti-CTLA-4 \pm anti-TNF montre que l'inhibition du TNF est associée à des signatures d'activation des lymphocytes T et B et de cytotoxicité leucocytaire. Ainsi, mes résultats de thèse démontrent que, bien que le TNF ne semble pas être un biomarqueur robuste pour prédire la réponse clinique des patients atteints de mélanome avancé traités par ICI, des taux plasmatiques de TNF et une signalisation TNF dans les lymphocytes T circulants sont accrus chez les non répondeurs. De plus, l'inhibition du TNF en combinaison avec les anti-PD-1 et anti-CTLA-4 est sûre chez les patients et l'activité clinicobiologique semble dépendre de la nature des anti-TNF. Une telle combinaison n'entrave pas la réponse immunitaire périphérique et a le potentiel d'améliorer la survie des patients atteints de mélanome avancé, comme cela semble se confirmer dans un modèle de mélanome murin.

ABSTRACT

Immune checkpoint inhibitors (ICI) have revolutionized the care of patients with advanced melanoma. However, most suffer from immunological side-effects, and half of them experience severe side-effects requiring treatment discontinuation and immunosuppressive drugs. Adverse events that are refractory to corticosteroids, particularly colitis, require the use of infliximab, an anti-TNF antibody. My team previously showed that blocking TNF improves the survival of mice treated with anti-PD-1 in a mouse melanoma model. These preclinical studies allowed my team to initiate two clinical trials: MELANF α , a prospective translational trial designed to assess whether changes in plasma TNF levels can identify advanced melanoma patients whose disease is not progressing on ICI therapy; and TICIMEL, a phase Ib clinical trial designed to assess the safety of concomitant blockade of TNF (infliximab or certolizumab), PD-1 (nivolumab) and CTLA-4 (ipilimumab).

My thesis objectives are to evaluate (i) whether TNF is a predictive biomarker of clinical response and a therapeutic target in patients with advanced melanoma treated with ICI; (ii) the impact on the immune response of anti-TNF in combination with ICI in patients and in mouse melanoma models.

Although the evolution of plasma TNF does not precisely discriminate patients according to their response, TNF levels increase in the plasma of patients treated with ICI. During treatment, these levels are higher in non-responders than in responders. Single cell RNA sequencing analyses indicate increased TNF signaling in circulating T cells in non-responders compared to responders. TICIMEL has demonstrated the safety of concomitant inhibition of TNF, CTLA-4 and PD-1 to treat patients with advanced melanoma. Inhibition of TNF does not attenuate the response to ICI as we observed activation of the peripheral immune response. The ipilimumab / nivolumab / certolizumab combination is associated with better efficacy signals but more toxicity than the ipilimumab / nivolumab / infliximab combination. In mice, I have confirmed that TNF blockade improves the efficacy of the anti-PD-1 + anti-CTLA-4 combination and increases the survival of B16-OVA melanoma-bearing mice. It also promotes long-term immunological memory in a rechallenge experiment. This increase in efficacy was associated with a reduction of the proportion of regulatory T cells (T_{reg}) infiltrating the tumor and a decrease of the CD8/T_{reg} ratio in tumors. In the tumor-draining lymph node, I observed that blocking TNF induces increased proportions of CD8 and CD4 T cells expressing Slamf6 and PD-1 compared with the anti-PD-1 + anti-CTLA-4 combination. These cells may correspond to precursor exhausted T cells whose proliferation has a major impact on the efficacy of anti-PD-1. Sequencing of bulk RNA extracted from tumors of mice treated with anti-PD-1 + anti-CTLA-4 \pm anti-TNF shows that TNF blockade is associated with signatures of T and B lymphocyte activation and leukocyte-mediated cytotoxicity.

Collectively, my thesis results demonstrate that, although TNF does not appear to be a robust predictive biomarker of clinical response in patients with advanced melanoma treated with ICI, plasma levels of TNF and TNF signaling in circulating T cells are increased in non-responders. Moreover, the inhibition of TNF in combination with anti-PD-1 and anti-CTLA-4 is safe in patients and the clinicobiological activity seems to depend on the nature of the anti-TNF. Such a combination does not impair the peripheral immune response and has the potential to improve survival in patients with advanced melanoma, as it seems to be confirmed in a mouse melanoma model.

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| Remerciements | 1 |
| RÉSUMÉ | 11 |
| ABSTRACT | 13 |
| SOMMAIRE | 14 |
| Liste des Figures | 18 |
| Liste des Tableaux | 19 |
| Liste des Abréviations | 20 |
| INTRODUCTION | 23 |
| Chapitre I : Le mélanome cutané, un cancer immunogène | 24 |
| 1. Épidémiologie | 24 |
| 2. Développement du mélanome cutané | 26 |
| 2.1. Les mutations initiatrices du mélanome | 29 |
| 2.2. Les mutations secondaires | 29 |
| 2.3. Les mutations tardives | 30 |
| 3. Prise en charge et traitements | 32 |
| 3.1. Diagnostic | 33 |
| 3.2. Classification | 34 |
| 1.1. Traitements | 35 |
| 1.1.1. Mélanome localisé | 36 |
| 1.1.2. Thérapies adjuvantes | 37 |
| 1.1.3. Mélanome avancé ou métastatique | 37 |
| Chapitre II : L'immunité du mélanome | 41 |
| 1. L'immunité antitumorale | 43 |
| 1.1. L'immunité innée | 44 |
| 1.1.1. Les macrophages | 44 |
| 1.1.2. Les neutrophiles | 45 |
| 1.1.3. Les lymphocytes NK | 46 |
| 1.1.4. Les lymphocytes NKT | 47 |
| 1.1.5. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ | 47 |
| 1.1.6. Les cellules dendritiques | 48 |
| 1.2. L'immunité adaptative | 49 |

| | | |
|--------|--|----|
| 1.2.1. | Les antigènes tumoraux _____ | 51 |
| 1.2.2. | Les lymphocytes T CD8 _____ | 54 |
| 1.2.3. | L'épuisement des lymphocytes T CD8 _____ | 54 |
| 1.2.4. | Les lymphocytes T CD4 _____ | 55 |
| 1.2.5. | Les lymphocytes T mémoires _____ | 57 |
| 1.2.6. | Les lymphocytes T régulateurs _____ | 59 |
| 1.2.7. | Les lymphocytes B _____ | 61 |
| 1.2.8. | Les structures lymphoïdes tertiaires _____ | 63 |
| 1.3. | L'immunoédition _____ | 64 |
| 1.3.1. | Élimination _____ | 66 |
| 1.3.2. | Équilibre _____ | 66 |
| 1.3.3. | Échappement _____ | 67 |
| 2. | Les immunothérapies : restaurer la réponse immunitaire _____ | 68 |
| 2.1. | CTLA-4 _____ | 69 |
| 2.1.1. | Biologie et rôles physiologiques de CTLA-4 _____ | 70 |
| 2.1.2. | Bloquer CTLA-4 _____ | 71 |
| 2.2. | PD-1 _____ | 73 |
| 2.2.1. | Biologie et rôles physiologiques de PD-1 _____ | 74 |
| 2.2.2. | Bloquer PD-1 _____ | 75 |
| 2.3. | Combiner anti-CTLA-4 et anti-PD-1 _____ | 77 |
| 2.4. | Les autres points de contrôle immunitaire _____ | 78 |
| 2.5. | Effets indésirables immunologiques _____ | 80 |
| 1. | Résistances et perspectives d'amélioration _____ | 81 |
| 1.1. | Mécanismes de résistances aux immunothérapies _____ | 81 |
| 1.2. | L'influence du microbiote _____ | 85 |
| 1.3. | Nouvelles stratégies _____ | 87 |
| 1.3.1. | Immunothérapie néoadjuvante _____ | 87 |
| 1.3.2. | Vaccins de nouvelle génération _____ | 88 |
| 1.1.1. | Cellules CAR-T _____ | 88 |
| 1.1.2. | Anticorps multi-spécifiques _____ | 89 |
| 1.1.3. | Cibler les cytokines _____ | 90 |

Chapitre III : Le TNF, une cytokine ambivalente _____ 91

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Biologie du TNF _____ | 91 |
| 1.1. | Structure _____ | 92 |
| 1.2. | Signalisation _____ | 93 |
| 1.2.1. | TNFR1 _____ | 93 |
| 1.2.2. | TNFR2 _____ | 97 |
| 1.2.3. | Signalisation inversée : « reverse signaling » _____ | 98 |
| 1.2.4. | La lymphotoxine _____ | 98 |

| | | |
|--------|---|------------|
| 1.3. | Physiopathologie _____ | 100 |
| 1.3.1. | TNF et macrophages _____ | 101 |
| 1.3.2. | TNF et cellules myéloïdes suppressives _____ | 101 |
| 1.3.3. | TNF et lymphocytes T régulateurs _____ | 102 |
| 1.3.4. | TNF, dysfonction des lymphocytes T et AICD _____ | 104 |
| 1.4. | Inhiber le TNF pour traiter l'auto-immunité _____ | 105 |
| 2. | TNF et cancer _____ | 107 |
| 2.1. | Le TNF anti-tumoral _____ | 108 |
| 2.2. | Le TNF pro-tumoral _____ | 109 |
| 2.2.1. | Rôle dans l'angiogenèse et le développement tumoral _____ | 109 |
| 2.2.2. | Rôle dans la carcinogénèse _____ | 110 |
| 2.2.3. | Dédifférenciation du mélanome _____ | 111 |
| 2.2.4. | Métastases _____ | 112 |
| 2.2.5. | Immunosuppression _____ | 113 |
| 3. | TNF et immunothérapies _____ | 116 |
| 3.1. | Inhiber le TNF pour traiter le cancer _____ | 116 |
| 3.2. | Traitement des effets indésirables immunitaires _____ | 117 |
| 3.3. | Inhiber le TNF en combinaison avec les immunothérapies _____ | 117 |
| | Objectifs de la thèse : _____ | 120 |
| | RÉSULTATS _____ | 121 |
| | Article 1 : TNF signature in advanced melanoma patients treated with immune checkpoint inhibitors: results from the MELANF α clinical study _____ | 122 |
| | Article 2 : Combining nivolumab and ipilimumab with infliximab or certolizumab in patients with advanced melanoma : first results of a phase Ib clinical trial _____ | 164 |
| | Impact des anti-TNF sur la réponse aux immunothérapies dans le mélanome murin _____ | 177 |
| | Contexte _____ | 177 |
| | Matériel & Méthodes _____ | 178 |
| 1. | L'inhibition du TNF améliore l'efficacité de la combinaison anti-PD-1 et anti-CTL-4 _____ | 181 |
| 2. | La trithérapie diminue la proportion de T _{reg} et augmente le ratio CD8 / T _{reg} dans la tumeur _____ | 184 |
| 3. | La trithérapie semble favoriser l'expansion des précurseurs épuisés dans le ganglion drainant la tumeur _____ | 187 |
| 4. | La trithérapie est associée à des signatures d'expression génique d'activation de la réponse immunitaire _____ | 189 |
| 5. | Comparaison de l'efficacité de la bithérapie et de la trithérapie dans les modèles de mélanome 1014 et Yumm1.7 _____ | 193 |
| | Conclusion de mes travaux chez la souris _____ | 193 |

| | |
|--|------------|
| DISCUSSION | 195 |
| 1. Le TNF comme biomarqueur de réponse aux inhibiteurs de point de contrôle immunitaire | 196 |
| 2. Le TNF comme cible thérapeutique en combinaison avec les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire | 201 |
| 3. L'inhibition du TNF améliore l'efficacité des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire chez la souris | 204 |
| ANNEXES | 211 |
| Annexe I : Liste des publications | 212 |
| Annexe II : New insights into the role of sphingolipid metabolism in melanoma | 213 |
| BIBLIOGRAPHIE | 243 |

Liste des Figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1: Incidence du cancer en France en 2020 | 25 |
| Figure 2: Estimation du nombre de nouveaux cas de mélanome cutané en 2040 | 26 |
| Figure 3: Fréquence de mutations somatiques observées par type de cancer | 27 |
| Figure 4 : Deux modèles de développement du mélanome | 28 |
| Figure 5: Voies de signalisation altérées dans le mélanome | 32 |
| Figure 6 : Mécanismes d'action des thérapies ciblées utilisées dans le mélanome | 33 |
| Figure 7: Classification « TNM » proposée par l'AJCC (8 ^{ième} édition) | 35 |
| Figure 8: Survie sans progression des patients traités par ICI | 39 |
| Figure 9: Arbre de décision pour le traitement du mélanome selon le Dictionnaire Vidal | 40 |
| Figure 10: Arbre de différenciation des cellules hématopoïétiques | 42 |
| Figure 11: Les trois signaux d'activation du lymphocyte T | 51 |
| Figure 12: Cycle de l'immunité du cancer | 52 |
| Figure 13: Modèle d'activation et d'épuisement des CD8 | 55 |
| Figure 14 : Cytokines et facteurs de transcription associés à la polarisation des CD4 | 57 |
| Figure 15 : Identification des sous-populations de lymphocytes T mémoires par cytométrie en flux | 58 |
| Figure 16: Mécanismes d'immunosuppression des T _{reg} | 61 |
| Figure 17: Rôles supposés des lymphocytes B dans l'immunité anti- et protumorale | 63 |
| Figure 18: Démonstration expérimentale de l'immunoédition | 65 |
| Figure 19: Les trois « É » de l'immunoédition : Élimination, Équilibre, Échappement | 67 |
| Figure 20: Mécanismes d'action de CTLA-4 et de son inhibition | 73 |
| Figure 21: Signalisation induite par la liaison de PD-1 | 75 |
| Figure 22 : Organes fréquemment affectés par les effets indésirables immunologiques | 81 |
| Figure 23: Les trois phénotypes de l'immunité du cancer | 83 |
| Figure 24: Structure du TNF et du complexe TNF / TNFR2 | 93 |
| Figure 25: Signalisation en aval du TNFR1 | 96 |
| Figure 26: Voie non canonique de NF-κB en aval du TNFR2 | 98 |
| Figure 27: Récepteurs activés par le TNF et la lymphotoxine | 99 |
| Figure 28: Protocole de perfusion d'un membre isolé. | 109 |
| Figure 29: Mélanome dédifférencié. | 112 |
| Figure 30: Effets du TNF dans l'immunologie et la progression du mélanome. | 115 |
| Figure 31 : L'inhibition du TNF améliore l'efficacité de la combinaison anti-PD-1 et anti-CTLA-4 dans un modèle de mélanome murin | 181 |
| Figure 32: L'inhibition du TNF n'influe pas sur les proportions de lymphocytes circulants et leur prolifération chez les souris traitées par anti-PD-1 et anti-CTLA-4 | 183 |
| Figure 33 : La trithérapie confère une mémoire immunologique à long terme | 184 |
| Figure 34 : L'inhibition du TNF diminue la proportion de T _{reg} infiltrant la tumeur mais ne remodèle pas les proportions de lymphocytes T CD8 et CD4 conventionnels | 186 |

| | |
|---|-----|
| <i>Figure 35 : La bithérapie et la trithérapie induisent la prolifération des lymphocytes T dans le ganglion drainant la tumeur</i> | 187 |
| <i>Figure 36 : La trithérapie ne semble pas influencer sur la proportion de CD8 spécifiques dans la tumeur</i> | 188 |
| <i>Figure 37 : La trithérapie semble augmenter la proportion de précurseurs épuisés dans le ganglion drainant la tumeur</i> | 190 |
| <i>Figure 38: Analyse transcriptomique des tumeurs B16-OVA</i> | 192 |
| <i>Figure 39 : Croissance tumorale et survie de souris traitées par anti-PD-1, anti-CTLA-4 avec ou sans anti-TNF avec les modèles de mélanome 1014 et Yumm1.7</i> | 194 |
| <i>Figure 40: Niveaux d'hétérogénéité tumorale</i> | 197 |
| <i>Figure 41 : Représentation schématique de l'infliximab et du certolizumab</i> | 202 |

Liste des Tableaux

| | |
|--|-----|
| <i>Tableau 1: Mutations conductrices fréquemment retrouvées dans le mélanome cutané</i> | 31 |
| <i>Tableau 2: Inhibiteurs de point de contrôle immunitaire approuvés par la FDA pour traiter le mélanome</i> | 69 |
| <i>Tableau 3: Points de contrôles immunitaires et leurs effets</i> | 79 |
| <i>Tableau 4: Vaccins anti-cancer personnalisés en développement clinique</i> | 89 |
| <i>Tableau 5: Inhibiteurs du TNF et leurs indications approuvées</i> | 107 |
| <i>Tableau 6 : Anticorps thérapeutiques utilisés chez la souris</i> | 178 |
| <i>Tableau 7 : Réactifs fluorescents utilisés pour les analyses de cytométrie en flux</i> | 180 |

Liste des Abréviations

| | | | |
|-------------------------------|---|--------------------------------|--|
| ADA | anti-drug antibodies | FMT | Transfert de microbiote fécal |
| ADCC | Antibody-dependant cell cytotoxicity | FoxP3 | Forkhead box P3 |
| ADCP | Antibody-dependent cellular phagocytosis | GALT | Gut-associated lymphoid tissue |
| AHR | Récepteur d'aryl hydrocarbure | GAP | GTPase-activating protein |
| AICD | Activation-induced cell death | GM-CSF | Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor |
| AJCC | American Joint Committee on Cancer | HEV | High endothelial venules |
| AKT | AKT Serine/Threonine Kinase 1 | HMGB1 | High mobility group box 1 |
| AP-1 | Activator protein 1 | HOIL-1 | Heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase 1 |
| APC | Antigen-presenting cell | HOIP | HOIL-1-interacting protein |
| ARID | AT-rich interaction domain | HSC | Cellules souches hématopoïétiques |
| ATP | Adénosine triphosphate | HTO | Hash Tag Oligonucleotide |
| BCR | B cell receptor | ICAM-1 | Intercellular adhesion molecule |
| BRAF | B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase | ICI | Inhibiteurs de point de contrôle immunitaire |
| B_{reg} | Lymphocyte B régulateur | ICOS | Inducible T cell costimulator |
| CAR-T | Chimeric antigen receptor T cell | IDO | Indoleamine 2,3-dioxygénase |
| CD4 | Lymphocyte T CD4 ⁺ | IFNGR1 | Interferon gamma receptor 1 |
| CD4_{conv} | Lymphocyte T CD4 conventionnel | IFN-γ | Interféron gamma |
| CD8 | Lymphocyte T CD8 ⁺ | IKK | I κ B kinase |
| cDC | Cellule dendritique conventionnelle | IL | Interleukine |
| CDKN2A | Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A | IL-2R | Récepteur pour l'IL-2 |
| cIAP1/2 | Cellular inhibitor of apoptosis protein 1 / 2 | ILC | Innate lymphoid cells |
| CMH-I | Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I | INCa | Institut national du cancer |
| CMH-II | Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II | iNOS | Oxyde nitrique synthase inductible |
| CTL | Cytotoxic T lymphocyte | irAEs | Immune-related adverse events |
| CTLA-4 | Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 | IRF1 | Interferon regulatory factor 1 |
| CYLD | CYLD lysine 63 deubiquitinase | iT_{reg} | Lymphocyte T régulateur induit |
| DAMP | Dammage-associated molecular patterns | IκB | Inhibitor of NF- κ B |
| DC | Cellule dendritique | JNK | JUN NH ₂ -terminal kinase |
| DMBA | 7,12-diméthylbenz[a]anthracène | KIR | Killer cell immunoglobulin-like receptors |
| DSS | Dextran sulfate de sodium | LAG-3 | Lymphocyte-activation gene 3 |
| ECOG | Eastern Cooperative Oncology Group | LDH | Lactate déshydrogénase |
| EMA | European medicines agency | LPS | Lipopolysaccharide |
| ESMO | European Society for Medical Oncology | LTα | Lymphotoxine alpha |
| FACS | Fluorescence-activated cell sorting | LTβ | Lymphotoxine beta |
| FADD | Fas-associated death domain | LTβR | Lymphotoxin beta receptor |
| FAS | Fas cell surface death receptor | LUBAC | Linear ubiquitin chain complex |
| FASL | Fas ligand | M1 | Macrophage classiquement activé |
| FcγR | Récepteurs γ pour le fragment Fc | MadCAM-1 | Mucosal addressin cell adhesion molecule-1 |
| FDA | U.S. Food and drug administration | MAGE | Melanoma antigen |
| FLIP_L | FLICE-like inhibitory protein | MAPK | Mitogen-activated protein kinase |

| | | | |
|--------------------------------|--|--|--|
| MAPKK | Mitogen-activated protein kinase kinases | ROS | Oxygen reactive species |
| MC1R | Melanocortin 1 receptor | SHARPIN | SHANK-associated RH domain-interacting protein |
| MCA | 3'-methylcholanthrene | SMAC | Second mitochondria-derived activator caspase |
| M-CSF | Macrophage colony-stimulating factor | SODD | Silencer of death domain |
| MDM2 | Murine double minute 2 | STAT1 | Signal transducer and activator of transcription 1 |
| MICA/B | MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A/B | sTNF | TNF soluble |
| MLKL | Mixed lineage kinase domain-like | TAA | Tumor-associated antigen |
| moDC | Cellule dendritique dérivée d'un monocyte | TAB2/3 | TGF- β -activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 2 et 3 |
| NEMO | NF- κ B essential modulator | TACE | TNF- α -converting enzyme |
| NETs | Neutrophil extracellular traps | TAK1 | TGF- β -activated kinase 1 |
| NF1 | Neurofibromin 1 | TAM | Tumor-associated macrophages |
| NF-κB | Nuclear factor-kappa B | T_{CM} | Lymphocytes centraux mémoires |
| NIK | NF- κ B inducing kinase | TCR | T cell receptor |
| NK | Lymphocyte Natural killer | T_{EM} | Lymphocytes effecteurs mémoires |
| NKR | Natural killer receptor | T_{EMRA} | T _{EM} réexprimant CD45RA |
| NKT | Natural killer T cell | TERT | Telomerase reverse-transcriptase |
| NO | Monoxyde d'azote | T_{ex} | Lymphocyte T épuisé |
| NO | Monoxyde d'azote | T_{FH} | Folliculat helper T cell |
| NRAS | NRAS proto-oncogene, GTPase | TGF-β | Transforming growth factor beta |
| nT_{reg} | Lymphocyte T régulateur naturel | Th1 | Type 1 T helper cell |
| NY-ESO-1 | New York esophageal squamous cell carcinoma 1 | Th17 | T helper 17 cell |
| OLS | Organe lymphoïde secondaire | Th2 | Type 2 T helper cell |
| OMS | Organisation mondiale de la santé | Th9 | T helper 9 cell |
| OS | Overall survival : Survie globale | THD | TNF homology domain |
| PAMP | Pathogen-associated molecular pattern | TLR | Toll-like receptor |
| pb | Paires de bases | TLS | Tertiary lymphoid structure |
| PD-1 | Programmed cell death 1 | TMB | Tumor mutationnal burden |
| pDC | Cellules dendritique plasmacytoïde | tmTNF | TNF transmembranaire |
| PD-L1 | Programmed cell death 1 ligand 1 | TNF | Tumor necrosis factor |
| PD-L2 | Programmed cell death 1 ligand 2 | TNFR1 | Tumor necrosis factor receptor 1 |
| PEG | Polyéthylène glycol | TNFR2 | Tumor necrosis factor receptor 2 |
| PFS | Progression-free survival : Survie sans progression | TOX | Thymocyte selection associated high mobility group box |
| PGE₂ | Prostaglandine E ₂ | TP53 | Tumor protein p53 |
| PIP3 | Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate | TRADD | TNFR1-associated death domain |
| PMA | Phorbol 12-myristate 13-acetate | TRAF | TNF receptor-associated factor |
| PTEN | Phosphatase and tensin homolog | TRAIL | TNF-related apoptosis-inducing ligand |
| RAG2 | Recombination activating gene 2 | T_{reg} | Lymphocyte T régulateur |
| RGP | Phase de croissance radiale | TSA | Tumor-specific antigen |
| RIPK1 | Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 | T$\gamma$$\delta$ | Lymphocyte T γ δ |
| ROC | Receiver Operating Characteristic | UV | Rayons ultraviolets |
| ROS | Espèces réactives de l'oxygène | VEGF | Vascular endothelium growth factor |
| | | VGP | Phase de croissance verticale |
| | | WT | Wild type |
| | | αMSH | α -melanocyte stimulating hormone |
| | | β-TrCP | Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase |

INTRODUCTION

Chapitre I : Le mélanome cutané, un cancer immunogène

Le mélanome est un cancer issu des mélanocytes, les cellules pigmentées productrices de la mélanine. Les mélanocytes sont en grande majorité localisés dans l'épiderme mais on en trouve aussi dans l'uvée et les muqueuses. En conséquence, le mélanome peut se développer au niveau de l'uvée et des muqueuses mais le mélanome cutané est de loin le plus fréquent^{1,2}. Plusieurs types de cancer peuvent se développer dans la peau : le carcinome basocellulaire, le carcinome épidermoïde cutané et le mélanome. Les carcinomes sont issus de cellules épithéliales que sont les kératinocytes. Les mélanocytes, quant à eux, dérivent de la crête neurale et, du fait de cette origine embryologique, les cancers issus de ces cellules ont un comportement différent des tumeurs épithéliales. En effet, les mélanocytes ont des capacités de migration qui leur permettent d'atteindre les autres cellules de l'épiderme contrairement aux kératinocytes. Cette caractéristique explique la grande agressivité du mélanome et sa forte capacité à métastaser. Ainsi, le mélanome est le cancer de la peau le moins fréquent (environ 10% des cancers de la peau en France³) mais le plus mortel⁴. Le mélanome est aussi un des types de cancer dans lequel on retrouve la plus grande fréquence de mutations⁵, essentiellement causées par l'exposition aux rayonnements ultra-violet (UV). Cette charge mutationnelle élevée s'accompagne de néoantigènes qui fait du mélanome un cancer immunogène. Historiquement, le mélanome a donc été un cancer modèle dans l'étude de l'immunologie du cancer et pour le développement des immunothérapies.

1. Épidémiologie

L'organisation mondiale pour la santé (OMS) estime à 16 449 en France et 324 635 dans le monde, le nombre de nouveaux cas de mélanome cutané en 2020⁶. En France, c'est le sixième type de cancer en nombre de nouveaux cas en 2020 (Fig. 1) et l'incidence augmente tous les ans : +2,6% d'augmentation annuelle entre 1990 et 2023 chez la femme et +3,5% chez l'homme selon l'Institut national du cancer (INCa). L'âge médian au diagnostic est de 62 ans chez les femmes et 68 ans chez les hommes³. Grâce aux campagnes de préventions sensibilisant aux risques associés à l'exposition aux UV et à l'apparition de nouvelles thérapies, le taux de survie des patients atteints de mélanome cutané augmente¹. Le taux de survie net standardisé à 5 ans des personnes diagnostiquées en 2015 était de 93% contre 82% en 1990³. Cependant, le

taux de survie des patients chute à environ 30% lorsqu'ils sont diagnostiqués à un stade avancé (stade III ou IV) de la maladie².

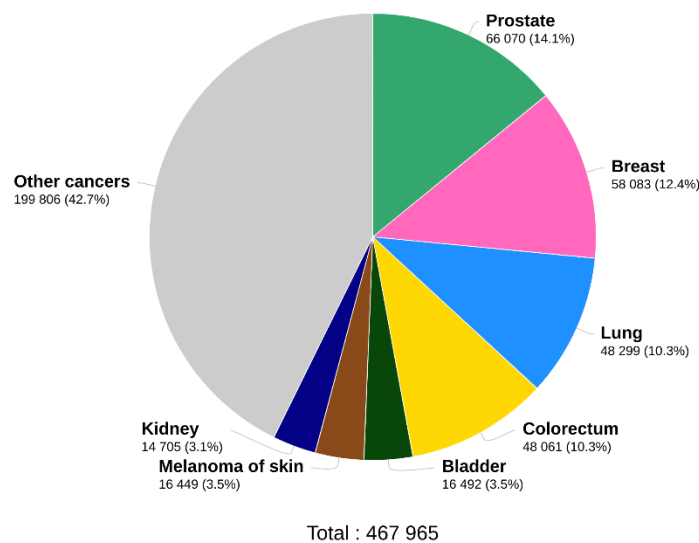


Figure 1: Incidence du cancer en France en 2020

Nombre estimé de nouveaux cas par type de cancer en France en 2020. Le mélanome (en marron) est le sixième type de cancer en nombre de nouveaux cas. Source: Global Cancer Observatory, OMS ⁶ (gco.iarc.fr)

Les principaux facteurs de risque sont l'exposition aux UV naturels ou artificiels (en particulier durant l'enfance), la sensibilité de la peau aux UV (phototype clair), un nombre élevé (>50) de *naevi* (communément appelés « grains de beauté »), des antécédents personnels ou familiaux et l'immunodépression³. L'OMS estime à 80% la proportion de mélanome cutané imputable à l'exposition aux UV en Europe, Amérique du Nord, Australie et Nouvelle-Zélande⁶, régions du monde où l'incidence est la plus forte. Ceci illustre bien le fait que les personnes à phototype clair sont plus vulnérables à l'exposition aux UV et ont plus de risque de développer un mélanome cutané. Cependant le nombre de nouveaux cas croit fortement dans les pays du sud : cette augmentation est estimée à plus de 50% d'ici à 2040 (Fig. 2). Cette augmentation serait expliquée en grande partie par la démographie croissante de ces pays⁶ mais aussi par les comportements de recherche du bronzage par l'exposition au soleil et aux cabines UV².

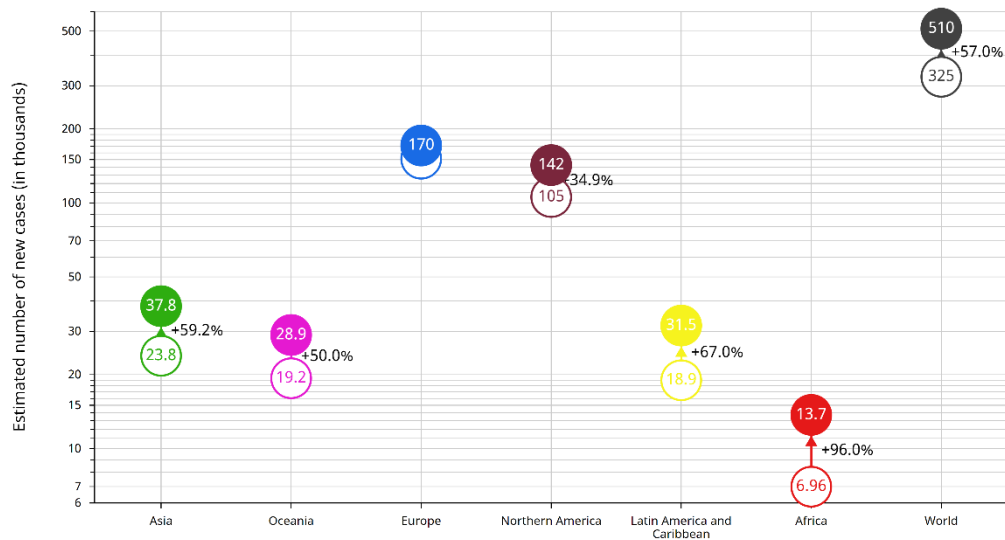


Figure 2: Estimation du nombre de nouveaux cas de mélanome cutané en 2040

Estimation du nombre de nouveaux cas de mélanome cutané dans chaque région du monde en 2020 et en 2040 et taux d'évolution (%) entre ces deux années. Source: Global Cancer Observatory, OMS (gco.iarc.fr)

2. Développement du mélanome cutané

Le mélanome émane de la transformation maligne d'un mélanocyte. Ces cellules se situent au niveau de la couche basale de l'épiderme où ils côtoient les cellules épithéliales de la peau, les kératinocytes. Les mélanocytes se divisent peu (moins de deux fois par an) et forment une population minoritaire (environ 1 500 mélanocytes / mm²) dans l'épiderme humain⁷. On retrouve en moyenne un mélanocyte pour trente à quarante kératinocytes⁸. La principale fonction des mélanocytes consiste à produire de la mélanine et de la transmettre aux kératinocytes. La mélanine est un pigment qui donne sa couleur à la peau et qui protège l'ADN des cellules des dégâts causés par l'exposition aux rayons ultraviolets (UV) en les absorbant. Les mélanocytes prolifèrent et produisent de la mélanine en réponse aux dégâts causés par les UV dans l'ADN des kératinocytes. Chez ces derniers, p53 (codé par *TP53* : *Tumor protein p53*) active la sécrétion de l'hormone α MSH (*α -melanocyte stimulating hormone*) qui se lie au récepteur MC1R (*Melanocortin 1 receptor*) des mélanocytes et induit la synthèse de mélanine². Les mélanocytes possèdent des mélanosomes, organites dédiés à la production et au stockage de la mélanine, et sont capables de transférer ces mélanosomes aux kératinocytes. Les mélanosomes sont retrouvés autour du noyau des kératinocytes où ils forment une barrière protectrice contre les UV⁷. De par leur localisation cutanée, les mélanocytes font partie des cellules les plus exposées aux UV et donc aux dommages de l'ADN qu'ils induisent.

L'exposition aux UV produit des mutations de l'ADN, typiquement des transitions C>T (induites par les UVB) et des transversions G>T (induites par les UVA)¹. Le mélanome est un des types de cancer dans lequel on retrouve la plus grande fréquence de mutations somatiques (Fig. 3) et ces mutations présentent typiquement une signature de dommages de l'ADN induits par les UV⁵. Cependant, toutes ne participent pas au développement tumoral. On parle de mutation conductrice (*driver mutation*) pour désigner les mutations qui participent à la mélanomagenèse et de mutations passagère (*passenger mutations*) pour désigner celles qui n'y participent pas. Le développement du mélanome nécessite l'accumulation séquentielle de plusieurs mutations conductrices qui activent l'expression de voies oncogéniques ou qui inactivent des gènes suppresseurs de tumeurs.

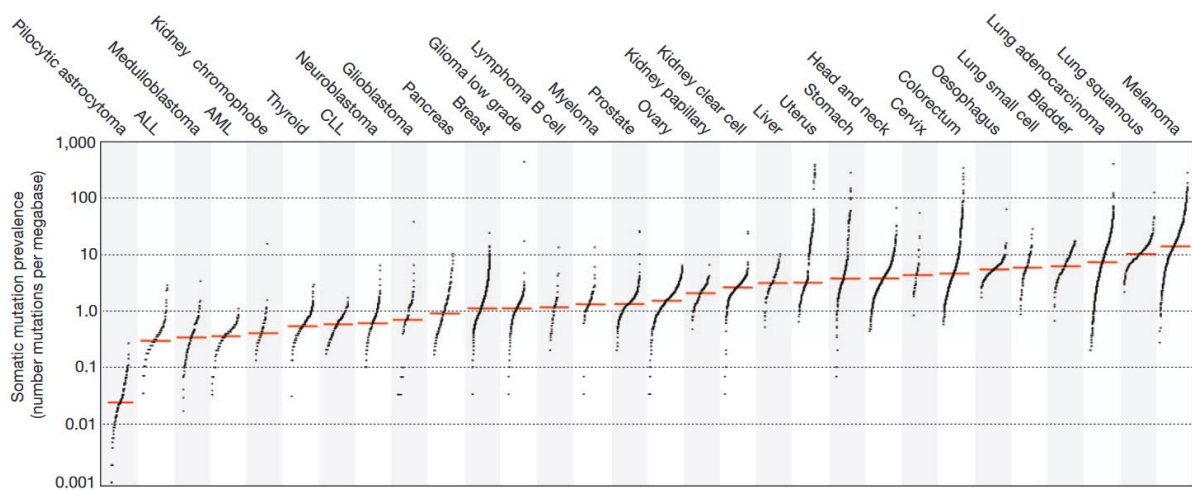


Figure 3: Fréquence de mutations somatiques observées par type de cancer

Nombre de mutations somatiques mesurées par mégabase d'ADN dans les cellules tumorales. Le mélanome est le type de cancer dans lequel on retrouve la plus grande fréquence de mutation. Extrait de Alexandrov et al.⁵

Le développement précoce du mélanome se décrit classiquement selon le modèle de Clark⁹, basé sur des observations histologiques (Fig. 4). Ce modèle décrit le développement du mélanome en quatre étapes en partant d'un *naevus* sain acquis (à noter que moins de 30% des mélanomes sont associés histologiquement à un *naevus*¹⁰) :

- *Naevus* dysplasique : lésion pré-maligne pouvant régresser spontanément.
- Phase de croissance radiale (RGP) : croissance incontrôlée dans l'épiderme, signes de dédifférenciation.
- Phase de croissance verticale (VGP) : rupture de la membrane basale, invasion du derme.

- Mélanome métastatique : dissémination à distance *via* le système lymphatique ou les vaisseaux sanguins.

Ce modèle histologique propose un développement linéaire à partir de l'étude de plusieurs cas à des stades de développement différents. Il a le mérite de décrire clairement l'avancement de la maladie, et le risque associé, selon plusieurs stades bien caractérisés. La caractérisation génétique et moléculaire des lésions à différents stades de la maladie a permis de décrire un second modèle, qui même s'il n'emploie pas la même nomenclature, aboutit aussi à une progression relativement linéaire (Fig. 4).

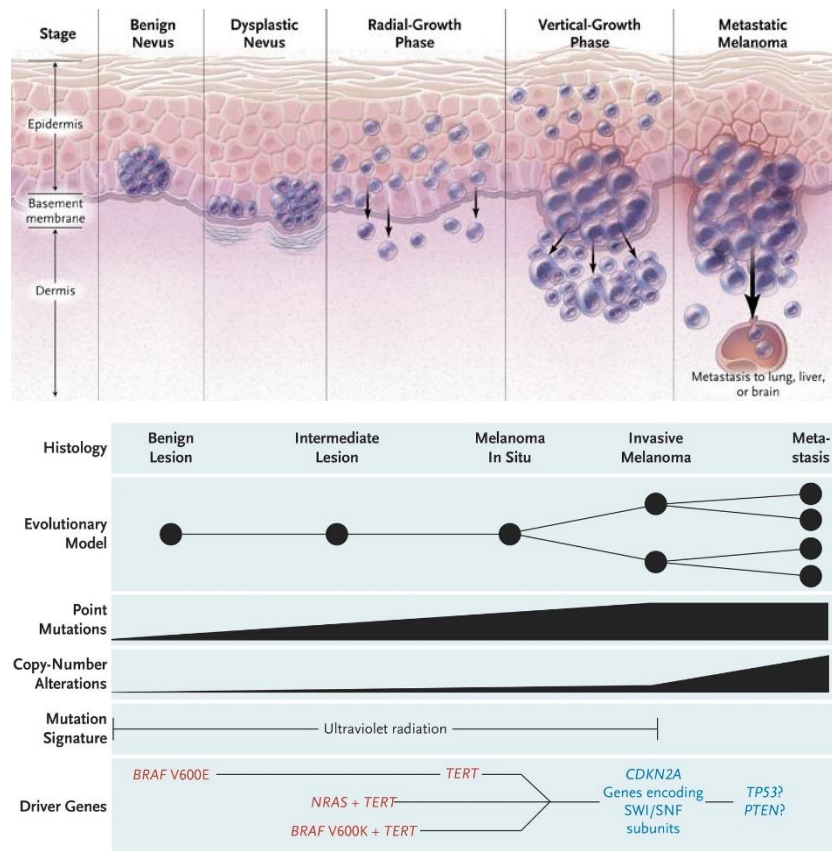


Figure 4 : Deux modèles de développement du mélanome

En haut : Développement du mélanome selon le modèle de Clark basé sur l'observation histologique : depuis un nævus sain, le mélanome se développe selon quatre stades : le nævus dysplasique, la phase de croissance radiale, la phase de croissance verticale et la dissémination métastatique. Extrait de Miller *et al.*¹¹

En bas : Développement du mélanome selon un modèle génétique : depuis une lésion bénigne, l'accumulation séquentielle de mutations favorise le développement du mélanome *in situ* via un état intermédiaire puis progresse vers un phénotype invasif qui aboutit au stade métastatique. Extrait de Shain *et al.*¹²

2.1. Les mutations initiatrices du mélanome

Les mutations les plus précoces dans le développement du mélanome affectent majoritairement la voie des MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) et ont pour effet de favoriser la prolifération et la survie des cellules de mélanome. Ces mutations affectent le plus souvent les gènes *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*, 50%) et *NRAS* (*NRAS proto-oncogene, GTPase*, 26%) et sont mutuellement exclusives (Tableau 1).

Parmi les mélanomes mutés pour *BRAF*, 90% arborent une substitution de la valine en position 600 par un acide glutamique (*BRAF^{V600E}*). Cette mutation affecte le domaine d'activation de la protéine et mène à une activation constitutive de la kinase BRAF. Les mutations précoces de *BRAF* ne suffisent pas au développement du mélanome car 80% des *naevi* sains possèdent la mutation *BRAF^{V600E}* mais très peu évoluent en mélanome². La mutation *BRAF^{V600E}* est plutôt retrouvée chez les patients relativement jeunes, qui ont été exposés au soleil tôt dans leur vie et de façon intermittente, et qui sont prônes aux *naevi*. Ces patients développent typiquement un mélanome qui croît superficiellement et localisé majoritairement au niveau du tronc⁷.

Les mutations de *BRAF* autres que *BRAF^{V600E}* ainsi que celles affectant *NRAS* sont caractéristiques des patients ayant eu une exposition chronique au soleil, qui développent un mélanome plus tardivement, particulièrement au niveau de la tête et du cou et sans lien avec le nombre de *naevi*^{1,7}. *NRAS* est une GTPase qui, lorsqu'elle est mutée, active de façon constitutive les voies MAPK et PIP3K (Phosphoinositide 3-kinase) / AKT (*AKT Serine/Threonine Kinase 1*)² (Fig. 5).

Les mutations de *NFI* (*Neurofibromin 1*) sont aussi fréquemment retrouvées dans le mélanome (17%) et elles mènent à une activation indirecte de la voie RAS puisque NF1 est une GAP (*GTPase-activating protein*) qui régule négativement cette voie de signalisation. Moins de 10% des mélanomes ne possèdent pas de mutation affectant *BRAF*, *RAS* et *NFI* et sont donc dépendants d'autres mécanismes que l'activation constitutive de la voie des MAPK (Fig. 5).

2.2. Les mutations secondaires

Outre les mutations initiatrices, des altérations supplémentaires sont nécessaires pour que la lésion progresse, comme des mutations activatrices dans le promoteur de *TERT*

(*Telomerase reverse-transcriptase*) qui sont retrouvées dans environ 28% des mélanomes cutanés¹³. TERT est une reverse transcriptase impliquée dans l'allongement des télomères. Son activation « immortalise » les cellules cancéreuses en maintenant la longueur des télomères au cours des divisions cellulaires. Les mutations du promoteur de *TERT* ne sont pas observées dans les *nævi* bénins mais elles apparaissent relativement tôt dans le développement du mélanome, dès le stade *in situ*¹².

Des mutations dans des gènes impliqués dans le cycle cellulaire ou le remodelage de la chromatine sont aussi nécessaires pour que le mélanome acquière un pouvoir invasif (Tableau 1). Le gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) est par exemple fréquemment muté. Il code pour deux protéines : (i) p16^{INK4a}, un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines CDK4 et CDK6 et freine donc le cycle cellulaire et (ii) p14^{ARF} qui stabilise indirectement p53 en séquestrant MDM2 (*Murine double minute 2*), une E3 ubiquitine ligase qui adresse p53 vers le cytoplasme pour dégradation protéasomale¹¹. Les mutations inactivatrices et les délétions de *CDKN2A* favorisent donc la progression dans le cycle cellulaire et la survie des cellules de mélanome (Fig. 5). Les mutations de *CDKN2A* sont caractéristiques des mélanomes dits « familiaux ». En effet, jusqu'à 40% des patients présentent des mutations germinales de *CDKN2A* parmi les familles où le nombre de cas est supérieur ou égal à trois¹⁴.

Les gènes *ARID1A* (*AT-rich interaction domain 1A*), *ARID1B* et *ARID2* sont régulièrement mutés dans les cas de mélanome invasif⁷. Ces gènes codent pour des protéines qui font partie du complexe SWI/SNF de remodelage de la chromatine qui agit comme un suppresseur de tumeurs dans le mélanome¹⁵. En effet, les mutations affectant le complexe SWI/SNF coïncident avec des aberrations chromosomiques typiques des stades avancés du mélanome⁷.

2.3. Les mutations tardives

Les mutations de *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*) et *TP53* sont majoritairement retrouvées dans les cas de mélanome invasif ou métastatique⁷, ce qui pourrait indiquer que ces mutations sont impliquées dans l'avancement vers les stades tardifs de la maladie. PTEN est une phosphatase qui inhibe la formation de Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP₃), sa perte de fonction entraîne donc une accumulation de PIP₃ et une augmentation de la phosphorylation et donc de l'activation d'AKT, ce qui favorise la survie et

la migration cellulaire¹¹. Les mutations de *NRAS* et de *PTEN* ont un effet redondant sur l'activation d'AKT (Fig. 5), ce qui peut expliquer que les mutations de ces deux gènes sont rarement retrouvées ensemble.

Le gène *TP53*, le « gardien du génome » est muté de façon moins fréquente dans le mélanome que dans les autres types de cancer (environ 50% pan-cancer). Il est muté dans environ 20% des cas de mélanome métastatiques et de façon encore moins fréquente dans le mélanome primaire⁷, ce qui indique que les mutations de *TP53* arrivent tard dans le développement du mélanome et pourraient favoriser le processus métastatique. Comme nous l'avons vu, les délétions et les mutations inactivatrices de *CDKN2A* peuvent aussi induire l'inhibition de p53 par MDM2. Enfin, une surexpression de MDM4 est retrouvée dans environ 65% des mélanomes¹⁶, ce qui inactive p53 par les mêmes mécanismes que MDM2. Ainsi, p53 est fréquemment inhibé dans le mélanome, indépendamment de son statut mutationnel.

| Voie de signalisation | Gène | Mutations les plus fréquentes | Stade | Rôle | Fréquence |
|------------------------------------|----------------------|--|---------------------------------|---------------------|-----------|
| MAPK | <i>BRAF</i> | V600E (90%), V600K, K601E, G469A | <i>Nævus</i> | Initiation | 50% |
| | <i>NRAS</i> | Q61R/K/L | Intermédiaire et <i>in situ</i> | Initiation | 26% |
| | <i>NF1</i> | Mutations inactivatrices variées sur l'ensemble du gène et délétions | Intermédiaire et <i>in situ</i> | Initiation | 17% |
| Telomérase | <i>TERT</i> | Mutations dans la région h19 du promoteur | <i>In situ</i> | Progression | 28% |
| Cycle cellulaire | <i>CDKN2A</i> | Délétions et mutations inactivatrices variées sur la région codante | Invasif | Progression | 31% |
| Remodelage de la chromatine | <i>ARID1A</i> | Mutations inactivatrices variées sur l'ensemble du gène | Invasif | Progression | 9% |
| | <i>ARID1B</i> | | | | 8% |
| | <i>ARID2</i> | | | | 14% |
| PI3K | <i>PTEN</i> | Mutations inactivatrices variées sur l'ensemble du gène | Invasif et métastatique | Progression avancée | 13% |
| p53 | <i>TP53</i> | Mutations inactivatrices variées sur l'ensemble du gène | Invasif et métastatique | Progression avancée | 18% |

Tableau 1: Mutations conductrices fréquemment retrouvées dans le mélanome cutané

Adapté de Shain *et al.*⁷. Fréquences des mutations référencées dans la base de données cBioPortal (www.cbioportal.org) parmi les cas de mélanome cutané.

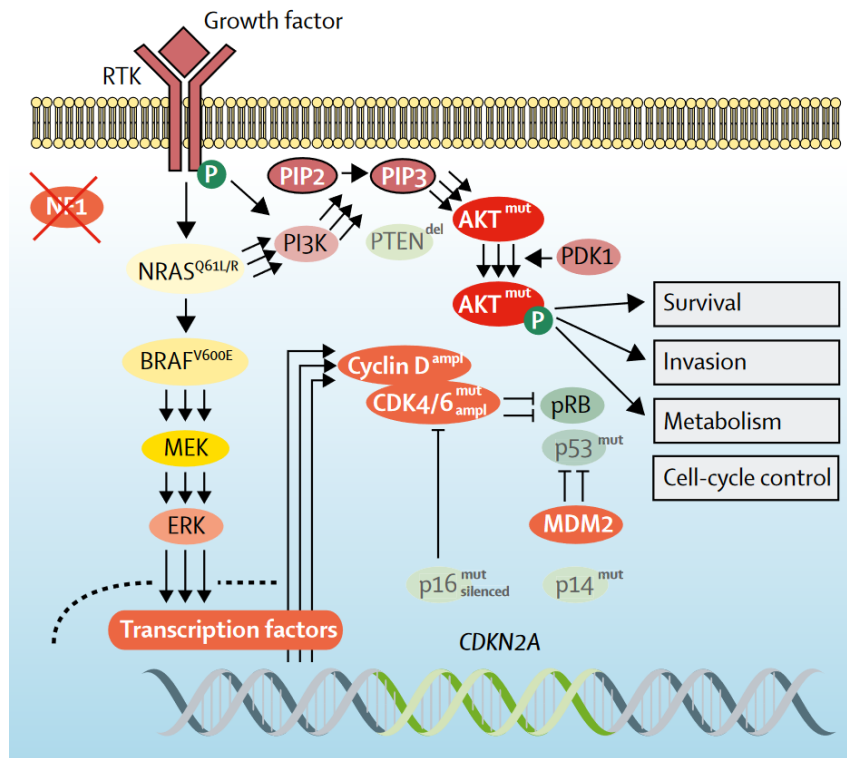


Figure 5: Voies de signalisation altérées dans le mélanome
 Extrait de Schadendorf et al.¹

3. Prise en charge et traitements

Le mélanome est très majoritairement (environ 90%) diagnostiqué aux stades précoces sans traces de métastases¹⁷. Quand il est détecté et pris en charge aussi précocement, le mélanome *in situ* est plutôt de bon pronostic puisque la résection chirurgicale suffit le plus souvent et la survie spécifique à 10 ans est comprise entre 75 et 95%¹⁷. En revanche aux stades localement avancé ou métastatique le pronostic est beaucoup moins favorable pour les patients. Durant les dix dernières années, la prise en charge du mélanome avancé a été révolutionnée par la mise sur le marché des thérapies ciblées et des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (ICI) qui, ensemble, constituent aujourd’hui la première ligne de traitement.

Les thérapies ciblées visent à inhiber la voie de signalisation MAPK constitutivement active dans les cellules de mélanome dont *BRAF* est muté. Ainsi, le dabrafenib et le vemurafenib sont des inhibiteurs de BRAF (BRAFi) tandis que le tramétinib et le cobimétinib sont des inhibiteurs de MEK (MEKi) (Fig. 6). Les BRAFi et les MEKi sont aujourd’hui utilisés exclusivement en combinaison sauf en cas de contre-indication majeure pour les MEKi. En

effet, la combinaison vise à éviter les résistances secondaires après BRAFi et elle a démontré son efficacité supérieure en comparaison avec les BRAFi utilisés en monothérapie¹⁸.

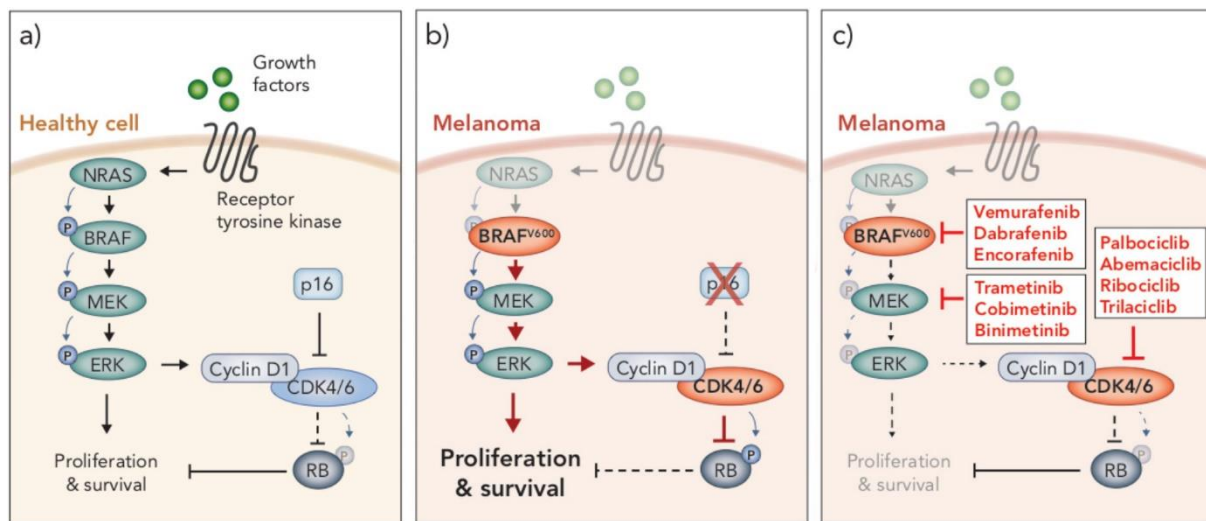


Figure 6 : Mécanismes d'action des thérapies ciblées utilisées dans le mélanome

a) Dans les cellules saines, les facteurs de croissance les récepteurs à tyrosine kinase membranaire qui induisent la signalisation MAPK/ERK. b) Les mutations de type BRAFV⁶⁰⁰ et la perte de p16 sont fréquentes dans le mélanome. c) Inhibiteurs de BRAF, MEK et CDK4/6 utilisés en clinique. Extrait de Lelliott *et al.*¹⁹

Les ICI visent à bloquer l'interaction entre des récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T et leurs ligands afin de réactiver les lymphocytes T spécifiques des cellules tumorales pour qu'ils puissent les reconnaître et les détruire. Ainsi, l'ipilimumab est un anticorps bloquant CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), et qui empêche son interaction avec ses ligands CD80 et CD86. Ainsi, CD80 et CD86 peuvent interagir avec CD28, une molécule de costimulation positive des lymphocytes T CD8⁺ (CD8). Le nivolumab et le pembrolizumab sont des anticorps bloquant PD-1 (*Programmed cell death 1*) et empêchent son interaction avec ses ligands PD-L1 (*Programmed cell death 1 ligand 1*) et PD-L2 (*Programmed cell death 1 ligand 2*)²⁰. Les mécanismes d'action des ICI seront développés dans le chap.II§2.

3.1.Diagnostic

Le diagnostic du mélanome se fait le plus souvent en médecine de ville à l'initiative du patient qui identifie un *naevus* anormal ou par un suivi dermatologique régulier²¹. L'examen des *naevi* se fait selon cinq critères regroupés sous l'acronyme ABCDE : Asymétrie, Bords irréguliers, Couleur hétérogène, Diamètre >6mm, Evolution dans le temps. Un *naevus* est considéré suspect si au moins deux de ces critères sont retrouvés ou s'il est cliniquement différent des autres *naevi* du patient par sa forme, sa couleur ou son épaisseur. En cas de lésion

suspecte, le patient est dirigé vers un dermatologue. Si celui-ci confirme la suspicion de mélanome, il procède à une exérèse de la lésion qui sera analysée par examen anatomopathologique et confirmera ou infirmera le diagnostic²².

Approximativement 70% des mélanomes peuvent être identifiés à l'œil nu au cours d'un examen clinique par un dermatologue. Cette proportion atteint 90% avec l'usage d'un dermoscope¹. Cet instrument optique grossissant et équipé d'une source de lumière est tenu à la main, il permet d'observer précisément les lésions suspectes. Cependant, on estime que 10% des mélanomes ne sont pas détectés par ces méthodes.

Le mélanome est un cancer qui peut évoluer et se disséminer très rapidement. C'est pourquoi certains patients peuvent développer une maladie métastatique même après résection totale de la tumeur primaire quand d'autres sont diagnostiqués à un stade déjà avancé.

3.2. Classification

La classification du mélanome se fait selon des critères histopathologiques. La plus utilisée est la classification « TNM » proposée par l'AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) et adoptée internationalement. Elle décrit la progression de la maladie selon trois critères²³ : TNM.

Critère T : l'épaisseur verticale de la tumeur primaire mesurée selon l'indice de Breslow (épaisseur verticale maximale) ainsi que l'éventuelle ulcération.

Critère N : la présence de métastases satellitaire à moins de 2 cm de la tumeur primaire, de métastases « en transit » localisées dans la peau à 2 cm entre la tumeur primaire et le premier ganglion drainant, l'invasion des ganglions lymphatiques régionaux par des micro-métastases détectées par biopsies (non détectables par palpation ou imagerie) ou des macro-métastases détectées par examen clinique ou imagerie.

Critère M : la présence de métastases dans la peau, le tissu sous-cutané ou un ganglion distant, la présence de métastase dans les poumons, dans d'autres organes internes ou dans le système nerveux central.

L'évaluation de ces trois critères permet de classer la maladie en quatre stades et plusieurs sous-stades intermédiaires en fonction desquels sont décidées les stratégies thérapeutiques²³ (Fig. 7).

| Definition | |
|-------------------------|---|
| T classification | |
| T1 | |
| A | <0.8 mm thickness, no ulceration |
| B | 0.8-1 mm thickness (<0.8 mm with ulceration) |
| T2 | |
| A | >1-2 mm thickness, no ulceration |
| B | >1-2 mm thickness with ulceration |
| T3 | |
| A | >2-4 mm thickness, no ulceration |
| B | >2-4 mm thickness with ulceration |
| T4 | |
| A | >4 mm thickness, no ulceration |
| B | >4 mm thickness with ulceration |
| N classification | |
| N0 | No regional lymph nodes affected |
| N1a-c | One lymph node affected, micro-metastasis or macro-metastasis, or in-transit or satellite metastasis |
| N2a-c | Two to three lymph nodes affected, or at least one lymph node affected and in-transit or satellite metastasis |
| N3a-c | At least four lymph nodes affected or at least two lymph nodes affected and matted nodes |
| M classification | |
| M0 | No evidence of distant metastasis |
| M1 | |
| a | Distant metastasis to skin |
| b | Distant metastasis to lung |
| c | Distant non-CNS metastasis |
| d | CNS metastasis |

| | T classification | N classification | M classification |
|----------|------------------|-----------------------|------------------|
| Stage 0 | Tis | N0 | M0 |
| Stage 1A | T1a or T1b | N0 | M0 |
| Stage 1B | T2a | N0 | M0 |
| Stage 2A | T2b or T3a | N0 | M0 |
| Stage 2B | T3b, T4a, or T4b | N0 | M0 |
| Stage 2C | T0 | N1b and N1c | M0 |
| Stage 3A | T1a-b to T2a | N1a of N2a | M0 |
| Stage 3B | T0 | N2b, N2c, N3b, or N3c | M0 |
| Stage 3B | T1a-b to T2a | N1b-c or N2b | M0 |
| Stage 3B | T2b-T3a | N1a-N2b | M0 |
| Stage 3C | T1a-T3a | N2c or N3a-c | M0 |
| Stage 3C | T3b-T4a | Any N ≥ N1 | M0 |
| Stage 3C | T4b | N1a-N2c | M0 |
| Stage 3D | T4b | N3a-c | M0 |
| Stage 4 | Any T and Tis | Any N | M1 |

Figure 7: Classification « TNM » proposée par l'AJCC (8^{ième} édition)

L'évaluation des trois critères (tableau de gauche) que sont : l'épaisseur et l'éventuelle ulcération de la tumeur primaire (T), les métastases au niveau des ganglions drainants (N) et les métastases à distance (M) permet de déterminer le stade (de 0 à IV) du mélanome (tableau de droite). Extrait de Schadendorf *et al.*¹

1.1. Traitements

Historiquement, les patients atteints de mélanome avancé ne tirent pas de bénéfice des thérapies anticancéreuses conventionnelles que sont les chimiothérapies et radiothérapies⁴. En effet, la survie globale associée est inférieure à 10% cinq ans après induction du traitement. Cependant les chimiothérapies et radiothérapies gardent une place importante dans le soin palliatif des patients dont la maladie est réfractaire aux traitements⁴. Depuis 2011, l'apparition

des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (décrits en détail dans le chap.II§2) et des thérapies ciblées ont radicalement amélioré la survie des patients et ces stratégies sont aujourd'hui utilisées en adjuvant de la résection chirurgicale et en première ligne de traitement du mélanome avancé. Les recommandations pour le traitement du mélanome peuvent varier sensiblement entre les différentes agences nationales de santé. Ci-après sont présentées les recommandations de l'ESMO¹⁸ (*European Society for Medical Oncology*) publiées en 2019 ainsi que l'arbre de décision proposé par le Dictionnaire Vidal²⁴ à destination des professionnels de santé en France (Fig. 9).

1.1.1. Mélanome localisé

Dans le cas de mélanome résecable, la première ligne de traitement est l'excision totale de la tumeur avec une marge de sécurité déterminée selon l'indice de Breslow¹⁸ :

- Mélanome in situ : marge de 0,5 cm
- Breslow ≤ 2 mm : marge de 1 cm
- Breslow ≥ 2 mm : marge de 2 cm

La biopsie du ganglion sentinelle (drainant la tumeur) est recommandée à partir d'un indice de Breslow de 0,8 mm ou dans le cas d'une tumeur dont l'épaisseur est inférieure à 0,8 mm mais qui est ulcérée¹⁸. Cette biopsie est importante pour préciser l'avancement de la maladie et pour choisir la stratégie thérapeutique adjuvante. La dissection totale du ganglion sentinelle était pratiquée jusqu'à récemment mais les recommandations actuelles la limite aux cas pour lesquels est détectée une métastase macroscopique dans un ganglion non sentinelle. Dans ce cas précis, la dissection complète du ganglion métastatique et du ganglion sentinelle est préconisée¹⁸. Les patients de stades IIb, IIc et III opérables ont des risques de rechute après résection de la tumeur et les thérapies adjuvantes sont administrées après la chirurgie afin de diminuer ce risque et d'augmenter la survie globale des patients.

Dans le cas particulier d'une tumeur primaire non opérable au niveau d'un membre, sans métastases autres que satellitaire ou « en-transit », le patient peut être traité avec la combinaison de melphalan et de TNF (*Tumor necrosis factor*) par perfusion de membre isolé¹⁸ (*cf.* chap.III§2.1 et Fig. 28).

1.1.2. Thérapies adjuvantes

Les traitements de référence en thérapie adjuvante sont les anticorps anti-PD-1 : nivolumab ou pembrolizumab ainsi que les thérapies ciblées visant BRAF (dabrafenib) et MEK (tramétinib). L'analyse génétique de la tumeur primaire permet d'établir le statut mutationnel de *BRAF* dans la tumeur et oriente le choix du traitement :

- Pour les patients dont la tumeur n'est pas mutée pour *BRAF* (*BRAF*^{WT}), le traitement actuellement préconisé est un anticorps anti-PD-1 (nivolumab ou pembrolizumab).
- Pour les patients chez qui sont détectées des mutations de *BRAF*, les deux stratégies sont envisageables : anti-PD-1 ou BRAFi / MEKi. La décision doit se faire en concertation avec le patient en fonction des caractéristiques de ce dernier et de la toxicité des traitements envisagés¹⁸.
- Enfin l'administration d'IFN- α (Interféron alpha) peut être proposée aux patients pour lesquels les immunothérapies et les thérapies ciblées ne sont pas disponibles, par exemple pour un mélanome de stade IIc ulcéré¹⁸.

1.1.3. Mélanome avancé ou métastatique

1.1.3.1. Stade IV résecable

Certains patients présentent un mélanome de stade IV oligométastatique : un faible nombre de métastases localisées (non diffuses) et une croissance tumorale lente. Si les métastases sont opérables, la résection est envisageable mais doit être suivie par une stratégie adjuvante selon les mêmes critères que les stades moins avancées (*cf.* chap.I§3.3.2)¹⁸.

Un essai clinique de phase II récent compare la bithérapie nivolumab + ipilimumab avec le nivolumab en monothérapie ou un placebo comme traitement adjuvant chez 167 patients atteints de mélanome de stade IV sans signe de maladie après résection complète ou radiothérapie. Cette étude montre un net bénéfice de survie sans récurrence à 4 ans chez les patients traités avec la bithérapie (64,2%) comparés avec ceux traités par monothérapie (31,4%) ou le placebo (15,0%)²⁵. Sans surprise la bithérapie est associée à une plus grande toxicité mais à l'avenir, elle pourrait être proposée à cette population de patients pour lesquels le risque de rechute est très élevé.

1.1.3.2. Stade III et IV non résecables

L'ESMO recommande l'inclusion dans un essai clinique en première intention pour les patients atteints de mélanome avancé non résecable¹⁸. En effet, bien que la mise sur le marché des ICI et des thérapies ciblées a considérablement amélioré l'espérance de vie des patients, le pronostic reste relativement faible. Hors essai clinique, la première ligne de traitement est dictée par le statut mutationnel de *BRAF* :

- Pour les patients dont la tumeur est *BRAF*^{WT}, les ICI sont préconisés : anti-PD-1 (nivolumab ou pembrolizumab) ou la combinaison anti-PD-1 et anti-CTLA-4 (nivolumab + ipilimumab).
- Pour les patients chez qui sont détectées des mutations de *BRAF*, les deux stratégies sont envisageables : ICI ou BRAFi / MEKi en combinaison. Il n'existe pas de comparaison directe randomisée entre ceux deux stratégies mais les méta-analyses suggèrent que les ICI permettent une meilleure survie à long terme²⁶. Les patients dont la masse tumorale est importante ou dont la progression est rapide sont donc traités par BRAFi / MEKi en première intention pour maximiser les chances de survie, tandis que les patients dont la masse et/ou la progression tumorale sont moindres sont traités par ICI en première intention.

Quel que soit le statut mutationnel de *BRAF*, le choix entre la monothérapie anti-PD-1 et la bithérapie anti-PD-1 + anti-CTLA-4 n'est pas évident. En effet, l'essai clinique randomisé de phase III « Checkmate 067 » a bien démontré la meilleure efficacité du nivolumab et de la bithérapie nivolumab + ipilimumab comparés à l'ipilimumab seul. Cependant cet essai n'a pas été pensé pour comparer directement le nivolumab et la bithérapie et il n'a donc pas la puissance statistique requise²⁷. Les études descriptives suggèrent une meilleure efficacité avec la bithérapie (Fig. 8) mais les différences de PFS et d'OS sont faibles et se font au prix d'une toxicité plus élevée²⁷. De plus, il n'y a pas de biomarqueur permettant de déterminer chez quels patients la bithérapie apporte un réel bénéfice. En conséquence, le choix entre les deux stratégies doit se faire selon plusieurs paramètres dont l'expertise du centre de soin, l'état général du patient évalué notamment par l'échelle de performance ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*), les niveaux de lactate déshydrogénase (LDH) plasmatique, la présence ou non de métastases cérébrales (*cf.* chap.I§3.3.3.3) et il doit donc être personnalisé pour chaque patient¹⁸.

En seconde ligne de traitement, l'inclusion dans un essai clinique devrait être privilégiée. Pour les patients *BRAF*^{WT}, les options hors essai clinique sont limitées. Ceux traités par anti-PD-1 seul en première ligne peuvent être traités par anti-CTLA-4 seul ou en bithérapie en deuxième ligne. Les patients *BRAF* muté peuvent être traités par ICI en deuxième ligne après une première ligne de thérapie ciblée et inversement¹⁸.

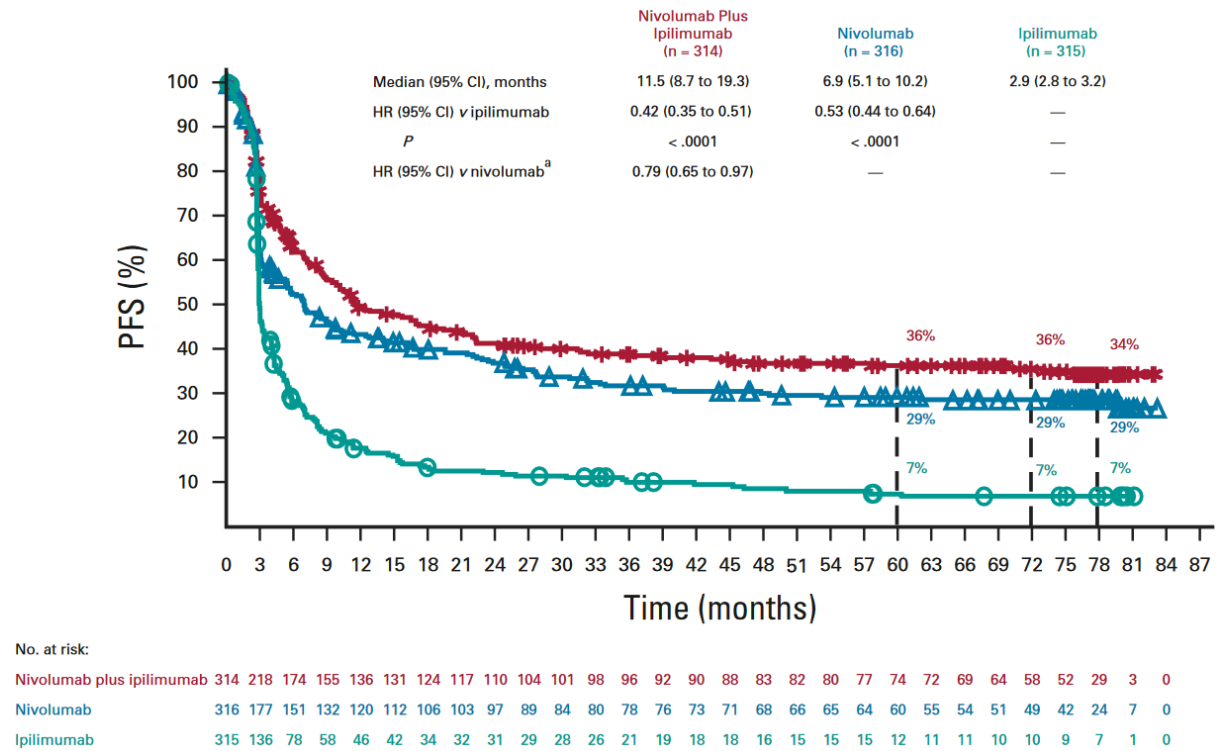


Figure 8: Survie sans progression des patients traités par ICI

Survie sans progression (PFS) des patients traités par ipilimumab, nivolumab ou la combinaison des deux. Les patients ont été suivis pendant au moins 77 mois. ^a : Analyse descriptive ; HR : Hazard ratio. Extrait de Wolchok *et al.*²⁷

1.1.3.3. Présence de métastases cérébrales

Pour les patients présentant des métastases cérébrales, le pronostic est faible mais plusieurs options sont envisageables : la neurochirurgie, la stéréo-radiothérapie, les BRAFi / MEKi et les ICI. La neurochirurgie est pratiquée lorsque les métastases sont volumineuses et accessibles et lorsque l'origine du cancer n'est pas connue. Pour les patients présentant un faible nombre (< 5) de petites (< 3 cm) métastases asymptomatiques, la stéréo-radiothérapie peut être utilisée en première ligne. Pour les autres patients avec des métastases asymptomatiques, la bithérapie nivolumab + ipilimumab semble être la stratégie la plus efficace, quel que soit le statut *BRAF*²⁸. En revanche, la présence de métastases symptomatiques est associée à une mauvaise réponse à la bithérapie^{28,29}. Dans ce cas les patients seront traités par BRAFi / MEKi

ou par anti-PD1. Les patients dont le traitement systémique échoue peuvent bénéficier de la stéréo-radiothérapie si les métastases sont peu nombreuses et de petite taille. En dernière intention, la radiothérapie du cerveau entier peut être envisagée. Le pronostic est alors très faible et le traitement palliatif doit être discuté et préparé avec le patient¹⁸.



Figure 9: Arbre de décision pour le traitement du mélanome selon le Dictionnaire Vidal
Extrait de VIDAL Campus²⁴

Chapitre II : L'immunité du mélanome

Le système immunitaire est un ensemble complexe d'organes, de cellules et de molécules solubles qui ont évolué ensemble pour maintenir l'homéostasie de l'organisme en :

- i. Le protégeant contre l'invasion de micro-organismes pathogènes (bactéries, virus, champignons, parasites) : le « non-soi »³⁰
- ii. Reconnaisant et en détruisant les cellules quand elles deviennent malignes³¹

À ces deux missions s'ajoutent les responsabilités qui en découlent. En effet, le système immunitaire est un outil très puissant et une réponse inappropriée ou incontrôlée peut être dangereuse pour l'organisme. L'inflammation doit être résolue dès que l'infection est contrôlée au risque de s'emballer de déclencher une inflammation chronique, une perte de fonction du tissu ou un choc cytokinique potentiellement mortel³². De plus, les allergies ainsi que les maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes découlent d'une activation inappropriée du système immunitaire dirigée contre des cellules du « soi » ou des antigènes non pathogènes. Ainsi, en plus de s'assurer de la défense de l'organisme contre les envahisseurs et l'apparition de tumeurs, le système immunitaire doit veiller à :

- iii. Induire une tolérance aux antigènes du « soi ».
- iv. Ne pas sur-réagir aux antigènes non pathogènes comme les allergènes et le microbiote.
- v. Résoudre l'inflammation quand elle n'a plus lieu d'être et réparer les tissus.

Le système immunitaire possède deux branches : l'immunité innée, dont dispose tous les organismes multicellulaires, et l'immunité adaptative, retrouvée uniquement chez les vertébrés³³. La plupart des cellules du système immunitaire sont issues de cellules souches hématopoïétiques (HSC) situées dans la moelle osseuse et qui se différencient en trois grandes lignées³⁴ (Fig. 10) :

- La lignée lymphoïde dont sont issus les lymphocytes T, les lymphocytes B et les ILC (*Innate lymphoid cells*) dont les lymphocytes NK (*Natural killer cell*).
- La lignée myéloïde dont sont issus les monocytes, les cellules dendritiques, les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles.
- La lignée érythrocytaire dont sont issus les érythrocytes et les plaquettes.

L'immunité innée fait principalement intervenir les cellules myéloïdes et les ILC ainsi que des molécules solubles comme le système du complément et les interférons de type I. L'immunité adaptative quant à elle, fait principalement intervenir les lymphocytes T et B ainsi que les immunoglobulines. Enfin les cellules présentatrices d'antigènes (les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B) se chargent de faire le lien entre immunité innée et adaptative³⁰. L'intégralité du système immunitaire peut être impliqué dans la réponse antitumorale. Certaines cellules ont un rôle antitumoral tandis que d'autres favorisent le développement de la tumeur³⁵.

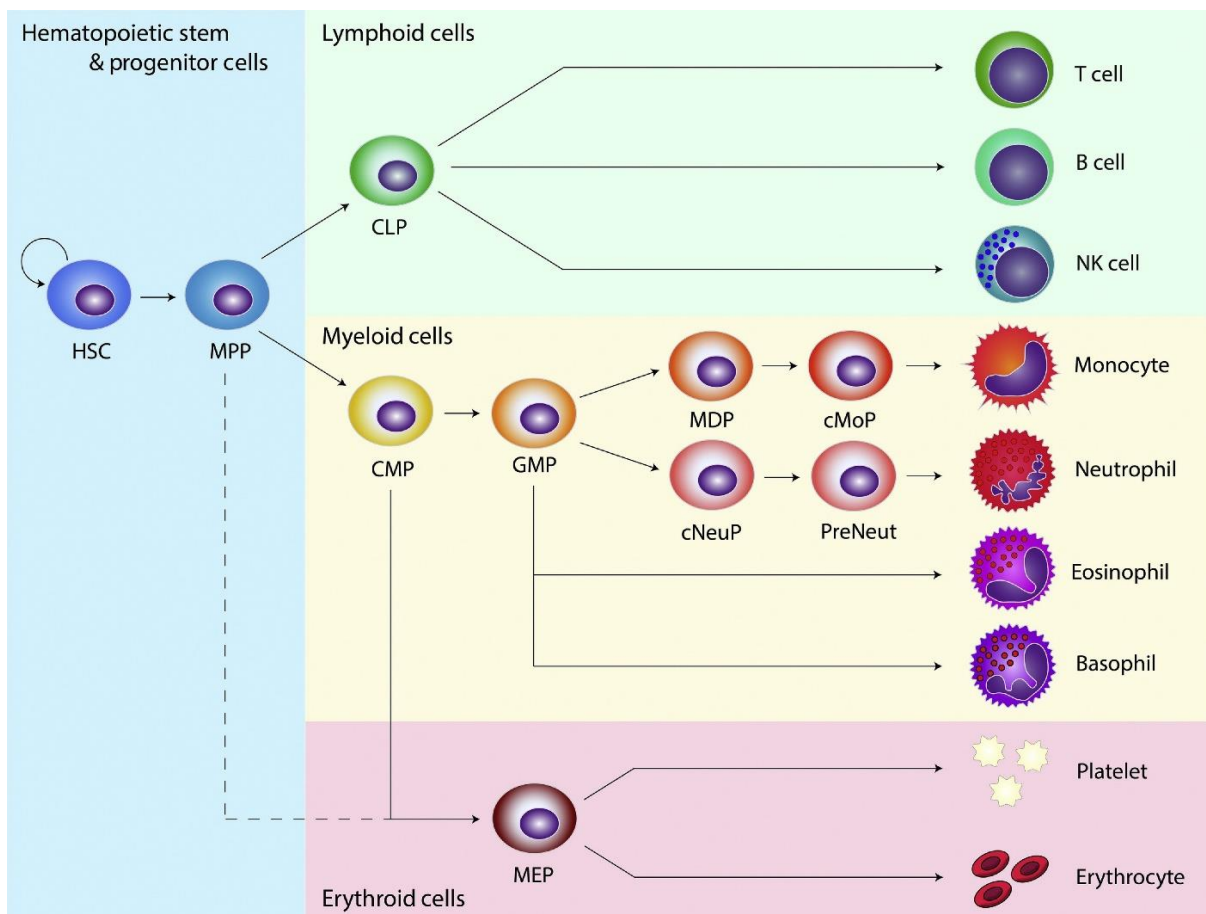


Figure 10: Arbre de différenciation des cellules hématopoïétiques

Toutes les cellules hématopoïétiques se différencient à partir des cellules souches hématopoïétiques (HSC) se trouvant dans la moelle osseuse et capables d'auto-renouvellement. À partir des cellules progénitrices multipotentes (MPP), la différenciation se divise en trois branches. La lignée lymphoïde donnera les lymphocytes T, les lymphocytes B et les ILC dont les NK. La lignée myéloïde donnera les monocytes, les cellules dendritiques (non représentées), les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. La lignée érythrocytaire donnera les érythrocytes et les plaquettes. CLP: *Common lymphoid progenitor*; CMP: *Common myeloid progenitor*; GMP: *Granulocyte and macrophage progenitor*; MDP: *Monocyte derived progenitor*; cMoP: *Common monocyte progenitor*; cNeuP: *Common neutrophil progenitor*; PreNeut: *Pre-neutrophil*; MEP: *Megakaryocyte erythroid progenitor*. Extrait de Lee *et al.*³⁶

1. L'immunité antitumorale

Paul Ehrlich a vraisemblablement été le premier à envisager que le système immunitaire était capable de protéger l'hôte contre l'apparition de néoplasmes³⁷. En 1909, il propose que les protéines des cellules tumorales sont exprimées de façon anormale, ce qui les différencie des cellules saines et permet au système immunitaire de les reconnaître et les détruire. L'idée n'est donc pas nouvelle mais il faudra attendre la fin du siècle pour qu'elle soit démontrée. Le rôle de l'immunité dans le cancer a ainsi été longtemps ignoré³⁸.

En se basant sur les travaux de Paul Ehrlich, Frank Macfarlane Burnet et Lewis Thomas proposent l'hypothèse de l'« immunosurveillance » dans les années 50. Selon eux, les cellules tumorales possèdent des antigènes aberrants qui permettent aux cellules immunitaires de les reconnaître et de les détruire, préservant ainsi l'homéostasie de l'organisme^{39,40}. Ainsi, Burnet formule le concept d'immunosurveillance⁴¹ :

« Chez les grands animaux à longue durée de vie, comme la plupart des vertébrés à sang chaud, les changements génétiques non héréditaires doivent être fréquents dans les cellules somatiques et une proportion de ces changements représentera une étape vers la malignité. L'existence d'un mécanisme d'élimination ou d'inactivation de ces mutations potentiellement dangereuses est une nécessité évolutive et il est supposé que ce mécanisme soit de nature immunologique. »

Cependant, devant les difficultés à vérifier expérimentalement ce concept, il sera peu à peu abandonné⁴². Le développement de lignées de souris consanguines ainsi que de techniques permettant l'induction chimique ou par irradiation de tumeurs chez la souris permettent de d'évaluer cette hypothèse dans les années 70. Cependant ces expériences montrent que les souris *nude* athymiques ne sont pas plus susceptibles que les souris WT au développement de cancers induits chimiquement⁴³, ce qui remet en question l'hypothèse de l'immunosurveillance. Plus tard, le constat que les souris *nude* ne sont pas complètement dépourvues de lymphocytes T fonctionnels⁴⁴ et la découverte que la production endogène d'IFN- γ ^{45,46} (Interféron gamma) et de perforine^{47,48} protègent contre la croissance de tumeurs transplantées et la formation de tumeurs spontanées ou induites chimiquement relanceront l'intérêt pour la théorie de l'immunosurveillance.

Nous décrirons brièvement les acteurs des deux branches de l'immunité antitumorale dans les paragraphes suivants.

1.1.L'immunité innée

1.1.1. Les macrophages

Les macrophages sont de véritables sentinelles dans les tissus. En cas d'invasion d'un pathogène ou de dégâts tissulaires, la détection de PAMP (*Pathogen-associated molecular pattern*) et/ou de DAMP (*Dammage-associated molecular pattern*) par leurs TLR (*Toll-like receptor*) les active, ce qui accroît leur activité de phagocytose, leur sécrétion de chimiokines et de cytokines et leur présentation antigénique⁴⁹.

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM, *Tumor-associated macrophages*) peuvent dériver de macrophages résidents dans le tissu et de macrophages issus de monocytes circulants dans le sang périphérique. Les TAM ont initialement été décrits comme étant capables de tuer et de phagocyter les cellules cancéreuses et donc d'avoir un rôle antitumoral. Il a ensuite été observé que des TAM pouvaient aussi avoir un rôle pro-tumoral en favorisant la progression des tumeurs. La classification en phénotypes M1 et M2 a ainsi été mise en place pour distinguer respectivement les TAM antitumoraux et les TAM protumoraux⁵⁰.

Les macrophages de type M1 sont des cellules pro-inflammatoires considérées comme antitumorales. Ils sont induits par l'IFN- γ et le GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) et, une fois activés, ils libèrent des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'IL-1 (Interleukine 1) et l'IL-12 qui favorisant une réponse de type Th1. Ils augmentent aussi l'expression des molécules de présentation de l'antigène à leur surface et leur expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) leur confère une activité cytotoxique directe. Les M1 peuvent être caractérisés par une expression élevée de CMH de type II et des molécules de co-stimulation CD80 et CD86.

Les macrophages de type M2 sont des cellules anti-inflammatoires, considérées comme pro-tumorales et sont induites par le M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*), l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-10. Lorsqu'elles sont activées, elles sécrètent du TGF- β (*Transforming growth factor beta*), de l'IL-10, de la prostaglandine E₂ (PGE₂) et du VEGF (*Vascular endothelium growth factor*), ce qui favorise la croissance tumorale et une réponse Th2 ou T_{reg}. Les M2

peuvent être caractérisés par l'expression de CD163, CD204, CD206 et l'expression élevée de l'arginase. L'infiltration de la tumeur par des M2 est associée à un mauvais pronostic dans plusieurs types de cancer, y compris le mélanome^{51,52}.

La classification M1/M2 est basée sur des études *in vitro* consistant à stimuler des monocytes avec des cytokines de type Th1 ou Th2⁵³ ou d'autres stimuli comme le LPS. Elle est aujourd'hui remise en question par les études de transcriptomique sur cellule unique qui ont mis en évidence que les TAM ont une grande diversité phénotypique, probablement due au tissu d'origine et au type de cancer, mais aussi à une forte hétérogénéité inter-patients⁵⁴. On parle aujourd'hui des phénotypes « M1-like » et « M2-like » comme les deux extrêmes d'un *continuum* phénotypique parmi les TAM⁵³.

1.1.2. Les neutrophiles

Les neutrophiles sont les cellules immunitaires les plus représentées dans le sang et sont les premières recrutées sur un site inflammatoire. Ils ont un rôle décisif dans la destruction des micro-organismes grâce à leur activité de phagocytose, de dégranulation et de nétose⁵⁵. La nétose est une mort cellulaire spécifique du neutrophile qui libère des filaments de chromatine décondensée et décorée de protéines granulaires antimicrobiennes dans l'espace extracellulaire. Ces filaments sont nommés NETs (*Neutrophil extracellular traps*)⁵⁵. Chez l'humain, les neutrophiles peuvent être caractérisés par l'expression de CD15 et CD16 (FcγRIII). Chez la souris, les neutrophiles sont caractérisés par l'expression des marqueurs CD1b⁺Gr1⁺Ly6G⁺LY6C^{med/low}.

Le rôle des neutrophiles dans le cancer n'est pas bien compris et ils peuvent avoir des effets ambivalents. Ils peuvent sécréter des chimiokines et cytokines qui attirent et activent les autres cellules immunitaires⁵⁶ et peuvent aussi attaquer directement les cellules cancéreuses en produisant des espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Oxygen reactive species*) et de l'adénosine triphosphate (ATP)⁵⁷. Cependant leur rôle est principalement perçu comme délétère ce qui est illustré par le fait qu'un ratio élevé du nombre de neutrophiles sur le nombre de lymphocytes dans le sang est associé à une survie moindre pour les patients atteints de cancers solides⁵⁸. Les neutrophiles peuvent favoriser la croissance tumorale et la métastase en favorisant l'angiogenèse, la migration et l'invasion. Les NETs notamment, favorisent la métastase et protègent les cellules tumorales de l'attaque des lymphocytes cytotoxiques⁵⁹.

Des études récentes démontrent toutefois que les neutrophiles peuvent être sollicités pour améliorer la réponse aux immunothérapies. Linde *et al.* ont constaté que l'injection intratumorale de TNF dans un modèle de mélanome B16 chez la souris induit le recrutement des neutrophiles⁶⁰. Ceci n'était pas suffisant pour venir à bout de la tumeur et les auteurs ont donc administré une combinaison de TNF, d'un agoniste de CD40 et d'un anticorps reconnaissant un antigène tumoral (gp75) dans l'idée de recruter (TNF) et d'activer (anti-CD40) les neutrophiles et de faciliter le ciblage des cellules tumorales (anti-gp75) afin de les détruire par ADCC (*Antibody-dependant cell cytotoxicity*). Cette combinaison induit le recrutement des neutrophiles et l'activation du système du complément dans la tumeur, ce qui aboutit à la production de ROS et l'éradication des tumeurs indépendamment des lymphocytes T⁶⁰. L'accumulation des neutrophiles dans la tumeur est associée à une meilleure réponse aux chimiothérapies et aux immunothérapies dans plusieurs modèles de cancer solides chez la souris et cet effet dépendant de l'activation de réponse aux interférons par IRF1 (*Interferon regulatory factor 1*)⁶¹. Une autre équipe a montré que les neutrophiles sont nécessaires à l'efficacité d'un transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺ (CD4) spécifiques des tumeurs de mélanome en combinaison avec un agoniste de OX40 ou un anti-CTLA-4 chez la souris⁶².

1.1.3. Les lymphocytes NK

Les NK sont spécialisés dans la détection et la destruction des cellules qui n'expriment pas le CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité). En effet, les NK possèdent des récepteurs KIR (*Killer cell immunoglobulin-like receptors*) comme NKG2A (CD159), qui, quand ils se lient au CMH, inhibent l'activation des NK^{63,64}. *A contrario*, les NK sont directement activées par la liaison des récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR) : NKp30, NKp44 et NKp46, mais aussi NKG2D (CD314), NKp80 et DNAM-1 (CD226). Ces récepteurs se lient à des ligands exprimés par les cellules stressées, infectées ou transformées de façon maligne. En sécrétant de l'IFN- γ , les NK stimulent la présentation antigénique des cellules environnantes, activent les CD8 et favorise la différenciation des CD4 vers un phénotype Th1⁶⁵ (*cf.* chap. II§1.2.4). L'absence de signaux inhibiteurs (expression du CMH) et/ou la présence de signaux activateurs (signaux de stress cellulaire) déclenche la cytotoxicité des NK médiée par le duo perforine/granzyme. Ils peuvent également induire l'apoptose des cellules tumorales via leur expression du ligand (FASL) de FAS (*Fas cell surface death receptor*), de TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) et leur production de monoxyde d'azote (NO)⁶⁶.

1.1.4. Les lymphocytes NKT

Les NKT (*Natural killer T cell*) portent des marqueurs de lignée des lymphocytes NK et T^{67,68}. Ils reconnaissent les antigènes lipidiques présentés par CD1d, une molécule de CMH-I non classique. Après reconnaissance de l'antigène par leur TCR (*T cell receptor*) semi-variant (TCR α invariant et TCR β semi-variant), elles ont une activité cytotoxique médiée par perforine/granzyme, FASL et TRAIL⁶⁹. Ils peuvent également sécréter un large panel de cytokines (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, TNF, TGF- β et GM-CSF), qui peuvent affecter et activer les DC, les macrophages, les lymphocytes NK, T et B. Malgré leur faible nombre, les NKT sont considérés comme un lien important entre l'immunité innée et l'immunité adaptative et des études ont montré leur contribution à la suppression des tumeurs chez la souris⁷⁰.

1.1.5. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont des lymphocytes T exprimant un TCR non conventionnel composé de chaînes γ et δ (contre α et β dans les lymphocytes T conventionnels). Les T $\gamma\delta$ sont activés via l'engagement du TCR par des ligands induits par le stress cellulaire (tels que CD1c, T10, T22 et les phosphoantigènes), mais aussi via d'autres récepteurs tels que les TLR (*Toll-like receptor*) et les NKR (*Natural killer receptors*)⁷¹. Ces cellules font preuve d'une grande diversité phénotypique mais elles peuvent être divisées en deux sous-ensembles en fonction de leur chaîne δ : les lymphocytes T V δ 1⁺ ont une faible activité cytotoxique mais une sécrétion considérable de cytokines (dont l'IL-4 et l'IL-17) tandis que les lymphocytes T V δ 2⁺ présentent une plus grande activité cytotoxique associée à des niveaux élevés de production d'IFN- γ et de TNF⁷¹. Alors que la contribution des T $\gamma\delta$ à la protection contre le développement de tumeurs été démontrée chez la souris⁷², leur nombre (déjà faible chez un individu sain par rapport aux lymphocytes T $\alpha\beta$) semble être diminué chez les patients atteints de mélanome⁷³. Chez les patients, leur rôle est peu décrit mais un nombre plus élevé de lymphocytes V δ 1⁺, dans le sang périphérique des patients atteints de mélanome métastatique, pourrait être associé à un plus mauvais pronostic. Ces patients présentent également un rapport V δ 1⁺/V δ 2⁺ plus élevé⁷⁴. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ génétiquement modifiés pourraient être une alternative moins toxique comparés aux lymphocytes T $\alpha\beta$ pour la thérapie cellulaire à récepteurs antigéniques chimériques (*cf.* chap.II§3.3.3), car ils produisent moins de cytokines inflammatoires tout en exerçant une activité cytotoxique similaire sur les lignées cellulaires de mélanome⁷⁵.

1.1.6. Les cellules dendritiques

L'élimination des cellules tumorales par les premiers acteurs de l'immunité innée libère des antigènes tumoraux qui activent les DC immatures (également appelées cellules de Langerhans dans la peau) et induisent leur maturation. Alors que les DC immatures ont une grande activité phagocytaire et une faible expression de CMH-I et CMH-II, les DC matures perdent leur potentiel phagocytaire et augmentent leur expression de CMH. Cela leur permet de présenter les antigènes tumoraux chargé sur les molécules CMH-I aux lymphocytes T CD8 et de présenter les CMH-II chargés d'antigène aux lymphocytes T CD4, localement ou dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS). Les DC matures qui migrent du tissu vers les OLS expriment également des molécules de co-activation et sécrètent des cytokines nécessaires à l'activation ou « priming » des lymphocytes T⁵⁰. Grâce à leur rôle central dans la présentation d'antigènes, les DC constituent un lien essentiel entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. On distingue trois populations de DC : les DC conventionnelles (cDC), les DC dérivées de monocytes (moDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC).

Les cDC comprennent deux sous populations : les cDC1 et les cDc2. Les cDC1 sont les principales cellules capables de présenter des antigènes exogènes *via* le CMH-I (présentation croisée) et productrices d'IL-12⁷⁶. Elles sont donc considérées comme les principales activatrices de la réponse CD8. À ce titre, elles sont nécessaires à la réponse anti-tumorale et aux immunothérapies dans les modèles précliniques et associées à un bon pronostic quand elles infiltrant la tumeur⁷⁶. Les cDC2 sont plutôt spécialisées dans la présentation d'antigènes exogènes aux CD4 *via* le CMH-II. Leur rôle dans l'immunité antitumorale est moins bien décrit mais leur infiltration dans la tumeur serait aussi associée à un bon pronostic⁷⁶. Les cDC1 sont caractérisées par les marqueurs CD8 α , CLEC9A et XCR1 tandis que les cDC2 sont caractérisées par CD11b, SIRP α et BDCA1⁷⁷.

Les moDC sont issus de la différenciation des monocytes dans un contexte d'inflammation. Ces cellules ont une grande plasticité fonctionnelle et partagent quelques caractéristiques avec les cDC comme l'expression du CMH-II, CD11b, CD11c et la capacité de présenter des antigènes de façon croisée aux CD8, dans certaines conditions. L'infiltration de la tumeur par les moDC est associée à une bonne réponse des patients atteints de mélanome aux anti-PD-1⁷⁸.

Les pDC se développent dans la moelle osseuse d'où elles sortent matures. Elles ont un rôle majeur dans la réponse antivirale. La reconnaissance de PAMP par leurs TLR déclenche la sécrétion de grandes quantités d'interféron de type I. Elles sont moins étudiées dans le contexte du cancer mais l'infiltration de pDC dans les tumeurs de mélanome est associée à un mauvais pronostic et une rechute précoce⁷⁹.

1.2.L'immunité adaptative

L'immunité innée permet une réponse rapide et non spécifique mais pour mettre en place une protection efficace et durable, l'immunité adaptative doit être mise en route. Elle se compose de trois grandes populations de cellules : les lymphocytes T CD8 et CD4 et les lymphocytes B. Les CD8 peuvent se différencier en lymphocytes T cytotoxiques (CTL, *Cytotoxic T lymphocyte*) dont le rôle est de reconnaître et détruire les cellules infectées par un pathogène intracellulaire (virus, bactérie ou parasite intracellulaire) et les cellules tumorales. Les CD4 peuvent se différencier en lymphocytes T auxiliaires ou « *helpers* » dont le rôle est de sécréter des cytokines pour orienter la réponse immunitaire de façon appropriée à la menace. Les lymphocytes B ont deux rôles principaux : la production d'anticorps et la présentation d'antigènes. Quand elles sont activées ces trois types de cellules prolifèrent de façon clonale puis se différencient en cellules effectrices qui exerceront leur fonction (cytotoxicité, sécrétion de cytokines, production d'anticorps) et en cellules mémoires qui ont une longue durée de vie. Ce sont ces cellules mémoires qui permettent une réponse très rapide en cas de nouvelle rencontre avec leur antigène cible et confèrent la protection à long terme³⁰.

Contrairement à l'immunité innée qui reconnaît des signaux de danger et des motifs moléculaires caractéristiques de pathogènes ou de dégâts tissulaires, l'immunité adaptative est spécifique. C'est-à-dire que les cellules du système immunitaire adaptatif reconnaissent une cible précise que l'on appelle « antigène ». Un antigène est une molécule ou une particule qui peut être reconnu par un anticorps ou par le récepteur d'un lymphocyte T. Les anticorps reconnaissent une région précise : un « épitope » d'une particule quel que soit sa nature chimique. Pour être activés, les lymphocytes B n'ont pas besoin de présentation d'antigène. Il leur suffit de reconnaître leur antigène cible grâce à leur BCR (*B cell receptor*) et de recevoir un second signal qui peut être l'interaction de leur récepteur CD40 avec le CD40L d'un CD4 ou la reconnaissance de signaux de danger par leurs TLR⁸⁰.

Les lymphocytes T $\alpha\beta$, quant à eux, reconnaissent uniquement les antigènes peptidiques à condition qu'ils soient présentés sur une molécule de CMH⁸¹. L'activation d'un lymphocyte T nécessite donc que son TCR reconnaissent un antigène spécifique présenté par une cellule présentatrice d'antigènes (APC, *Antigen-presenting cell*)⁸². Les CD4 reconnaissent les antigènes présentés par le CMH-II qui est exprimé exclusivement par les APC tandis que les CD8 reconnaissent les antigènes présentés par le CMH-I qui est exprimé normalement par toutes les cellules de l'organisme⁸³. Les peptides présentés sur le CMH-II correspondent aux antigènes exogènes du milieu extracellulaire, ils peuvent correspondre à des pathogènes extracellulaires, des molécules ou des débris de cellules mortes. Les peptides présentés sur le CMH-I proviennent d'antigènes endogènes issus de la dégradation des protéines synthétisées par la cellule qui exprime le CMH-I⁸³. Cette présentation des peptides endogènes permet aux CD8 de vérifier que la cellule exprime des antigènes du soi et n'exprime pas des antigènes du non soi, qui seraient le signe d'une infection ou de la transformation de la cellule⁸⁴.

Cependant, pour qu'un lymphocyte T puisse exercer sa fonction quand il rencontre son antigène cible il doit d'abord être activé par une APC. Certaines DC (notamment les cDC1) sont ainsi capables de présenter des antigènes exogènes sur leur CMH-I pour activer les CD8. C'est ce que l'on appelle la « présentation croisée »⁸⁵. La nécessité de présentation de l'antigène par une APC s'explique par le fait que l'activation d'un lymphocyte T nécessite trois signaux (Fig. 11) :

- Signal 1 : Présentation du complexe CMH-peptide
- Signal 2 : Costimulation
- Signal 3 : Cytokines

Le signal de costimulation nécessite que des ligands comme CD80 et CD86 exprimés à la surface des APC soit reconnus par des récepteurs de costimulation comme CD28 à la surface du lymphocyte. Le signal 3 nécessite la sécrétion de cytokines comme l'IL-2 et l'IFN- γ par les APC ou les cellules environnantes pour parachever l'activation du lymphocyte et polariser son phénotype. En fonction des signaux cytokiniques environnants, les lymphocytes (CD4 en particulier) adopteront un phénotype et une fonction spécifiques^{82,86}.

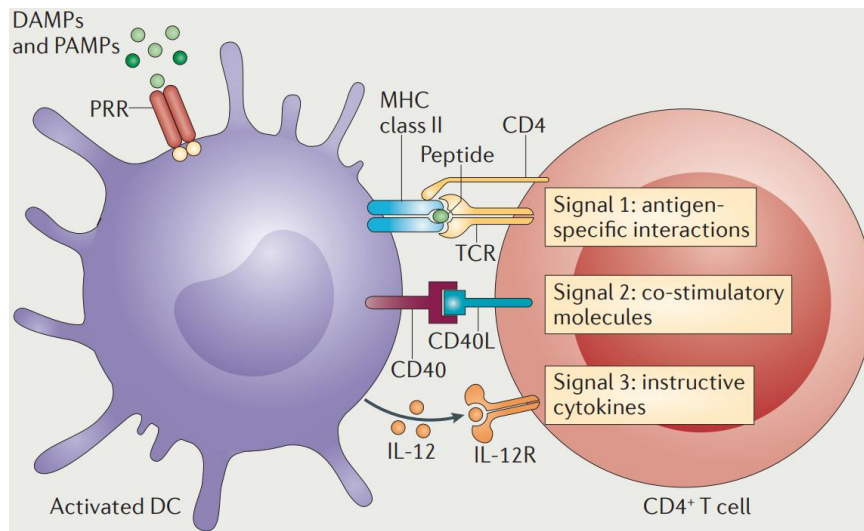


Figure 11: Les trois signaux d'activation du lymphocyte T

L'activation d'un lymphocyte nécessite trois signaux : (1) reconnaissance par du complexe CMH-peptide par le TCR, (2) signal de co-stimulation (ici interaction de CD40 & CD40L) et (3) signal cytokinique. Extrait de Kambayashi *et al.*⁸⁶

On comprend donc que dans le contexte du cancer, la mise en place d'une réponse adaptative efficace nécessite la présentation d'antigènes tumoraux aux lymphocytes T par les APC. Les APC doivent donc être activées par les signaux de danger et les cellules immunitaires innées sur le site tumoral ; récolter les antigènes tumoraux ; migrer vers les organes lymphoïdes secondaires *via* le système lymphatique ; présenter ces antigènes aux lymphocytes T et ainsi les activer ; ces derniers pourront alors recirculer dans le sang pour atteindre et infiltrer la tumeur ; reconnaître leur antigène cible et finalement exercer leur fonction ; ce qui relarguera de nouveaux antigènes tumoraux ; et ainsi de suite. Ce trafic est décrit selon le modèle du cycle de l'immunité du cancer⁸¹ (Fig. 12).

1.2.1. Les antigènes tumoraux

Les cellules cancéreuses sont des cellules du « soi » qui ont acquis un potentiel tumorigène en accumulant des mutations. Ce taux de mutations très important confère un avantage évolutif puisqu'il permet aux cellules tumorales de s'adapter à leur environnement changeant mais il est aussi la source d'antigènes aberrants qui peuvent permettre de les identifier comme cellules anormales et d'augmenter leur immunogénicité⁸⁷.

Le mélanome est un des types de cancer qui présentent la plus grande fréquence de mutations somatiques, comme décrit précédemment (Fig. 3), dues majoritairement à l'exposition aux UV⁵. En raison de leur charge mutationnelle, les cellules de mélanome

présentent sur leur CMH-I des antigènes tumoraux qui sont immunogènes et qui permettent une réponse immunitaire antitumorale⁸⁸. Comme en atteste le développement clinique du mélanome, ces cellules sont malgré tout capables d'échapper au système immunitaire et de proliférer. Ce phénomène est expliqué par la théorie de l'immunoédition qui a relancé l'intérêt pour l'immunologie du cancer à la fin du XX^e siècle (cf. chap.II§1.3).

Les antigènes tumoraux sont de deux types : les antigènes associés aux tumeurs (TAA, *Tumor-associated antigens*) et les antigènes spécifiques de la tumeur (TSA, *Tumor-specific antigens*)⁸⁹.

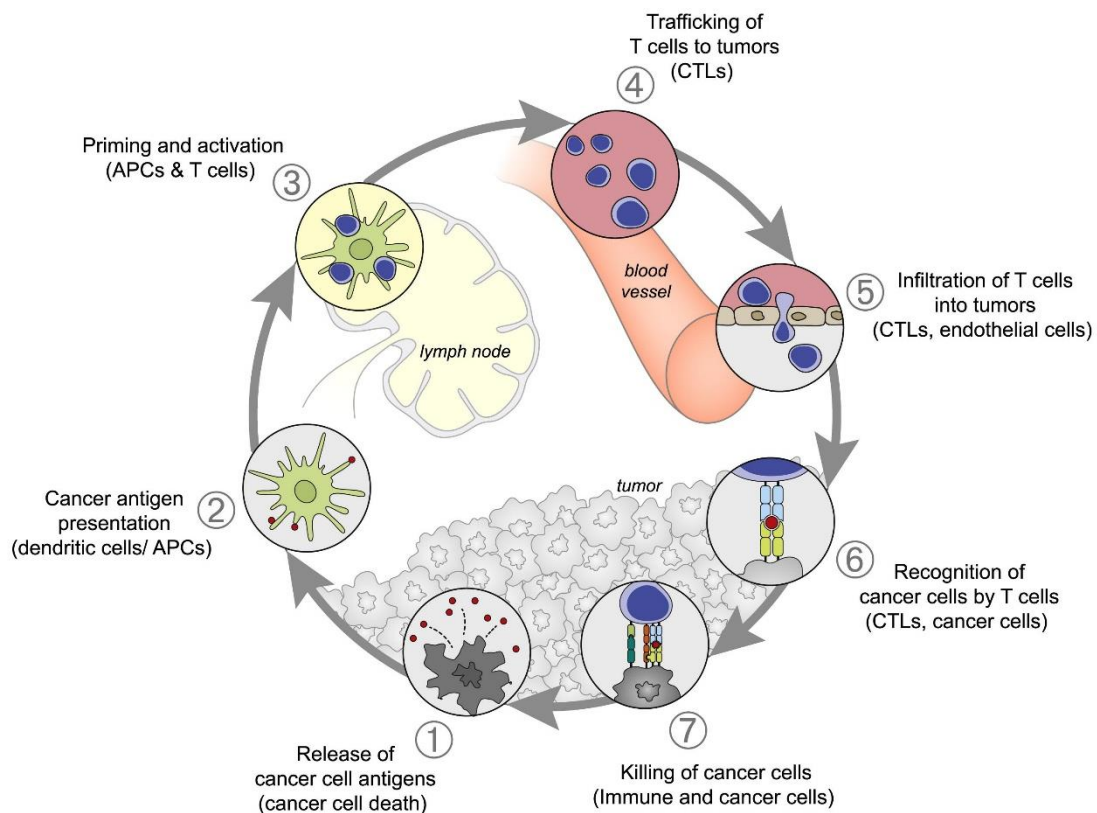


Figure 12: Cycle de l'immunité du cancer

Pour que l'immunité adaptative anti-cancer se mette en place, plusieurs étapes sont nécessaires afin que les lymphocytes T soient activés et puissent exercer leur fonction dans la tumeur. Extrait de Chen *et al.*⁸¹

1.2.1.1. Les antigènes associés aux tumeurs

L'expression aberrante d'antigènes endogènes peut induire une réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales. L'exemple le plus classique est le cas des « *cancer-testis antigens* », dont l'expression est physiologiquement restreinte à la lignée germinale. Les cellules germinales n'expriment pas le CMH-I⁹⁰ et ces antigènes ne sont donc pas l'objet d'une

tolérance immunitaire et sont donc particulièrement immunogènes⁹¹. Les antigènes MAGE (*Melanoma antigen*) et NY-ESO-1 (*New York esophageal squamous cell carcinoma 1*) sont deux exemples de « *cancer-testis antigens* » retrouvés fréquemment dans le mélanome et ils sont devenus des antigènes « modèles » pour étudier la réponse des lymphocytes T spécifiques de la tumeur⁹².

Les antigènes de différenciation correspondent à des protéines dont l'expression est spécifique de la lignée mélanocytaire. Ce sont des protéines dont l'expression est sous le contrôle de MITF et qui sont impliquées dans la voie de biosynthèse de la mélanine ou de la formation des mélanosomes⁹³ telles que la tyrosinase, TRP-1 et 2, MART-1 et gp100. Ces antigènes sont fréquemment surexprimés par les cellules de mélanomes et ils induisent une réponse spécifique^{94,95}.

1.2.1.2. Les antigènes spécifiques de la tumeur

Les antigènes spécifiques de la tumeur peuvent avoir plusieurs origines : les mutations somatiques menant à l'expression de peptides aberrants et les antigènes viraux dans le cas des cancers associés aux infections virales. Les mutations accumulées dans le génome des cellules cancéreuses peuvent mener à la présentation de « néoantigènes ». En effet, les mutations ponctuelles non-synonymes, les décalages de cadre de lecture et les aberrations chromosomiques conduisent à des séquences protéiques aberrantes⁹⁶. La dégradation de ces protéines peut mener à la présentation de peptides aberrants par le CMH. C'est ce que l'on appelle les néoantigènes. L'accumulation de mutations dans le génome des cellules augmente donc la présentation de néoantigènes de façon stochastique et le mélanome étant un des cancers dans lequel on retrouve le plus de mutations⁵, c'est aussi un des cancers où l'on retrouve le plus de néoantigènes⁹⁷.

Certains cancers sont induits par l'infection par des virus oncogéniques, qui s'ils ne sont pas complètement éliminés de l'organisme, peuvent persister dans les cellules de l'hôte et y induire des mutations⁹⁶. C'est le cas du cancer du col de l'utérus et des cancers dits de « tête et cou » qui peuvent être déclenchés par certaines souches de papillomavirus humains^{96,98}. Les virus des hépatites B et C peuvent induire un carcinome hépatocellulaire⁹⁶ et certains lymphomes et carcinomes sont aussi associés à l'infection par le virus d'Epstein-Barr⁹⁹. Les peptides issus des protéines virales exprimées par les cellules tumorales peuvent être présentées

sur les molécules de CMH et ainsi induire une réponse immunitaire antivirale ciblant les cellules tumorales⁹⁶.

1.2.2. Les lymphocytes T CD8

Les CD8, ont un rôle majeur dans la destruction des cellules tumorales et leur infiltration dans la tumeur est corrélée à une issue favorable pour les patients atteints de mélanome^{97,100}. Ils sont activés par les antigènes tumoraux présentés de façon croisée sur le CMH-I par les DC dans les OLS. La reconnaissance du complexe CMH/antigène par le TCR accompagnée par les signaux de costimulation induisent l'activation des CD8 naïfs qui vont proliférer de façon clonale et acquérir un phénotype effecteur capable de tuer les cellules cibles : ils exercent une cytotoxicité directe médiée par la perforine et les granzymes. Ils sécrètent aussi du TNF (*cf.* chap.III§1.3) et de l'IFN- γ qui induit l'expression des CMH de classe I et II à la surface des cellules environnantes¹⁰¹.

Les CD8 activés recirculent alors dans la circulation sanguine où ils sont orientés par l'expression de récepteurs aux chimiokines. Les CD8 exprimant le récepteur aux chimiokines CXCR3 sont ainsi orientés pour infiltrer la tumeur où peuvent être produits les ligands de CXCR3 (CXCL9, CXCL10 and CXCL11)^{102,103}. Une fois la cellule cible identifiée, la liaison du TCR avec le complexe CMH/peptide va entraîner le recrutement de molécule d'adhésion et de costimulation pour former une synapse immunologique qui maintient les CD8 et la cellule cible en contact¹⁰⁴. Cette proximité permet au CD8 de sécréter dans le microenvironnement de la synapse des molécules cytotoxiques : la perforine crée des pores dans la membrane plasmique de la cellule cible et permet l'entrée de granzymes, des protéases qui vont induire l'apoptose de la cellule cible¹⁰⁵.

1.2.3. L'épuisement des lymphocytes T CD8

Dans une situation d'infection aiguë, les CD8 activés parviennent à détruire toutes les cellules infectées et la disparition de l'antigène entraîne l'apoptose de la plupart d'entre eux. Seule une petite population persiste avec un phénotype de cellule mémoire afin de répondre rapidement à une nouvelle infection du même pathogène (Fig. 13, gauche)¹⁰⁶. Dans une situation d'infection chronique ou de cancer, les CD8 ne parviennent pas à éradiquer les cellules infectées ou tumorales et l'antigène persiste. La stimulation antigénique chronique mène à une voie de différenciation distincte caractérisée par l'expression du facteur de transcription TOX

(*Thymocyte selection associated high mobility group box*)^{107,108} et qui mène à une perte des fonctions effectrices, une désensibilisation aux cytokines, l'expression de nombreux récepteurs inhibiteurs (aussi appelés « points de contrôle immunitaire ») et des programmes métabolique et épigénétique altérés¹⁰⁶. Ces CD8 « épuisés » (*exhausted*) persistent mais ne parviennent pas à éliminer l'antigène (Fig. 13, droite).

On distingue deux populations de CD8 épuisés. Les CD8 complètement épuisés (T_{ex}) sont caractérisés par une expression importante de PD-1, l'expression de TIM-3 et l'absence d'expression du facteur de transcription TCF-1 ($TCF-1^{-}$, $PD-1^{high}$, $TIM-3^{+}$). Ces cellules ont peu d'activité effectrice, ne sont pas capables de proliférer et ne répondent pas aux ICI¹⁰⁹. La deuxième population est constituée de CD8 « précurseurs épuisés » (*precursor exhausted*) ou aussi appelés « stem-like », qui expriment TCF-1, des niveaux intermédiaires de PD-1 mais pas TIM-3 ($TCF-1^{+}$, $PD-1^{int}$, $TIM-3^{-}$). Ces cellules sont capables de se renouveler et de se différencier en T_{ex} . Il a été récemment démontré que cette population a un rôle majeur dans l'efficacité des ICI et en particulier des anti-PD-1¹⁰⁹⁻¹¹¹.

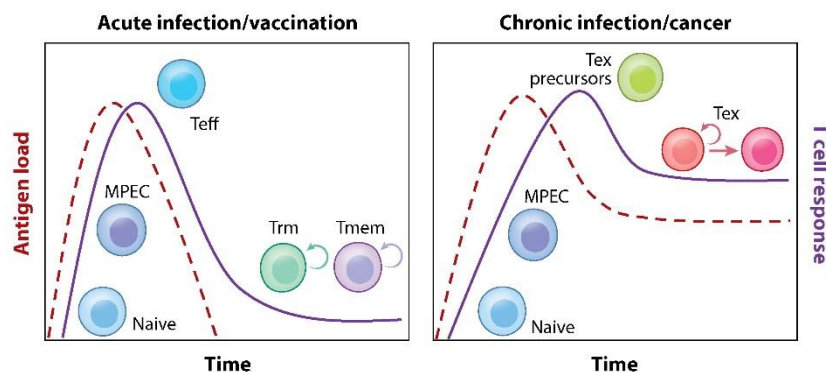


Figure 13: Modèle d'activation et d'épuisement des CD8

À gauche : dans le cas d'une infection aiguë ou d'une vaccination, les CD8 activés se différencient en MPEC (*Memory precursor effector cells*) puis en lymphocytes effecteurs (Teff) ce qui leur permet de contrôler l'infection et d'éliminer l'antigène. La disparition de l'antigène entraîne l'apoptose de la plupart des Teff et seulement une petite population de lymphocyte mémoires persiste au sein du tissu (Trm) et en périphérie (Tmem).

À droite : dans le cas d'une infection chronique ou d'un cancer, les CD8 se différencient en MPEC puis en Teff mais ne parviennent pas à éliminer l'antigène. La persistance de ce dernier entraîne l'épuisement des CD8 : ils persistent mais n'ont plus de fonction effectrice. Les CD8 précurseurs épuisés (*Tex precursors*) s'auto-renouvellent et peuvent se différencier en T_{ex} complètement épuisés et qui ne sont pas capables de prolifération. Extrait de McLane *et al.*¹⁰⁶

1.2.4. Les lymphocytes T CD4

Les CD4 sont appelés lymphocytes T auxiliaires ou « *helpers* » (Th, *T helper cell*) car leur principale fonction est d'orienter les cellules immunitaires vers une réponse appropriée au danger. Les CD4 naïfs sont activés par la présentation d'un antigène sur le CMH-II d'une APC

(signal 1) en présence de signaux de costimulation (signal 2). L'environnement cytokinique (signal 3) lors de leur activation détermine leur phénotype et l'orientation qu'ils vont donner à la réponse immunitaire en sécrétant eux même des cytokines¹¹².

On décrit six sous-populations de CD4 : les Th1 (*Type 1 T helper cell*), Th2 (*Type 2 T helper cell*), Th9 (*T helper 9 cell*), Th17 (*T helper 17 cell*), T_{FH} (*Follicular helper T cell*) et les T régulateurs (T_{reg}). Chaque phénotype est induit par des cytokines spécifiques qui provoquent l'expression d'un facteur de transcription distinctif et lui-même active l'expression et la sécrétion de cytokines caractéristiques (Fig. 14).

Les Th1, qui expriment le facteur de transcription T-bet, favorisent l'activation et les fonctions effectrices des CD8 *via* la production d'IFN- γ et l'infiltration de la tumeur par des Th1 est associée à un bon pronostic dans la plupart des types de cancer³⁵ tandis que l'infiltration par les Th2 et les Th17 est considérée neutre ou défavorable pour le pronostic du patient^{86,87}. Les Th9 ont une forte activité antitumorale chez la souris¹¹³ mais qui n'a pas encore été démontrée chez l'humain. Les T_{FH} sont principalement localisés dans les follicules B des OLS et ils sont associés aux structures lymphoïdes tertiaires (TLS, *Tertiary lymphoid structure*) dans les tumeurs (*cf.* chap.II§1.2.8). La sécrétion de CXCL13 par les T_{FH} participe à la mise en place des TLS et leur expression de CD40L est nécessaire à l'activation des lymphocytes B et à leur activité antitumorale¹¹⁴. Les T_{reg} ont une activité immunosuppressive et tolérogène et sont donc délétères pour la réponse immunitaire antitumorale¹¹⁵. Le paragraphe chap.II§1.2.6 leur est consacré.

Au-delà de la sécrétion de cytokines, les CD4 peuvent avoir un rôle important dans l'activation des CD8 en CTL *via* les cDC1. En effet, les CD4 sont activés par la reconnaissance de leur antigène spécifique présenté sur le CMH-II, ce qui augmente leur expression de CD40L. La liaison du CD40L avec le CD40 exprimé par la DC augmente la capacité de présentation d'antigènes de cette dernière aux CD8 (*DC licensing*)¹¹⁶. Ainsi les CD4 spécifiques d'antigènes tumoraux sont capables de participer à l'immunité antitumorale même quand les cellules cancéreuses n'expriment pas le CMH-II¹¹⁷. De la même façon, l'interaction entre les CD4 et les lymphocytes B permet l'activation mutuelle des deux types cellulaires¹¹⁸ et la production d'anticorps antitumoraux. Enfin, les CD4 sont capables de reprogrammer les cellules myéloïdes vers un phénotype effecteur capable de détruire les cellules tumorales n'exprimant pas le CMH-I et ne répondant pas à l'IFN- γ , grâce à leur activité iNOS¹¹⁹.

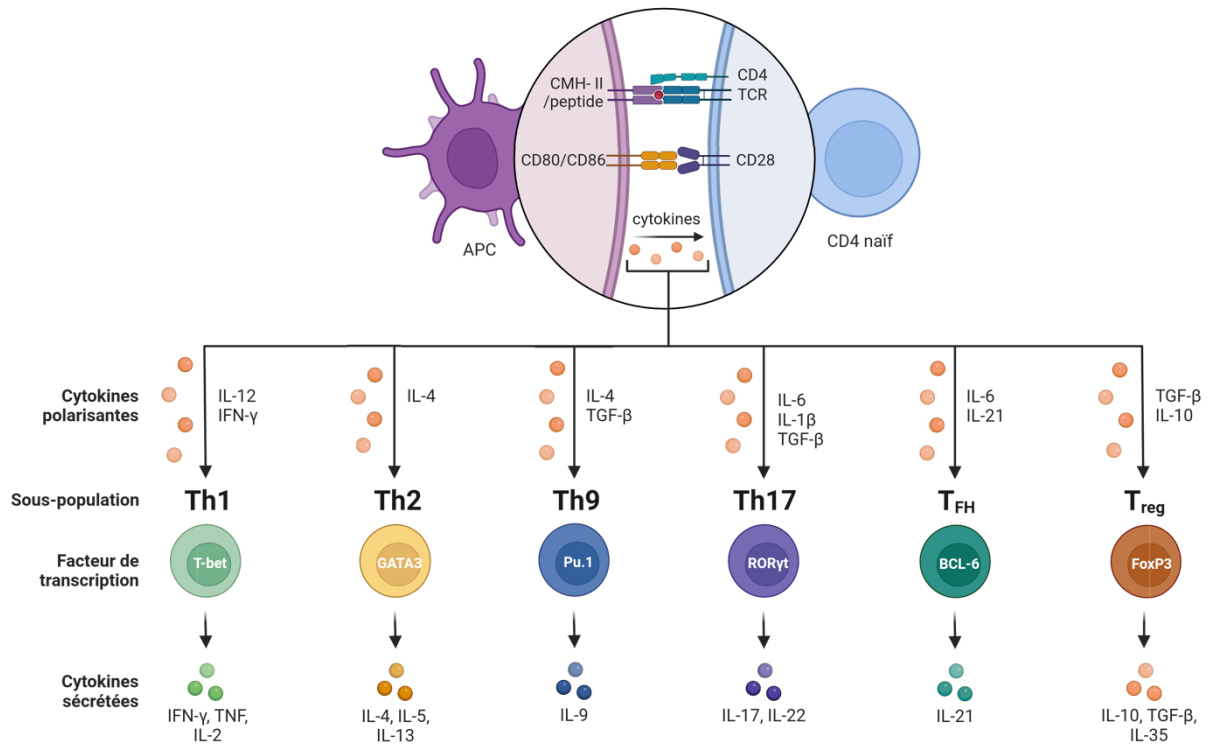


Figure 14 : Cytokines et facteurs de transcription associés à la polarisation des CD4

L'activation d'un CD4 naïf nécessite la présentation de son antigène spécifique sur le CMH-II (signal 1) d'une cellule présentatrice d'antigènes (CPA) et un signal de costimulation (signal 2, ici CD80 ou CD86). L'environnement cytokinique au moment de l'activation (cytokines polarisantes) constitue le signal 3 et oriente le phénotype du CD4 selon six différentes polarisations : Th1, Th2, Th9, Th17, T_{FH} et T_{reg}. Chaque sous-population est associée à un facteur de transcription qui détermine leur phénotype et les cytokines qu'elle sécrète. Réalisé avec Biorender.

1.2.5. Les lymphocytes T mémoires

1.2.5.1. Lymphocytes T centraux mémoires et effecteurs mémoires

Après avoir été activés, les lymphocytes T s'expandent de façon clonale et une certaine proportion se différencie en lymphocytes mémoires. Ces cellules ont une longue durée de vie et elles permettent une réponse spécifique plus rapide lors des rencontres suivantes avec l'antigène. Les lymphocytes T mémoires se distinguent des lymphocytes T naïfs par la perte d'expression de CD45RA chez l'humain ou l'expression de CD44 chez la souris. Ils sont classés en deux sous-population : les centraux mémoires (T_{CM}) et les effecteurs mémoires (T_{EM}). Les T_{CM} n'ont pas de fonction inflammatoire et cytotoxique mais ils ont un grand potentiel de prolifération. Ils circulent principalement vers les OLS grâce à l'expression de CCR7 et CD62L. Les T_{EM} ont moins de potentiel de prolifération mais ils possèdent des fonctions effectrices. Ils n'expriment pas CCR7 et sont recrutés au niveau de sites inflammatoires grâce à l'expression de récepteurs aux chimiokines comme CXCR3. Chez l'humain, les T_{EM} qui atteignent un état de différenciation avancé réexpriment CD45RA, on appelle ces cellules les T_{EMRA} et ce sont

celles qui ont les plus grandes capacités effectrices. Les T_{CM} sont donc caractérisées par l'expression de $CD45RA^-CCR7^+$ chez l'humain et $CD44^+CD62L^+$ chez la souris. Les T_{EM} sont $CD45RA^-CCR7^-$ chez l'humain et $CD44^+CD62L^-$ chez la souris et les T_{EMRA} (uniquement décrits chez l'humain) sont $CD45RA^+CCR7^-$ ^{120,121}(Fig. 15).

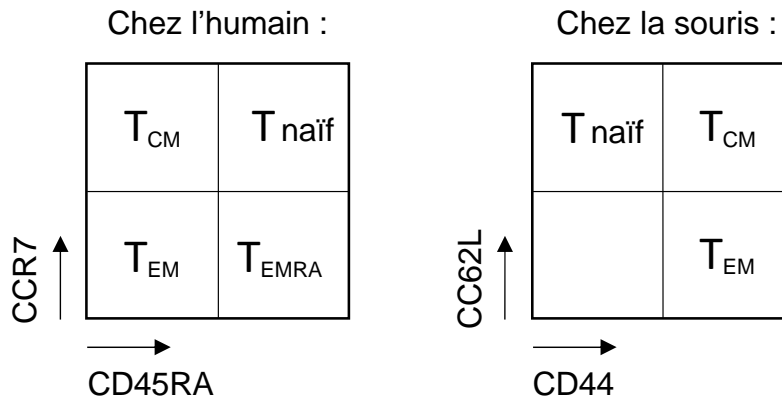


Figure 15 : Identification des sous-populations de lymphocytes T mémoires par cytométrie en flux

Chez l'humain, les lymphocytes T naïfs sont caractérisés par l'expression de $CD45RA^+CCR7^+$, les centraux mémoires (T_{CM}) sont $CD45RA^-CCR7^+$, les effecteurs mémoires (T_{EM}) sont $CD45RA^-CCR7^-$ et les T_{EMRA} (T_{EM} réexprimant $CD45RA$) sont $CD45RA^+CCR7^-$. Chez la souris, les lymphocytes T naïfs sont caractérisés par l'expression de $CD44^+CD62L^+$, les T_{CM} sont $CD44^+CD62L^+$ et les T_{EM} sont $CD44^+CD62L^-$.

1.2.5.2. Lymphocytes T résidents mémoires

Certains lymphocytes T mémoires ne recirculent pas et restent dans les tissus périphériques : après une première rencontre avec leur antigène spécifique, ils sont maintenus dans les tissus et fournissent une mémoire locale à long terme. Ces lymphocytes T « résidents mémoires » (T_{RM} , *Tissue-resident memory cells*) sont caractérisés par l'expression des $CD103$, $CD49a$ et $CD69$ ¹²². $CD103$ est la chaîne αE de l'intégrine $\alpha E\beta 7$ qui se lie à la E-cadhérine exprimée par les cellules épithéliales, y compris les kératinocytes¹²³. L'expression de $CD103$ est induite par le $TGF-\beta$ ¹²⁴. $CD49a$ correspond à la chaîne alpha de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ (aussi connue sous le nom de *VLA-1*, pour « *Very late antigen 1* ») qui se lie au collagène IV, enrichi dans la membrane basale séparant le derme de l'épiderme¹²⁵. $CD69$ est un marqueur d'activation précoce exprimé à la surface des lymphocytes T, il induit l'internalisation et la dégradation du $S1P1$ (*Sphingosine-1-phosphate receptor 1*)¹²⁶, séquestrant les lymphocytes dans les OLS et les tissus périphériques^{127,128}. La régulation à la baisse de $S1P1$ est nécessaire pour établir une mémoire à long terme dans la peau¹²⁹.

Les T_{RM} se localisent dans l'épiderme et patrouillent le long de la couche basale des kératinocytes, sous les cellules de Langerhans¹³⁰. Ils sont capables de traverser la membrane basale et de migrer entre l'épiderme et le derme¹³⁰. Chez la souris, les T_{RM} suffisent à maintenir l'état d'équilibre lors de l'immunoédition du mélanome pour contenir les cellules cancéreuses dans la peau¹³¹. Toujours chez la souris, l'activation des T_{RM} dans la peau induit la maturation et la migration des DC vers les OLS où elles présentent les antigènes tumoraux aux CD8. Ceci permet de diversifier le répertoire TCR des CD8 circulants¹³². Leur infiltration dans les tumeurs de mélanome est corrélée à une meilleure survie des patients et ils sont capables de proliférer en réponses aux anti-PD-1¹³³. On les retrouve aussi au niveau des ganglions lymphatiques qu'ils protègent contre les métastases ganglionnaires. Leur signature transcriptionnelle est d'ailleurs prédictive de la survie des patients atteints de mélanome qui ont une métastase ganglionnaire¹³⁴.

1.2.6. Les lymphocytes T régulateurs

Les T_{reg} correspondent à une sous-population de CD4 qui ont une activité immunosuppressive et qui sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription FoxP3. Les rôles physiologiques des T_{reg} sont d'induire une tolérance vis-à-vis des autoantigènes, des micro-organismes commensaux et des antigènes provenant de l'alimentation. Ils contrôlent aussi l'inflammation et participent à sa résolution quand elle n'a plus lieu d'être, ils induisent une tolérance fœto-placentaire chez la mère et ils interviennent dans l'homéostasie et la réparation des tissus¹³⁵. On distingue deux sous-populations de T_{reg} en fonction du tissu dans lequel ils se différencient. Les T_{reg} naturels (nT_{reg}) sont originaires du thymus : chez les thymocytes $CD4^+$, un TCR à une forte affinité pour un autoantigène présenté sur le CMH-II lors de la sélection positive provoque une forte expression de la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 (CD25) et la formation d'un récepteur pour l'IL-2 (IL-2R) à haute affinité. L'activation de ce récepteur par l'IL-2 induit l'expression de FoxP3 et ces thymocytes deviennent des nT_{reg} ¹³⁶. Les T_{reg} induits (iT_{reg}) se différencient en périphérie à partir de CD4 naïfs lorsque le TCR de ceux-ci est stimulé en présence de TGF- β , d'IL-10 et d'acide rétinoïque¹³⁷. Les iT_{regs} sont donc principalement retrouvés dans les tissus où ils limitent l'inflammation induite par des antigènes provenant des micro-organismes commensaux et de l'alimentation par exemple¹³⁵ mais aussi par des néoantigènes dans le contexte du cancer¹³⁸. Les nT_{reg} ont un phénotype stable tandis que les iT_{reg} peuvent perdre l'expression de FoxP3 et leur activité immunosuppressive¹³⁷.

Dans le contexte du cancer, on retrouve à la fois des nT_{reg} et des iT_{reg} infiltrant les tumeurs¹³⁷. Les T_{reg} constituent une population immunosuppressive majeure qui a une influence délétère sur l'immunité antitumorale et en particulier sur les CD8. Un ratio CD8/T_{reg} élevé parmi les lymphocytes infiltrant la tumeur est notamment associé à un bon pronostic pour le patient¹³⁹⁻¹⁴¹. Une sous population de T_{reg} qui exprime FoxP3, CXCR5, BCL-6 et PD-1 est retrouvée dans les follicules des OLS et dans les TLS¹¹⁴. Ces lymphocytes T régulateurs folliculaires (T_{FR}) inhibent l'activité des T_{FH} et sont délétères pour l'immunité antitumorale¹⁴².

L'activité immunosuppressive des T_{reg} s'exerce selon plusieurs mécanismes : l'expression de CTLA-4, de CD25 et des ectonucléotidases CD39 et CD73, la sécrétion de perforine et de granzyme ainsi que des cytokines immunosuppressives TGF- β , IL-10 et IL-35^{136,137} (Fig. 16). Dans la tumeur, les T_{reg} ont un phénotype effecteur caractérisé par l'expression de multiples récepteurs inhibiteurs comme PD-1, CTLA-4, LAG-3 (*Lymphocyte-activation gene 3*), TIM-3 et GITR et des capacités immunosuppressives accrues¹³⁶. Les récepteurs inhibiteurs font l'objet de paragraphes détaillés plus loin (chap.II§2). L'IL-2 stabilise l'expression de FoxP3 et elle est nécessaire à la survie et à la prolifération des T_{reg} mais aussi des CD8 et des CD4 conventionnels. Les T_{reg} expriment fortement CD25 qui constitue la sous-unité α de l'IL-2R $\alpha\beta\gamma$ à haute affinité¹³⁷. Grâce à ce récepteur, les T_{reg} « siphonnent » l'IL-2 disponible dans le microenvironnement au détriment des CD8 et des CD4 conventionnels^{143,144}. L'adénosine extracellulaire se lie au récepteur A_{2A} exprimé par les lymphocytes T infiltrant la tumeur et inhibe leur cytotoxicité¹⁴⁵. Dans le microenvironnement tumoral, l'adénosine extracellulaire est générée par la conversion de l'ATP en AMP (adénosine monophosphate) par l'enzyme CD39 puis par la déphosphorylation de l'AMP en adénosine par CD73¹⁴⁶. Or, les T_{reg} peuvent exprimer CD39 et CD73, ce qui favorise la génération d'adénosine et participe à leurs capacités immunosuppressives¹⁴⁷. Les T_{reg} expriment la perforine et les granzymes A et B chez la souris et l'humain¹⁴⁸, ce qui leur permet de tuer les lymphocytes CD8 et NK et les DC infiltrant la tumeur et participe ainsi à leurs capacités de suppression de l'immunité antitumorale¹⁴⁹. Le TGF- β est une cytokine immunosuppressive qui inhibe l'activité cytotoxique des CD8 et des NK. Elle favorise aussi la différenciation des CD4 en iT_{reg} et la transdifférenciation des Th17 en iT_{reg} également¹³⁷. L'IL-10 est aussi une cytokine immunosuppressive qui participe au maintien de la tolérance physiologique au niveau des barrières naturelles de l'organisme¹⁵⁰. L'IL-10 est notamment impliqué dans l'induction des T_{reg}¹⁵¹. Dans le contexte du cancer, l'IL-10 inhibe l'activité cytotoxique des CD8 et des

NK^{152,153}. Cependant plusieurs études rapportent un effet bénéfique de l'IL-10 sur l'immunité antitumorale. Ainsi, les souris déficientes pour l'IL-10 développent plus de carcinomes induits chimiquement que les souris WT¹⁵⁴. Dans un modèle de cancer mammaire chez la souris, l'injection d'IL-10 pégylée favorise l'infiltration de la tumeur par les CD8 et augmente leur expression d'IFN- γ et de granzyme B¹⁵⁴. Dans un modèle de leucémie lymphoïde chronique, la signalisation dépendante du récepteur de l'IL-10 est nécessaire au maintien du phénotype des lymphocytes CD8 précurseurs épuisés (PD-1^{int}, TCF-1⁺)¹⁵⁵. L'IL-10 a donc un effet dual sur l'immunité antitumorale. L'IL-35 a des effets immunosuppresseurs qui ne sont pas redondants avec l'IL-10. Ces cytokines sont toutes les deux exprimées mais pas co-exprimées par les T_{reg} infiltrant les tumeurs B16 chez la souris ainsi que chez les patients atteints de cancer du poumon. Elles provoquent toutes les deux l'exhaustion des CD8 mais l'IL-10 semble principalement inhiber les fonctions effectrices des CD8 tandis que l'IL-35 inhibe la différenciation en phénotype mémoire¹⁵³.

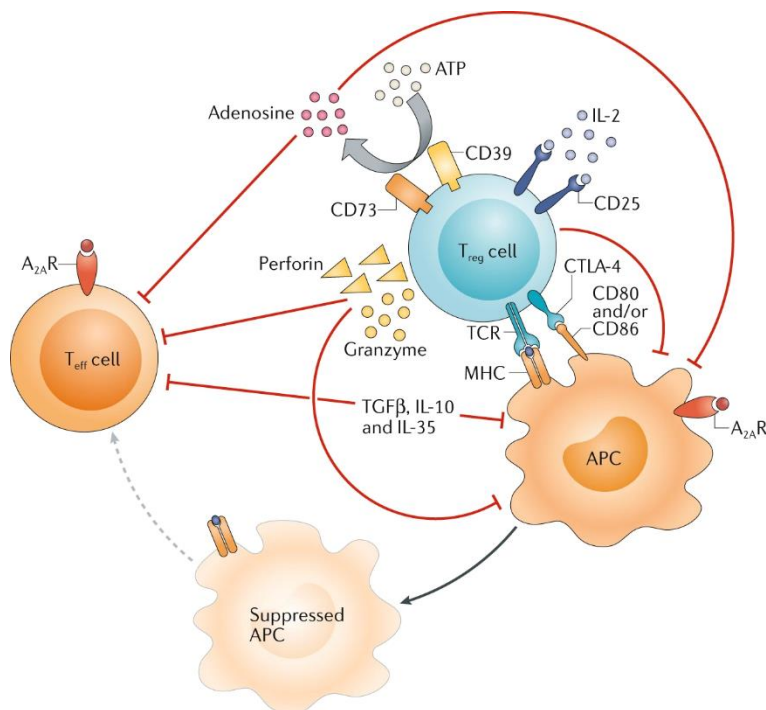


Figure 16: Mécanismes d'immunosuppression des T_{reg}

Les T_{reg} peuvent directement inhiber les lymphocytes infiltrant la tumeur ou indirectement en empêchant leur activation par les APC. Pour cela, ils disposent de plusieurs mécanismes : l'expression de du récepteur inhibiteur CTLA-4, la déplétion du microenvironnement en IL-2, la conversion de l'ATP extracellulaire en adénosine, en tuant directement les cellules cytotoxiques grâce à leur expression de perforine et granzyme et en sécrétant des cytokines immunosuppresseurs comme le TGF- β , l'IL-10 et l'IL-35. Extrait de Togashi *et al.*¹³⁶

1.2.7. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale. Une fois activés, ils prolifèrent de façon clonale et se différencient en plasmocytes afin de produire des anticorps spécifiques de l'antigène³⁰. Leur rôle est très important dans la protection contre les microorganismes pathogènes et dans le contrôle des microorganismes commensaux grâce au

pouvoir neutralisant des anticorps¹⁵⁶. En opsonisant les antigènes, les anticorps peuvent par exemple « marquer » les cibles pour qu'elles soient phagocytées. Ils peuvent aussi recouvrir les protéines de fixation des virus et ainsi prévenir l'infection des cellules et activer le système du complément pour détruire les microorganismes pathogènes¹⁵⁶.

Les lymphocytes B sont aussi des cellules présentatrices d'antigènes : quand le BCR (*B cell receptor*) reconnaît un antigène, il peut être internalisé puis dégradé pour que l'antigène soit présenté sur le CMH-II du lymphocyte B. Cette présentation antigénique est nécessaire à l'activation des lymphocytes B naïfs dans les follicules B des organes lymphoïdes secondaires. Ainsi les lymphocytes B vont bénéficier de l'« aide » des T_{FH} nécessaire à leur activation, si ces derniers reconnaissent les antigènes présentés sur le CMH-II des lymphocytes B⁸⁰. Les lymphocytes B activés peuvent alors former un centre germinatif dans lequel ils vont subir plusieurs cycles de prolifération et de mutation de leur BCR. Ce processus est appelé « hypermutation somatique » et permet d'augmenter l'affinité du BCR pour l'antigène¹⁵⁷. Sous l'influence de l'environnement cytokinique, les lymphocytes B activés peuvent aussi réarranger le domaine constant de leur BCR par commutation isotopique afin qu'il soit plus adapté à leur antigène cible³⁰.

Dans le contexte du cancer, les lymphocytes B sont peu étudiés. Ils sont tout de même retrouvés dans les tumeurs et plusieurs études rapportent un lien positif entre leur infiltration et la survie et la réponse aux immunothérapies dans plusieurs cancers dont le mélanome¹⁵⁸⁻¹⁶². Les plasmocytes infiltrant les tumeurs sont capables de sécréter des anticorps spécifiques d'antigènes tumoraux qui ont le potentiel d'induire l'ADCC, l'ADCP (*Antibody-dependent cellular phagocytosis*) et l'activation du système du complément mais leur rôle et leur impact sur l'immunité antitumorale est encore mal compris¹¹⁸. On considère que la participation des lymphocytes B dans l'immunité antitumorale est principalement due à leur capacité à présenter des antigènes ainsi qu'à former des TLS¹⁶³. Une étude récente dans un modèle de mélanome chez la souris suggère que l'expression de TIM-1 inhibe l'activité antitumorale des lymphocytes B à la manière des récepteurs inhibiteurs chez les lymphocytes T¹⁶⁴. La délétion du gène *Havcr1* (codant pour TIM-1) dans les lymphocytes B augmente leur réponse aux interférons, ce qui augmente leur activation, leurs capacités de présentation antigénique et de costimulation et aboutit à une meilleure expansion des lymphocytes T spécifiques de la tumeur et un meilleur contrôle de la tumeur¹⁶⁴.

Les lymphocytes B peuvent aussi avoir des fonctions immunosuppressives. Ces lymphocytes B régulateurs (B_{reg}) expriment à leur surface des molécules immunosuppressives comme PD-L1, des ligands de récepteurs pro-apoptotique comme FASL et TRAIL et les ectonucléotidases CD39 et CD73. Comme les T_{reg} , ils sécrètent des cytokines immunosuppressives comme le TGF- β , l'IL-10 et l'IL-35. Ils sont ainsi capables d'induire des populations immunitaires immunosuppressives comme les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et les T_{reg} ainsi que d'inhiber les populations immunitaires pro-inflammatoires¹¹⁸ (Fig. 17).

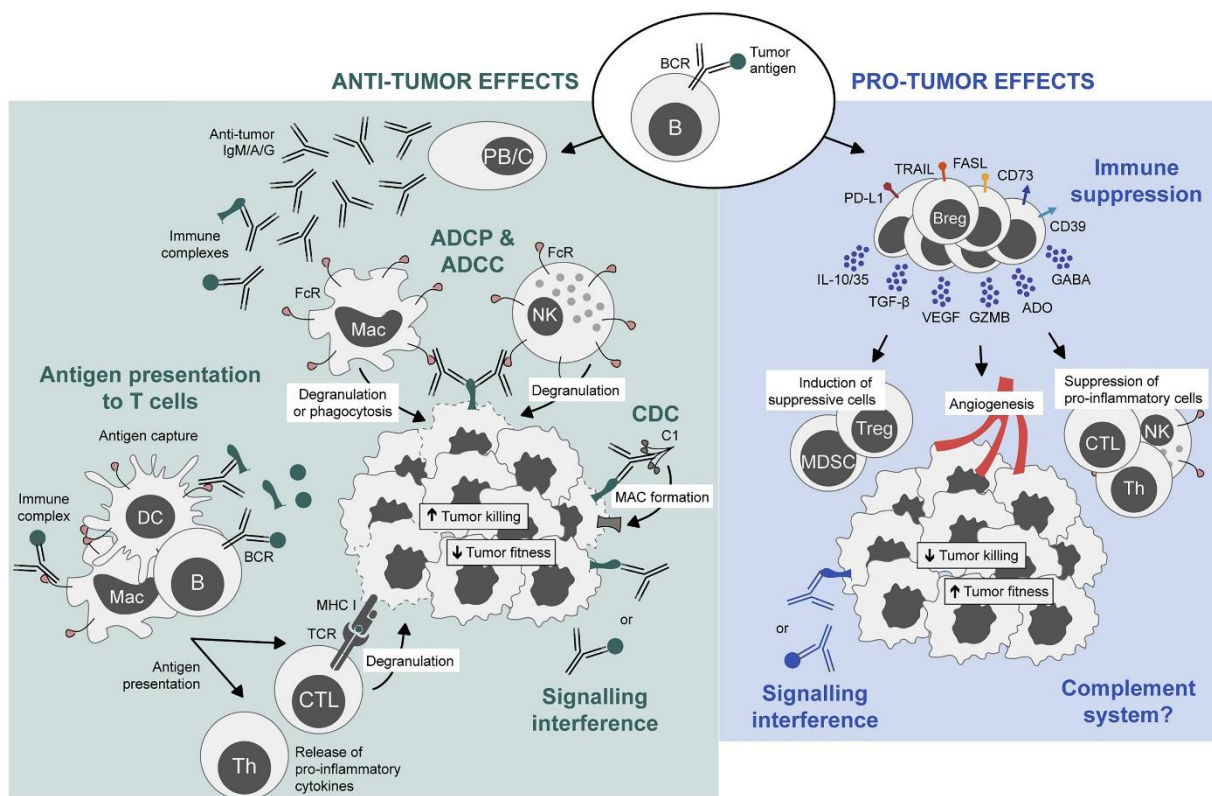


Figure 17: Rôles supposés des lymphocytes B dans l'immunité anti- et protumorale

Les lymphocytes B peuvent avoir des effets anti-tumoraux et des effets pro-tumoraux. Leur sécrétion d'anticorps spécifiques d'antigènes tumoraux peut induire la destruction des cellules tumorales par ADCC et ADPC et l'activation du système du complément. Les lymphocytes B peuvent présenter des antigènes aux lymphocytes T et participer à la formation des structures lymphoïdes tertiaires (non représenté). Les lymphocytes B régulateurs ont un rôle immunosuppresseur : ils expriment des ligands de récepteurs inhibiteurs et pro-apoptotique et sécrètent des cytokines (TGF- β , IL-10, IL-35) et des métabolites (adénosine : ADO) immunosuppresseurs. Extrait de Laumont et al.¹¹⁸

1.2.8. Les structures lymphoïdes tertiaires

Les TLS n'existent pas en conditions physiologiques, elle se forment en situation d'inflammation chronique causée par une maladie auto-immune, une infection, un rejet de greffe ou un cancer¹⁶⁵. Elles correspondent à un agrégat de cellules immunitaires qui mime

l'architecture d'un OLS. Ainsi on y retrouve des lymphocytes B et T (en particulier des T_{FH}), des cellules dendritiques folliculaires, des DC et des HEV (*High endothelial venules*) qui sont des veinules post-capillaires spécialisées dans le recrutement des lymphocytes vers les OLS. On peut aussi trouver des centres germinatifs fonctionnels dans les TLS les plus matures¹⁶³.

La présence de TLS dans la tumeur est associée à un pronostic favorable et une bonne réponse aux ICI dans plusieurs cancers dont le mélanome^{161,162,166-169}. Leur contribution à l'immunité antitumorale pourrait être expliquée de plusieurs manières. Leur structure étant proche de celle d'un OLS, ils pourraient jouer leur rôle dans le « *priming* » et l'activation des lymphocytes T au plus proche de la tumeur. En évitant ainsi les migrations cellulaires entre les OLS et la tumeur, la probabilité que les antigènes tumoraux soient présentés aux lymphocytes spécifiques pourrait être augmentée et leur activation serait ainsi plus rapide et efficace¹⁶⁵. Les TLS pourraient aussi être des voies d'entrée dans la tumeur pour les lymphocytes activés en périphérie, en particulier *via* les HEV qu'ils contiennent^{165,170}. La présence de centres germinatifs fonctionnels pourrait aussi permettre de générer des lymphocytes B ayant une meilleure affinité pour les antigènes tumoraux, ce qui pourrait leur permettre de présenter ces antigènes de façon plus efficace et de sécréter dans anticorps plus affins une fois différenciés en plasmocytes¹⁶³. Enfin l'agrégat de cellules immunitaires, et des cellules stromales associées, au sein de la tumeur pourrait permettre une augmentation de la concentration des signaux moléculaires nécessaires à la survie des cellules immunitaires, ce qui pourrait leur permettre de survivre dans le microenvironnement hostile au sein de la tumeur¹⁶⁵.

1.3. L'immunoédition

Si le système immunitaire est capable de reconnaître et de détruire les cellules tumorales, comment expliquer le développement clinique des cancers ? Au début des années 2000, Shankaran *et al.* ont proposé la théorie de l'immunoédition selon laquelle le système immunitaire est capable de reconnaître et de détruire les cellules tumorales naissantes (ce qui correspond à l'immunosurveillance) mais il participe aussi à la sélection des cellules tumorales non-immunogéniques qui finissent par échapper à la vigilance du système immunitaire¹⁷¹.

Au contraire des souris *nude*, les souris déficientes pour *Rag2* (*Recombination activating gene 2*, une protéine impliquée dans la recombinaison V(D)J) n'ont pas de lymphocytes T ni de lymphocytes B fonctionnels. Shankaran *et al.* ont montré que les souris

Rag2^{-/-} sont plus susceptibles de développer une tumeur après injection sous-cutanée de MCA (3'-methylcholanthrene) que les souris WT¹⁷¹. Cet effet est retrouvé chez les souris déficientes pour *Ifngr1* (*Interferon gamma receptor 1*) et *Stat1* (*Signal transducer and activator of transcription 1*), deux gènes impliqués dans la réponse à l'IFN- γ . De même, les souris déficientes pour *Rag2* développent spontanément plus de tumeurs au cours de leur vie que les souris WT. Les souris déficientes pour *Rag2* et *Stat1* développent encore plus de tumeurs spontanées que les souris déficientes pour *Rag2* uniquement, ce qui indique que le rôle des lymphocytes T et/ou B et de la réponse à l'IFN- γ ne sont pas complètement redondants dans les mécanismes immunitaires de suppression des tumeurs. Les auteurs ont ensuite utilisé un protocole de transplantation de tumeurs pour démontrer que les tumeurs qui se développent chez les souris *Rag2*^{-/-} sont plus immunogéniques que celles qui se développent chez les souris WT (Fig. 18). Cet effet est dépendant de la présentation antigénique par le CMH-I des cellules ainsi que des lymphocytes CD8 et CD4. Ces résultats ont amené les auteurs à proposer la théorie de l'immunoédition qui décrit la réponse immunitaire antitumorale en trois étapes : l'élimination, l'équilibre et l'échappement^{42,172} (Fig. 19).

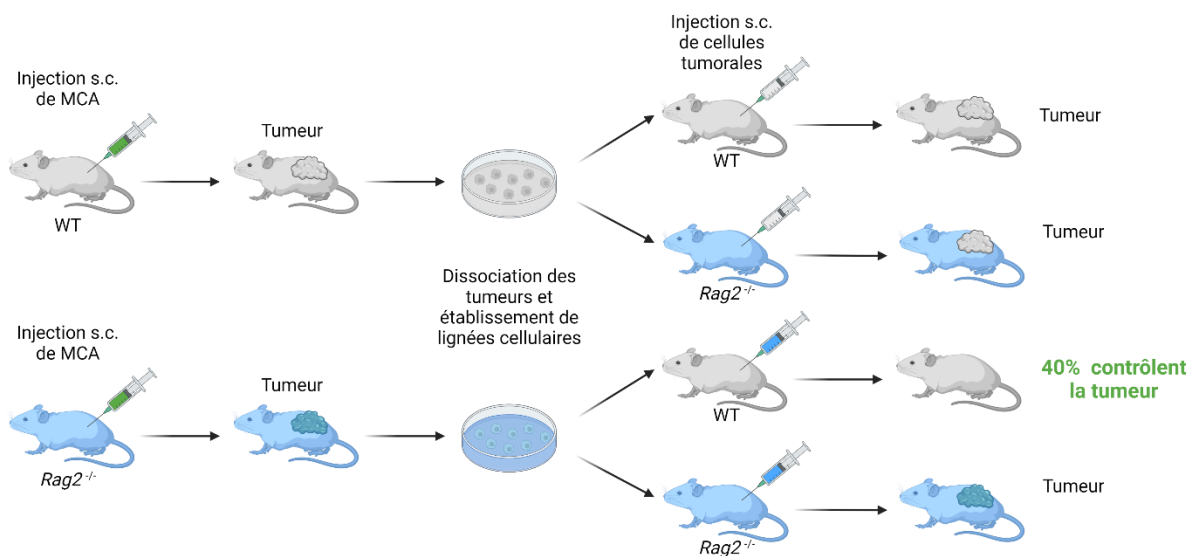


Figure 18: Démonstration expérimentale de l'immunoédition

Représentation schématique des expériences menées par Shankaran et al.¹⁷¹. Des lignées cellulaires ont été établies à partir de tumeurs induites par injection sous-cutanée de MCA chez des souris WT ou *Rag2*^{-/-}. Ces lignées ont ensuite été injectées chez des souris WT ou *Rag2*^{-/-} naïves. Les cellules tumorales issues de souris WT ont développé une tumeur chez les souris receveuses WT et *Rag2*^{-/-}. De même, les cellules tumorales issues de souris *Rag2*^{-/-} ont développé une tumeur chez les souris receveuses *Rag2*^{-/-}. Par contre, chez 40% des souris WT receveuses, les cellules tumorales issues de souris *Rag2*^{-/-} ont été contrôlées et n'ont pas développé de tumeur. Réalisé avec Biorender.

1.3.1. Élimination

Quand une cellule devient maligne, elle émet des signaux de danger comme des interférons de type I, exprime des molécules de stress cellulaire comme MICA (*MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A*) et MICB et elle présente des antigènes aberrants. Les cellules tumorales mourantes ainsi que les tissus environnants endommagés relarguent des DAMP (*Damage-associated molecular patterns*) tels que HMGB1 (*High mobility group box 1*)¹⁷². Ces signaux induisent une réponse inflammatoire précoce menée par le système immunitaire inné. Les lymphocytes NK, NKT et les $\gamma\delta$ T ainsi que les macrophages et les DC constituent la première ligne de défense⁵⁰. Bien qu'en théorie la réponse du système immunitaire inné puisse contrôler le développement d'un cancer et détruire les cellules malignes, il semble que la coopération de l'immunité innée et l'immunité adaptative soit nécessaire pour établir une réponse antitumorale efficace et durable¹⁷². Les lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux jouent un rôle majeur dans la destruction des cellules tumorales et la protection à long terme. Si l'action conjointe des deux bras (inné et adaptatif) du système immunitaire suffit à détruire les cellules tumorales jusqu'à la dernière, le processus d'immunoédition s'arrête là et le tissu revient dans un état d'homéostasie. Au contraire, si certaines cellules tumorales parviennent à survivre et à échapper à la destruction, un état d'équilibre s'installe entre les cellules tumorales et le système immunitaire¹⁷².

1.3.2. Équilibre

La réponse antitumorale initiale cible facilement les cellules tumorales immunogènes et exerce une forte pression de sélection qui sélectionne les phénotypes non immunogènes. Cela conduit à un équilibre : les cellules immunitaires contrôlent la croissance de la tumeur mais ne parviennent pas à éradiquer complètement les cellules malignes. Au cours de cette phase, qui peut durer des décennies, une interaction continue entre les cellules immunitaires et les cellules tumorales s'installe¹⁷². Les premières façonnent continuellement les secondes, favorisant la croissance de cellules malignes non immunogènes tandis qu'elles-mêmes mettent en place de multiples stratégies pour échapper à l'attaque immunitaire : perte du CMH-I et/ou de la présentation de peptides¹⁷³, expression de FASL¹⁷⁴, de molécules co-inhibitrices¹⁷⁵ et émission de cytokines et de vésicules extracellulaires qui attirent les cellules immunosuppressives¹⁷⁶. En résulte un *statu quo* entre les deux parties et un état de dormance de la tumeur. Les T_{RM} ont un

rôle important dans le contrôle des cellules de mélanome durant la phase d'équilibre et leur déplétion peut déclencher l'échappement¹³¹.

1.3.3. Échappement

Les cellules tumorales finissent par échapper au contrôle immunitaire en raison d'un microenvironnement suffisamment tolérogène ou lorsque l'hôte souffre d'immunodépression, ce qui permet le développement clinique du cancer. À ce stade, le microenvironnement immunitaire est principalement composé de TAM, de MDSC, de DC tolérogènes et de T_{reg} : ces cellules immunosuppressives maintiennent un environnement tolérogène, empêchant les cellules effectrices, et en particulier les lymphocytes T effecteurs, d'exercer leur activité antitumorale¹⁷².

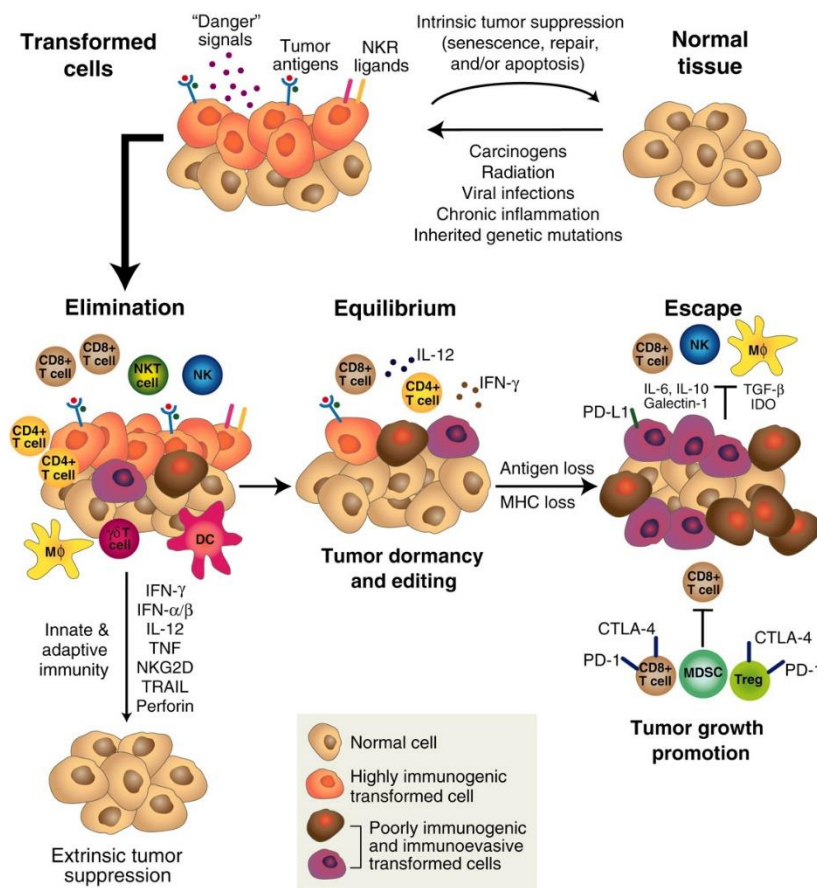


Figure 19: Les trois « É » de l'immunoédition : Élimination, Équilibre, Échappement

La théorie de l'immunoédition décrit trois phases dans la réponse immunitaire antitumorale : (i) l'élimination, durant laquelle l'expression d'antigènes tumoraux et la libération de signaux de danger active le système immunitaire qui va détruire les cellules tumorales. Si toutes les cellules tumorales sont éliminées, le système revient à son état basal. Si des cellules malignes persistent, (ii) l'équilibre se met en place, durant lequel le système immunitaire exerce une pression de sélection et favorise ainsi les cellules tumorales les moins immunogènes. Enfin, (iii) l'échappement se déclenche quand le microenvironnement tumoral devient suffisamment tolérogène ou à l'occasion d'une immunodépression du patient. C'est alors que se développe la maladie clinique que l'on appelle cancer. Extrait de Schreiber *et al.*¹⁷²

2. Les immunothérapies : restaurer la réponse immunitaire

Les immunothérapies visent à réactiver le système immunitaire de l'hôte afin qu'il soit capable de reconnaître et de détruire les cellules tumorales. Les stratégies utilisées historiquement consistaient à traiter les patients avec des cytokines recombinantes (comme les interférons et l'IL-2), des vaccins dirigés contre des antigènes tumoraux (gp100) ou en isolant les lymphocytes T infiltrant la tumeur du patient avant de les amplifier *ex vivo* pour finalement lui réinjecter (transfert adoptif)⁴. Ces stratégies n'ont pas rencontré le succès espéré et une trop faible efficacité ou une trop grande toxicité se sont opposés à leur développement.

Plus récemment, la découverte des points de contrôles immunitaires¹⁷⁷ a focalisé les recherches sur l'immunothérapie des cancers. Les travaux de l'équipe du Pr James P. Allison ont démontré que l'inhibition de CTLA-4 permettait de restaurer la capacité du système immunitaire à détruire la tumeur¹⁷⁸. En parallèle, l'équipe du Pr Tasuku Honjo a démontré le rôle central de PD-1 dans l'inhibition des lymphocytes T¹⁷⁵. Ces travaux de recherche fondamentale chez la souris ont depuis été appliqués chez l'homme et ont révolutionné la prise en charge de plusieurs cancers de très mauvais pronostic, y compris le mélanome avancé¹⁷⁹. Le Pr Allison et le Pr Honjo ont été récompensés par le prix Nobel de Physiologie ou Médecine 2018 pour leurs travaux sur l'inhibition de CTLA-4 et PD-1, respectivement. Les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (et leurs combinaisons) approuvés à ce jour par la FDA (*U.S. Food and drug administration*) pour traiter le mélanome sont répertoriés dans le Tableau 2.

| Molécule(s) Cible(s) (Nom commercial) | Indication(s) | Année d'approbation par la FDA |
|---|---|--------------------------------------|
| Ipilimumab anti-CTLA-4 (Yervoy) | Mélanome non résecable ou métastatique | 2011 |
| | Mélanome de stade III à haut risque de rechute après résection complète (traitement adjuvant) | 2015 |
| | Mélanome non résecable ou métastatique chez le patient pédiatrique de 12 ans ou plus | 2017 |
| Nivolumab anti-PD-1 (Opdivo) | Mélanome non résecable ou métastatique | 2014 |
| | Métastase ganglionnaire (traitement adjuvant) ou mélanome métastatique après résection complète | 2017 |
| Pembrolizumab anti-PD-1 (Keytruda) | Mélanome avancé ou non résecable qui ne répond pas aux autres traitements | 2014 |
| | Traitement de première ligne du mélanome non résecable ou métastatique | 2015 |
| | Métastase ganglionnaire après résection complète | 2019 |
| | Traitement adjuvant du patient adulte ou pédiatrique (≥12 ans) souffrant d'un mélanome de stade IIb ou IIc après résection complète | 2021 |
| Ipilimumab + nivolumab anti-CTLA-4 + anti-PD-1 (Yervoy & Opdivo) | Mélanome non résecable ou métastatique non muté pour BRAF ^{V600} | 2015 |
| | Mélanome non résecable ou métastatique muté ou non pour BRAF ^{V600} | 2016 |
| Atezolizumab anti-PD-L1 (Tecentriq) | Mélanome non résecable ou métastatique muté pour BRAF ^{V600} en combinaison avec cobimetinib et vemurafenib | 2020 |
| Nivolumab + Relatlimab anti-PD-1 + anti-LAG-3 (Opdualag) | Mélanome non résecable ou métastatique chez le patient adulte ou pédiatrique (≥12 ans) | 2022 |

Tableau 2: Inhibiteurs de point de contrôle immunitaire approuvés par la FDA pour traiter le mélanome

2.1. CTLA-4

CTLA-4 a été découvert en 1987 par l'équipe du Dr Pierre Golstein et décrit comme une immunoglobuline surexprimée par les lymphocytes activés et associée à la cytotoxicité des lymphocytes T¹⁸⁰. CTLA-4 et CD28 ont les mêmes ligands : les protéines B7 (CD80 et CD86). En 1995, l'équipe du Pr Allison montre que CTLA-4 a un effet opposé à celui de CD28 sur l'activation des lymphocytes T : l'activation de CD28 induit un signal de costimulation tandis que CTLA-4 induit un signal d'inhibition, suite à l'engagement du TCR¹⁷⁷. Cette découverte amène les auteurs à injecter des anticorps bloquant CTLA-4 chez des souris porteuses de tumeurs issues d'une lignée murine de cancer du côlon injectées sous la peau. L'inhibition de CTLA-4 diminue la croissance des tumeurs établies et permet une protection contre les mêmes cellules tumorales dans des expériences de « *rechallenge* », indiquant une mémoire immunologique¹⁷⁸. Ces expériences ont rapidement abouti au développement d'un anticorps

anti-CTLA-4 humanisé (ipilimumab) qui a démontré qu'il pouvait induire la régression du mélanome métastatique chez certains patients, en combinaison avec un vaccin dirigé contre l'antigène gp100¹⁸¹. Un essai clinique de phase III comparant l'efficacité de l'ipilimumab en combinaison ou non avec un vaccin gp100 avec celle du vaccin seul a conclu que l'ipilimumab avait une meilleure efficacité, avec ou sans vaccin, que le vaccin seul¹⁸². L'ipilimumab en combinaison avec la dacarbazine est aussi plus efficace que la dacarbazine seule chez les patients atteints de mélanome métastatique sans traitement préalable¹⁸³. Ces essais cliniques ont rapidement abouti à l'approbation de l'ipilimumab par la FDA et l'EMA (*European Medicines Agency*) en 2011 pour le traitement du mélanome non résecable ou métastatique.

2.1.1. Biologie et rôles physiologiques de CTLA-4

CTLA-4 est un récepteur inhibiteur qui est exprimé très rapidement par les lymphocytes T après l'engagement de leur TCR. Des molécules de CTLA-4 contenues dans des vésicules intracellulaires sont aussi adressées à la membrane lors de l'activation²⁰. Comme nous l'avons vu, CTLA-4 et CD28 ont les mêmes ligands que sont CD80 et CD86. L'activité inhibitrice de CTLA-4 sur les lymphocytes T est majoritairement due à la compétition avec CD28 pour leurs ligands communs. CTLA-4 ayant une meilleure affinité que CD28 pour CD80 et CD86, il inhibe efficacement le signal de costimulation quand il est exprimé à la membrane des lymphocytes T¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ (Fig. 20). L'activité de CTLA-4 est donc la plus importante au moment du « priming » des lymphocytes T et du maintien de la tolérance pour les auto-antigènes. En effet, les souris déficientes pour *Ctla4* développent une hyper prolifération des lymphocytes T qui infiltrent la plupart des tissus et les détruisent, les souris ne survivent que 3 à 4 semaines^{187,188}.

En plus de cette inhibition intrinsèque de l'activation des lymphocytes T, CTLA-4 peut agir de façon indirecte. Contrairement aux lymphocytes T effecteurs qui expriment CTLA-4 quand ils sont activés, les T_{reg} expriment CTLA-4 de façon continue et importante car FoxP3 amplifie et stabilise l'expression de *CTLA4*¹⁸⁹. Ainsi, l'expression de CTLA-4 par les T_{reg} limite la disponibilité locale de CD80 et CD86 pour la costimulation des lymphocytes effecteurs environnants²⁰. Cet effet ne se limite pas aux T_{reg}, et l'expression de CTLA-4 par les lymphocytes T conventionnels inhibe aussi l'activation des lymphocytes voisins¹⁹⁰. La liaison de CTLA-4 aux molécules CD80 et CD86 peut aussi induire la trogocytose de ces dernières. De cette manière, CD80 et CD86 sont capturés puis dégradés dans la cellule exprimant CTLA-

⁴^{191,192}, ce qui limite encore leur disponibilité pour la costimulation des lymphocytes effecteurs. Les protéines CD80 et CD86 exprimées par les APC peuvent aussi agir comme un récepteur quand elles sont activées par CTLA-4 : elles induisent alors l'expression de l'enzyme immunosuppressive IDO¹⁹³ (Indoleamine 2,3-dioxygénase) qui catabolise le tryptophane par la voie de la kynurénine. Chez l'humain, *CTLA4* code pour deux transcrits : un de 650 paires de bases (pb) et un autre de 550 pb¹⁹⁴. Le transcrit de 650 pb correspond à la forme transmembranaire de CTLA-4 tandis que le transcrit de 550pb est issu d'un épissage alternatif qui élimine l'exon 2 codant pour la région transmembranaire. Cette forme soluble de CTLA-4 est détectée dans le sang de donneurs sains et les auteurs ont montré *in vitro* qu'elle est majoritairement exprimée par les lymphocytes au repos. En effet, sous stimulation par PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) et ionomycine ou anti-CD3, les lymphocytes expriment majoritairement le CTLA-4 membranaire et l'expression de la forme soluble est inhibée¹⁹⁴. Ce CTLA-4 soluble pourrait donc être un mécanisme passif de maintien de l'homéostasie immunitaire.

CTLA-4 inhibe donc l'activation des lymphocytes effecteurs en étant en compétition avec CD28 pour les signaux de costimulation CD80 et CD86 ainsi qu'en limitant la disponibilité de ses signaux pour les cellules environnantes. Cependant, on ne sait pas si CTLA-4 transduit un signal dans la cellule qui l'exprime quand il se lie à ses ligands²⁰.

2.1.2. Bloquer CTLA-4

Sur la base des travaux démontrant les mécanismes d'inhibition de CTLA-4 chez la souris, l'ipilimumab, le premier anticorps anti-CTLA-4 utilisé chez l'homme a été conçu pour empêcher son interaction avec CD80 et CD86²⁰. L'ipilimumab est un anticorps monoclonal entièrement humain anti-CTLA-4 (IgG1 κ) recombinant^{195,196}. L'étude de la structure du complexe ipilimumab:CTLA-4 par cristallographie à rayons X confirme que l'ipilimumab se fixe bien sur le domaine d'interaction avec les molécules B7 et qu'il empêche leur liaison¹⁹⁷.

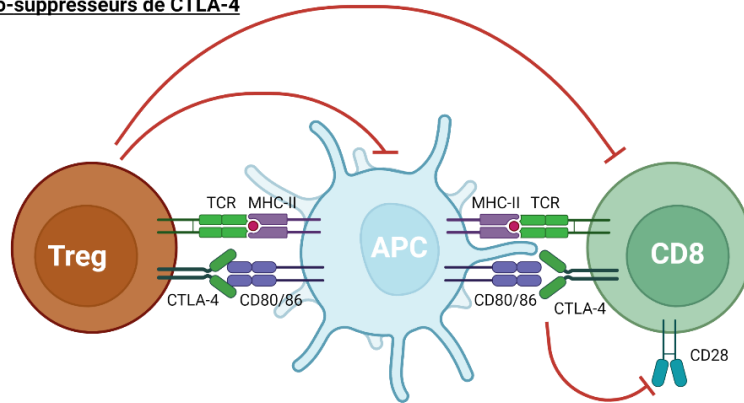
En bloquant l'interaction de CTLA-4 avec ses ligands, un anticorps anti-CTLA-4 agit donc au moment du « priming » des lymphocytes T par les DC au niveau du ganglion drainant la tumeur en favorisant les signaux de costimulation dépendants de CD28²⁰(Fig. 20). Il pourrait aussi avoir un effet directement dans la tumeur sur la réactivation des lymphocytes infiltrant la tumeur par les DC intra-tumorales voire dans les TLS se trouvant au sein de la tumeur²⁰, y

compris sur les T_{reg} ¹⁹⁸. L'inhibition de CTLA-4 semble favoriser l'expansion des lymphocytes spécifiques de la tumeur au sein du microenvironnement tumoral mais pas en périphérie¹⁹⁹. Ainsi l'inhibition de CTLA-4 amplifie les CD8 épuisés ainsi qu'une population de CD4 exprimant PD-1, ICOS (*Inducible T cell costimulator*) dans la tumeur²⁰⁰. L'ipilimumab entraîne aussi un élargissement du répertoire de TCR dans le sang périphérique^{201,202}. Dans le mélanome en particulier, il élargi le répertoire des CD8 circulants réactifs pour des antigènes tumoraux²⁰³. Cet élargissement du répertoire TCR pourrait s'expliquer par une baisse du seuil de signaux de costimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes T quand CTLA-4 est inhibé. Selon ce modèle, les lymphocytes T ayant une faible affinité pour certains antigènes tumoraux ne sont pas activés avant traitement et pourraient ainsi être activés quand CTLA-4 est inhibé²⁰. Cette hypothèse est confortée par le fait que l'élargissement du répertoire TCR est aussi associé à l'apparition d'effets indésirables immunologiques (*cf.* chap.II§2.5)²⁰⁴, ce qui suggèrent que CTLA-4 baisse le seuil d'activation des lymphocytes T de façon non-spécifique.

Une étude rapporte que l'ipilimumab augmente l'infiltration des CD8 et des CD4 dans la tumeur, y compris la densité de T_{reg} et conclut que l'ipilimumab ne déplete pas les T_{reg} intratumoraux chez les patients²⁰⁵. Cependant, les biais d'échantillonnages évoqués ci-dessus font que les tumeurs disponibles pour être étudiées post-traitement pourraient correspondre aux lésions qui ne répondent pas ou qui ont été prélevées plusieurs semaines après la dernière injection d'ipilimumab et qui ne permettraient donc pas de voir la déplétion des T_{reg} ²⁰⁶. Dans des souris exprimant des récepteurs γ pour le fragment Fc ($Fc\gamma R$) humains, des anti-CTLA-4 du même isotype que l'ipilimumab déplètent les T_{reg} intratumoraux *in vivo*²⁰⁷. De même, les anticorps anti-CTLA-4 qui sont mieux reconnus par les $Fc\gamma R$ permettent une meilleure réponse antitumorale et une amélioration de la survie des souris²⁰⁷. Enfin, cette étude montre que le polymorphisme CD16a-V158F qui confère une haute affinité au $Fc\gamma RIIIa$, est associé à une meilleure réponse des patients atteints de mélanome métastatique et traités par ipilimumab²⁰⁷. Cette étude suggère donc que l'ipilimumab est bien capable d'induire la déplétion des T_{reg} chez les patients et que cela pourrait potentiellement participer à son efficacité antitumorale.

En plus de bloquer l'interaction de CTLA-4 avec ses ligands et de déplete les T_{reg} , les anti-CTLA-4 peuvent aussi avoir un effet sur les cellules myéloïdes *via* leur $Fc\gamma R$. En effet, indépendamment de la déplétion des T_{reg} , l'engagement du $Fc\gamma R$ sur les cellules myéloïdes active la signalisation interféron de type I et diminue la proportion de TAM immunosuppresseurs chez la souris²⁰⁸.

Effets immuno-suppresseurs de CTLA-4



Mécanismes d'action des anti-CTLA-4

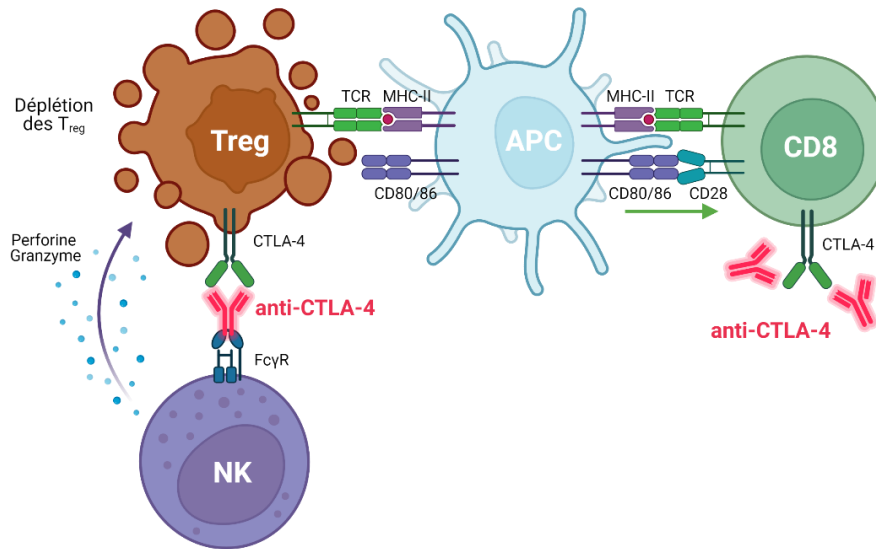


Figure 20: Mécanismes d'action de CTLA-4 et de son inhibition

CTLA-4 possède les mêmes ligands que CD28, CD80 et CD86 mais il a une meilleure affinité. CTLA-4 est donc en compétition avec CD28 pour leurs ligands et il inhibe ainsi les signaux de costimulation des lymphocytes T. CTLA-4 est fortement exprimé par les T_{reg} et cela participe à leur pouvoir immunosuppresseur puisqu'en se liant avec les CD80 et CD86 exprimés par les APC, le CTLA-4 exprimé par les T_{reg} limite leur disponibilité pour costimuler les lymphocytes effecteurs. Les T_{reg} sont aussi capables de trogocytter les molécules de CD80 et CD86 grâce à leur expression de CTLA-4 (non représenté).

Les anticorps anti-CTLA-4 bloquent son interaction avec ses ligands, ce qui les rend disponibles pour la costimulation des lymphocytes effecteurs. Les anticorps possédant une région Fc fonctionnelle peuvent aussi induire la déplétion des T_{reg} par ADCC ou ADCP. L'efficacité de ce mécanisme, démontré chez la souris, est débattue chez les patients traités par ipilimumab. Réalisé avec Biorender.

2.2. PD-1

PD-1 a été découvert en 1992 par l'équipe du Pr Tasuku Honjo qui l'ont d'abord décrit comme un récepteur associé à la mort cellulaire programmée²⁰⁹. La délétion de *Pdcd1* (codant pour PD-1) chez la souris induit des phénotypes ressemblant à des maladies auto-immunes^{210,211}, suggérant un rôle dans le maintien de la tolérance immunitaire. PD-L1 a été

découvert de manière indépendante et d'abord décrit comme un récepteur de costimulation par analogie aux molécules B7²¹². Le lien a ensuite été fait et Freeman *et al.* ont montré que la liaison de PD-L1 à PD-1 inhibe la prolifération et la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T quand leur TCR est engagé²¹³. Un deuxième ligand de PD-1, PD-L2 a été découvert plus tard^{214,215}. PD-L2 est majoritairement exprimé par les cellules dendritiques et, de la même façon que PD-L1, sa liaison à PD-1 inhibe l'activation des lymphocytes T. L'expression PD-L1 est élevée dans plusieurs types de cancers, dont le mélanome, et elle est augmentée en réponse à l'IFN- γ ²¹⁶. En 2002, l'équipe du Pr Honjo a montré que l'expression de PD-L1 par les cellules cancéreuses inhibe l'activité cytotoxique des CD8 à leur rencontre *in vitro* et nuit à l'immunité antitumorale *in vivo* chez la souris¹⁷⁵. Cette étude a démontré que bloquer l'interaction entre PD-1 et PD-L1 permettait d'améliorer l'immunité antitumorale et a ouvert la voie à l'utilisation du nivolumab, un anticorps bloquant PD-1 pour traiter plusieurs types de cancers²¹⁷. La FDA a finalement approuvé l'indication du nivolumab pour traiter le mélanome non résecable ou métastatique en 2014, suivie par l'EMA en 2015.

2.2.1. Biologie et rôles physiologiques de PD-1

PD-1 est un récepteur inhibiteur exprimé par les lymphocytes T, B et NK lorsqu'ils sont activés^{20,66} ainsi que par certaines cellules myéloïdes²¹⁸. La liaison de PD-1 par un de ses deux ligands, PD-L1 et PD-L2, inhibe l'activation du lymphocyte exprimant PD-1, agissant comme un frein pour prévenir la sur-activation des lymphocytes²¹⁸. PD-L1 est exprimé dans la plupart des tissus, ce qui lui confère un rôle de maintien de la tolérance périphérique, tandis que l'expression de PD-L2 est restreinte aux DC²¹⁹. L'expression de PD-L1 est activée par l'IFN- γ ^{213,214} tandis que PD-L2 est plutôt induit par les cytokines de type Th2²⁰. PD-1 et ses ligands sont peu exprimés à l'état basal, c'est l'activation d'une réponse immunitaire qui induit leur expression, ce qui en fait un mécanisme de rétrocontrôle négatif qui prévient un emballement de la réponse immunitaire²⁰. La liaison de PD-1 par ses ligands induit le recrutement de la phosphatase SHP2 qui déphosphoryle des molécules impliquées dans la signalisation du TCR et de CD28 (Fig. 21)²¹⁸. L'activation de PD-1 interfère ainsi dans les voies de signalisation dépendantes de PI3K-AKT, RAS, ERK, VAV1 et PLC γ (Phospholipase C γ), ce qui aboutit à une inhibition de l'activation, la prolifération, la survie, la sécrétion de cytokines ainsi qu'une altération du métabolisme des lymphocytes²¹⁸. L'interaction de PD-L1 avec le PD-1 exprimé par les lymphocytes diminue aussi leur motilité, probablement en stabilisant une synapse immunologique tolérogène dans les organes lymphoïdes²²⁰. À titre d'exemple, PD-1 permet le

maintien de la tolérance locale dans la peau chez la souris, en empêchant les CD8 spécifiques d'auto-antigènes de se différencier vers un phénotype effecteur pathogénique ainsi qu'en limitant leur accès aux cellules exprimant l'antigène²²¹.

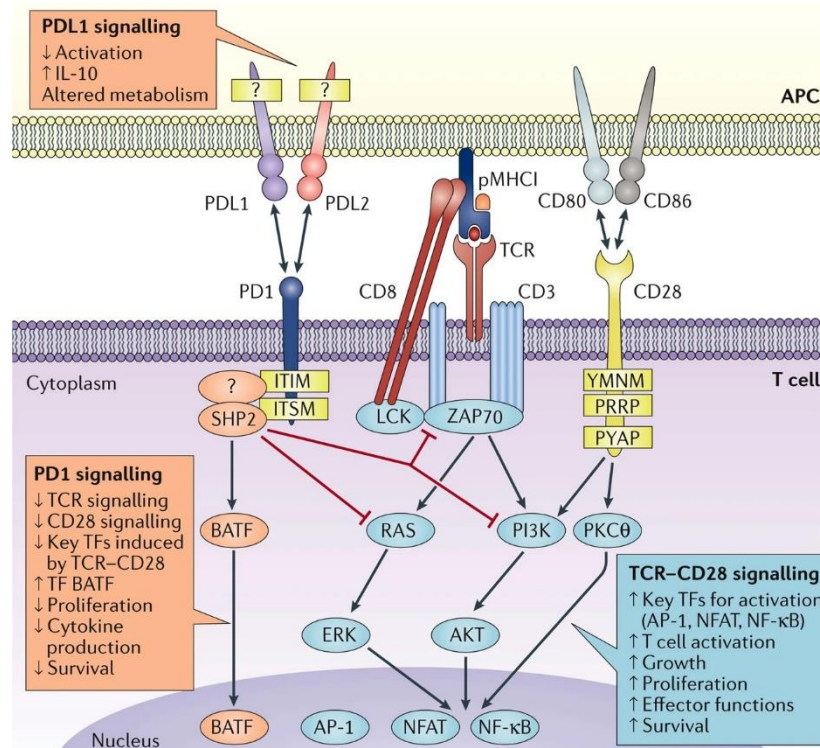


Figure 21: Signalisation induite par la liaison de PD-1

La liaison de PD-1 par un ses ligands (PD-L1 et PD-L2) induit le recrutement de la phosphatase SHP2 qui déphosphoryle des molécules impliquées dans la signalisation du TCR et de CD28. Ceci interfère dans les voies de signalisation dépendantes de PI3K-AKT, RAS, ERK, VAV et PLCγ, ce qui aboutit à une inhibition de l'activation, la prolifération, la survie, la sécrétion de cytokines ainsi qu'une altération du métabolisme des lymphocytes. Extrait de Sharpe *et al.*²¹⁸

2.2.2. Bloquer PD-1

Sur la base de l'efficacité encourageante de l'inhibition de PD-1/PD-L1 pour améliorer la réponse immunitaire antitumorale chez la souris¹⁷⁵, cette stratégie a rapidement été transposée en clinique. Le nivolumab (IgG4 anti-PD-1 entièrement humain²²²) a rapidement démontré sa sécurité et son efficacité dans le traitement de plusieurs cancers solides, dont le mélanome^{217,223}. Le nivolumab a été approuvé par la FDA en 2014 pour le traitement du mélanome non résecable ou métastatique puis par l'EMA en 2015. Un deuxième anti-PD-1, le pembrolizumab (IgG4 anti-PD-1 humanisé avec une glycosylation stabilisatrice dans la région

Fc²²⁴) a suivi, d'abord pour les patients dont la maladie est réfractaire aux autres traitements, puis en première ligne de traitement en 2015 (Tableau 2).

Les anti-PD-1 agissent en bloquant l'interaction de PD-1 avec ses ligands PD-L1 et PD-L2. Ce faisant, ils préviennent l'inhibition de la signalisation du TCR et de CD28 médiée par l'activation PD-1, ce qui permet de restaurer les capacités effectrices des lymphocytes T²⁰. Le blocage de PD-1 a d'abord été décrite comme capable de revigorer les capacités effectrices des lymphocytes T CD8 épuisés mais l'étude épigénétique de ces cellules a conclu que l'inhibition de PD-1 ne suffisait pas à inverser ce phénotype^{225,226}. Le modèle actuel veut que tous les lymphocytes T épuisés ne réagissent pas de la même manière à l'inhibition de PD-1. Ce sont principalement une sous-population de « précurseurs épuisés » qui sont responsables de l'expansion des CD8 induite par les anti-PD-1^{110,227,228}. Cette population est définie par l'expression de niveaux intermédiaires de PD-1, l'expression du facteur de transcription TCF-1 (codé par *TCF7*) et l'absence d'expression de TIM-3, tandis que les CD8 complètement épuisés expriment fortement PD-1, n'expriment pas TCF-1 et expriment TIM-3 (*cf.* chap. II§.1.2.3)^{106,109}.

L'efficacité des anti-PD-1 nécessite aussi l'implication des CD4²²⁹ et le blocage de PD-1 permettrait de restaurer l'activation des CD4 « épuisés » PD-1^{high} CD39⁺ spécifiques des antigènes tumoraux²³⁰. L'inhibition de PD-1 pourrait aussi avoir un effet paradoxal en favorisant l'infiltration des T_{reg} dans la tumeur. Le blocage de PD-1 peut augmenter la prolifération et la capacité immunosuppressive des T_{reg} qui expriment PD-1 ce qui pourrait induire un phénomène d'hyperprogression décrit chez certains patients²³¹. Dans une prépublication déposée récemment sur BioRxiv, les auteurs proposent que l'inhibition de PD-1 n'a pas d'effet direct sur l'accumulation de T_{reg}. Ce seraient les CD8, réactivés par l'inhibition de PD-1 qui sécrèteraient de l'IL-2, IL-2 qui induirait l'expression du récepteur anti-apoptotique ICOS à la surface des T_{reg} et causerait leur accumulation²³².

De même, les lymphocytes NK activés peuvent exprimer PD-1 et l'interaction entre des cellules tumorales PD-L1⁺ et des NK PD-1⁺ diminuent leur capacité de dégranulation et de production d'IFN- γ . Par conséquent, le blocage de PD-1 peut augmenter les fonctions effectrices des NK²³³.

Enfin, certaines sous-populations de cellules de mélanome expriment PD-1 chez la souris et l'humain²³⁴. Dans les cellules, l'interaction de PD-1 avec PD-L1 participe à la croissance tumorale, même chez les souris immunodéficientes²³⁴. L'efficacité de l'inhibition de PD-1 pourrait donc être en partie due à l'abolition de cet effet protumoral intrinsèque.

2.3. Combiner anti-CTLA-4 et anti-PD-1

En dépit de leur efficacité durable chez certains patients, la plupart ne répondent pas aux monothérapies anti-CTLA ou anti-PD-1. Au vu de leurs mécanismes d'action différents, la bithérapie anti-CTLA-4 et d'anti-PD-1 a été envisagée en supposant un effet additif. Cela se vérifie chez la souris où la bithérapie est plus efficace que les deux monothérapies. En effet, chez les souris porteuse d'un mélanome B16 et vaccinées avec des cellules tumorales irradiées exprimant le GM-CSF (Gvax) ou le Flt3-ligand (Fvax), environ 50% des souris traitées avec la bithérapie survivent contre 25% et 10% pour les monothérapies anti-PD-1 et anti-CTLA-4, respectivement²³⁵. La bithérapie a un effet bénéfique particulièrement marqué sur l'infiltration des CD8 effecteurs et sur le ratio CD8/T_{reg} parmi les lymphocytes T infiltrant la tumeur. Sur la base de ces travaux précliniques et de leurs mécanismes d'action apparemment indépendant, la combinaison des anticorps anti-PD-1 et anti-CTLA-4 été administrée chez l'homme²³⁶. L'essai clinique de phase III « Checkmate 067 » a aujourd'hui plus de 6,5 ans de recul pour étudier la survie des patients traités par ipilimumab, nivolumab ou la combinaison des deux²⁷. La meilleure efficacité du nivolumab et de la bithérapie par rapport à l'ipilimumab est clairement démontrée mais malheureusement cet essai clinique n'a pas été conçu pour comparer l'efficacité du nivolumab avec celle de la bithérapie. Cependant les analyses descriptives suggèrent une meilleure efficacité avec cette dernière²⁷ (Fig. 8). De plus, la bithérapie permet une activité antitumorale dans une cohorte de patients atteints de mélanome avancé réfractaire au blocage de PD-1 ou de PD-L1²³⁷. Il est également démontré que la bithérapie a une meilleure efficacité chez les patients présentant des métastases cérébrales²⁸ par rapport à la monothérapie. Cependant, il est difficile de déterminer *a priori* quelle est le meilleur régime de traitement pour chaque patient. En effet, la bithérapie est associée à un profil de toxicité plus fréquent et plus sévère que la monothérapie²⁷ et celle-ci est toujours recommandée pour les patients dont la maladie est moins avancée ou dont l'état général (statut ECOG) est faible²³⁸.

2.4. Les autres points de contrôle immunitaire

CTLA-4 et PD-1 font partie de la grande famille des points de contrôle immunitaire qui comprend des récepteurs inhibiteurs (comme CTLA-4 et PD-1) mais aussi des récepteurs activateurs^{239,240} et qui sont répertoriés dans le Tableau 3. Parmi les récepteurs inhibiteurs (autres que CTLA-4 et PD-1), les plus étudiés sont LAG-3, TIGIT et TIM-3.

LAG-3 est un récepteur exprimé par les CD8 et les CD4 quand ils sont activés ainsi que par les T_{reg}. En se liant au CMH-II, à la galectine-3 et à l' α -synucléine, LAG-3 inhibe l'activation des lymphocytes effecteurs et potentialise les capacités immunosuppressives des T_{reg}²⁴¹. En 2022, la combinaison du nivolumab et du relatlimab (anti-LAG-3) a démontré une efficacité supérieure au nivolumab seul²⁴² et a été approuvée par la FDA et l'EMA pour traiter le mélanome non résecable ou métastatique. Plusieurs anticorps bispécifiques anti-PD-1 anti-LAG3 sont évalués dans études précliniques ou cliniques comme le tebotelimab dans le mélanome mucosal (NCT04653038).

TIGIT est un autre récepteur inhibiteur qui interagit avec CD155 et CD112 et dont l'inhibition est envisagée en combinaison avec un anti-PD-L1 dans le cancer du poumon²⁴³. Malheureusement, deux essais cliniques de phase III ont conclu que la combinaison de l'anti-TIGIT avec l'anti-PD-L1 n'apportait pas de bénéfice de PFS comparée à l'anti-PD-L1 seul^{241,244}.

Quand il se lie à un de ses ligands (*cf.* Tableau 3), **TIM-3** induit l'apoptose ou l'épuisement des CD8. Le nombre important des ligands de TIM-3 rend l'étude de leurs effets propres difficile. Deux études de phase I et I/II ont validé la sureté de l'inhibition combinée de TIM-3 et PD-1 dans plusieurs types de cancers solides avancés²⁴⁰ et plusieurs anticorps anti-TIM-3 sont actuellement en évaluation clinique dans de multiples types de cancers²⁴⁵.

Une autre stratégie consiste à utiliser un anticorps agoniste d'un récepteur activateur en combinaison avec un antagoniste d'un récepteur inhibiteur comme un anti-PD-1. Quatre récepteurs activateurs sont principalement envisagés : GITR, OX40, 4-1BB et ICOS²⁴⁰. Des études précliniques ont démontré que l'activation de ses récepteurs améliore l'immunité antitumorale dans plusieurs modèles de tumeurs. Le potentiel thérapeutique de ces quatre points de contrôle immunitaires activateurs est aujourd'hui évalué dans plusieurs essais cliniques²⁴¹.

| Molécule | Ligand(s) | Expression | Fonction biologique | Fonction moléculaire |
|-------------------------------|--|---|--|--|
| Récepteurs inhibiteurs | | | | |
| CTLA4 | CD80 CD86 | Lymphocytes T activés, T _{reg} | Inhibe la costimulation des lymphocytes T (en particulier au « <i>priming</i> »). | Inhibition compétitive de la costimulation par CD28. Déplétion des T _{reg} ? |
| PD-1 | PD-L1 PD-L2 | Lymphocytes T activés, NK, NKT, lymphocytes B, macrophages, certaines DC | Inhibe la costimulation des lymphocytes T (en particulier dans la périphérie). Maintien tolérance dans les tissus. | Inhibe signalisation TCR et CD28. |
| PD-L1 | PD-1 CD80 | Induite dans les DC, monocytes, macrophages, mastocytes, lymphocytes T, lymphocytes B, NK | Inhibe activité des lymphocytes T dans les tissus périphériques inflammés. | Se lie à PD-1. Signalisation inverse méconnue. |
| LAG3 | MHC-II Galectine-3 α-synucléine | Lymphocytes T activés, T _{reg} , NK | Inhibe expansion des lymphocytes. Active DC. | Compétition pour la liaison au MHC-II |
| TIM3 | Galectine-9 Phosphatidylsérine HMGB1 CEACAM-1 | Th1, CD8 Tc1, T _{reg} , DC, NK, monocytes | Inhibe immunité de type Th1. Maintien tolérance dans les tissus. | Inhibition de la signalisation TCR. Différences entre les ligands méconnues. |
| TIGIT | CD155 CD112 | CD4 et CD8, T _{reg} , T _{FH} , NK | Inhibition de l'activité des lymphocytes T. Induction de DC tolérogènes. | Inhibition compétitive de la costimulation DNAM1. Interaction avec DNAM1 en <i>cis</i> qui mène à une inhibition intrinsèque de la cellule. |
| Récepteurs activateurs | | | | |
| VISTA | Inconnu | Lymphocytes T et T _{reg} activés, cellules myéloïdes, APC matures | Inhibition de l'activité des lymphocytes T. Suppression des CD4. | Augmente le seuil d'activation de la signalisation TCR. Induit expression de <i>FOXP3</i> . |
| ICOS | ICOSL | Lymphocytes T activés, lymphocytes B, ILC2 | Costimulation. Réponse immunitaire de type I et II. Maintien des T _{reg} . Différenciation des T _{FH} . | Recrutement de la sous-unité p50 PI3K (signalisation AKT). Augmente la signalisation calcique (PLCy). |
| OX40 | OX40L | Lymphocytes T activés, T _{reg} , NK, NKT, neutrophiles | Maintien et augmente la réponse CD4. Rôle dans la fonction des CD8 et des T _{reg} | Régulation de BCL2/XL (survie). Augmente signalisation PI3K/AKT. |
| GITR | GITRL | Lymphocytes T activés, T _{reg} , lymphocytes B, NK, macrophages | Inhibition des T _{reg} . Costimulation des lymphocytes T, activation des NK | Signalisation <i>via</i> TRAF5 |
| 4-1BB (CD137) | 4-1BBL | Lymphocytes T activés, T _{reg} , NK, monocytes, DC, lymphocytes B | Costimulation des lymphocytes T. Activation des DC. | Signalisation <i>via</i> TRAF1 et TRAF2 |
| CD40 | CD40L | APC, lymphocytes B, monocytes, cellules non-hématopoïétiques (fibroblastes, cellules endothéliales) | « <i>Licensing</i> » des APC | Signalisation <i>via</i> TRAF2, 3, 5, 6. Mécanismes indépendants de TRAF ? |
| CD27 | CD70 | CD4 et CD8, lymphocytes B, NK | Costimulation des lymphocytes T et NK. Génération de lymphocytes T mémoires | Signalisation <i>via</i> TRAF2, TRAF5 |

Tableau 3: Points de contrôles immunitaires et leurs effets

Adapté de Wei et al.²⁰

2.5. Effets indésirables immunologiques

Le traitement du cancer par ICI induit l'apparition d'effets indésirables immunologiques (irAEs, *Immune-related adverse events*) qui sont très fréquents et peuvent toucher la majorité des organes avec une sévérité variable^{246,247} (Fig. 22). La plupart peuvent être pris en charge de façon efficace mais certains peuvent induire des séquelles irréversibles ou mettre en danger la vie du patient. Chaque régime de traitement par ICI est associé à un profil de toxicité différent et la combinaison de plusieurs médicaments complique l'étude des effets indésirables associés. À titre d'exemple, la quasi-totalité des patients traités par la combinaison ipilimumab et nivolumab développent des irAEs et plus de la moitié de ces patients souffrent d'irAEs de stade III ou IV qui nécessitent l'arrêt du traitement²⁴⁸.

Les points de contrôles immunitaires qui sont CTLA-4 et PD-1 sont impliqués dans le maintien de la tolérance *vis-à-vis* des auto-antigènes ou des antigènes provenant de microorganismes commensaux. Leur inhibition entraîne donc la levée de cette tolérance et l'apparition d'auto-inflammation qui se rapproche de maladies auto-immunes²⁴⁹. Ces effets indésirables sont traités de façon précise en fonction de l'organe touché et de leur gravité²⁵⁰. En première intention, les patients reçoivent le plus souvent des corticostéroïdes en administration locale ou systémique. Cependant certains effets indésirables sont réfractaires aux corticostéroïdes et nécessitent des immunosuppresseurs plus puissants. Les toxicités hépatiques peuvent par exemple être traitées par tocilizumab (anti-IL-6) et les toxicités gastro-intestinales peuvent être prises en charge avec de l'infliximab (anti-TNF) ou du vedolizumab (anti-intégrine $\alpha 4\beta 7$)²⁵⁰. L'utilisation de ces anticorps ayant un fort pouvoir immunosuppresseur est motivée par le fait que ces effets indésirables immunologiques graves se rapprochent des maladies inflammatoires qui touchent les mêmes organes et pour lesquelles l'efficacité de ses médicaments a été démontrée²⁵⁰.

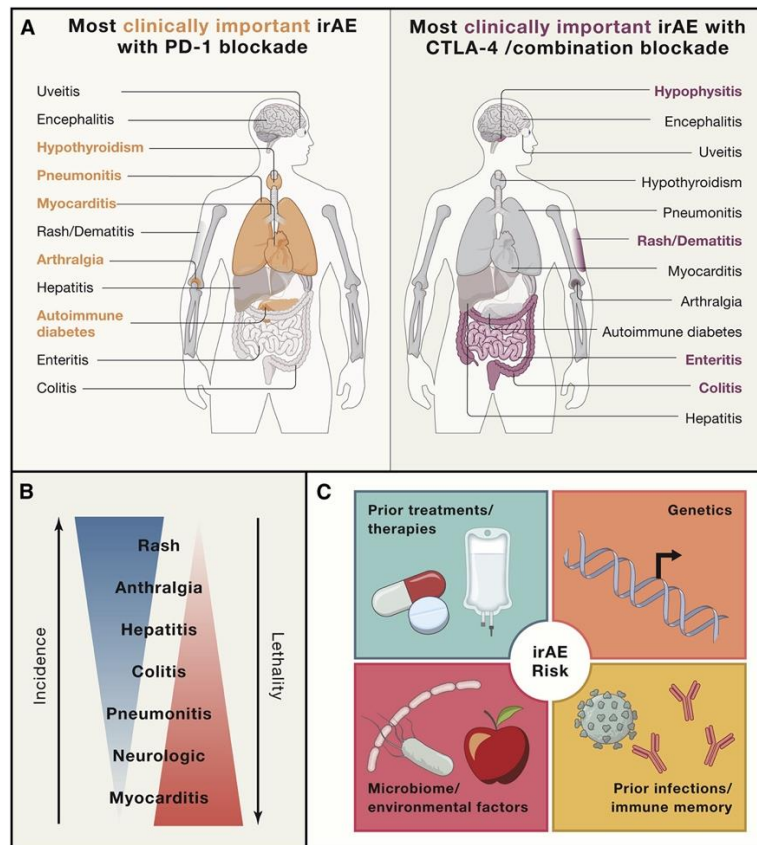


Figure 22 : Organes fréquemment affectés par les effets indésirables immunologiques
 (A) Organes les plus touchés par les irAE provoqués par le traitement par anti-PD-1 (à gauche) et anti-CTLA-4 ou la combinaison des deux (à droite). (B) Relation entre l'incidence et la gravité des irAE. (C) Facteurs de risque qui contribuent potentiellement au développement des irAE. Extrait de Dougan *et al.* ²⁴⁷

1. Résistances et perspectives d'amélioration

1.1.Mécanismes de résistances aux immunothérapies

L'efficacité à long terme des ICI est inédite dans le traitement du mélanome avancé mais chez environ 60%, la maladie résiste au traitement. Les résistances peuvent être primaire, c'est-à-dire que le patient ne répond pas au traitement d'emblée, ou secondaire, si le patient répond dans un premier temps puis rechute. Les mécanismes de résistances peuvent aussi être intrinsèques aux cellules tumorales ou extrinsèques.

Pour qu'une réponse antitumorale ait lieu il faut que les DC collectent des antigènes tumoraux puis migrent vers les organes lymphoïdes secondaires afin d'activer les lymphocytes T. Ces lymphocytes devront alors recirculer dans le sang pour atteindre la tumeur. Ils pourront

alors enclencher une immunité antitumorale effectrice à condition de reconnaître l'antigène dont ils sont spécifiques, s'il est présenté sur le CMH-I des cellules tumorales⁸¹ (cf. chap.II §1.2). Un des principaux mécanismes de résistance primaire correspond à l'impossibilité pour les lymphocytes T d'accéder à leur cible. Ainsi, selon le modèle proposé par Chen et Mellman²⁵¹, les tumeurs humaines peuvent être classées en trois grands phénotypes (Fig. 23):

- (i) Les déserts immunitaires correspondent aux tumeurs qui ne sont pas reconnues par le système immunitaire. Les raisons peuvent être une absence d'antigènes tumoraux ou de leur présentation²⁵², une tolérance induite localement vis-à-vis de la tumeur ou une absence d'activation des lymphocytes spécifiques de la tumeur.
- (ii) Les tumeurs dont le système immunitaire est exclu sont reconnues par le système immunitaire mais les leucocytes ne pénètrent pas dans la tumeur et restent cantonnés à sa périphérie. Ce phénotype est souvent associé à la présence d'une matrice extracellulaire dense et de nombreux fibroblastes associés au cancer²⁵³.
- (iii) Les tumeurs inflammées sont reconnues par les cellules immunitaires et celles-ci parviennent à les infiltrer.

Les deux premiers phénotypes sont considérés comme des tumeurs « froides » par ce qu'elles ne sont pas inflammées tandis que le troisième phénotype correspond aux tumeurs dites « chaudes ». Ainsi le fait qu'une tumeur soit froide (non reconnue ou non infiltrée par les cellules immunitaires), peut constituer un mécanisme de résistance primaire aux ICI²⁵¹.

Les mécanismes de résistance intrinsèques aux cellules tumorales sont principalement liés au défaut de présentation d'antigènes tumoraux sur le CMH-I. Ainsi l'absence d'antigènes tumoraux (dans le cas d'un faible charge mutationnelle), la perte de l'expression du CMH-I, de la β -2-microglobuline (nécessaire au repliement du CMH-I et à son transport vers la membrane plasmique), ou un défaut dans la machinerie de présentation de l'antigène peuvent empêcher les CD8 de reconnaître les cellules tumorales²⁵². L'expression du CMH-I étant induite par l'IFN- γ , une perte de la réponse à l'IFN- γ dans les cellules tumorales peut aussi nuire à leur reconnaissance^{254,255}. La dédifférenciation du mélanome, qui correspond à une plasticité phénotypique des cellules de mélanome est aussi associée à une perte des antigènes mélanocytaires et une diminution de l'immunogénicité de ces cellules²⁵⁶ (cf. (chap.III§2.2.3). L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales peut directement inhiber les lymphocytes

effecteurs et induire une tolérance tumorale²⁵². Enfin, la polarisation des lysosomes des cellules de mélanome et la sécrétion de leur contenu en cathepsine dans la synapse immunologique leur permet de dégrader la perforine libérée par les CD8 et les protège ainsi de l'apoptose²⁵⁷.

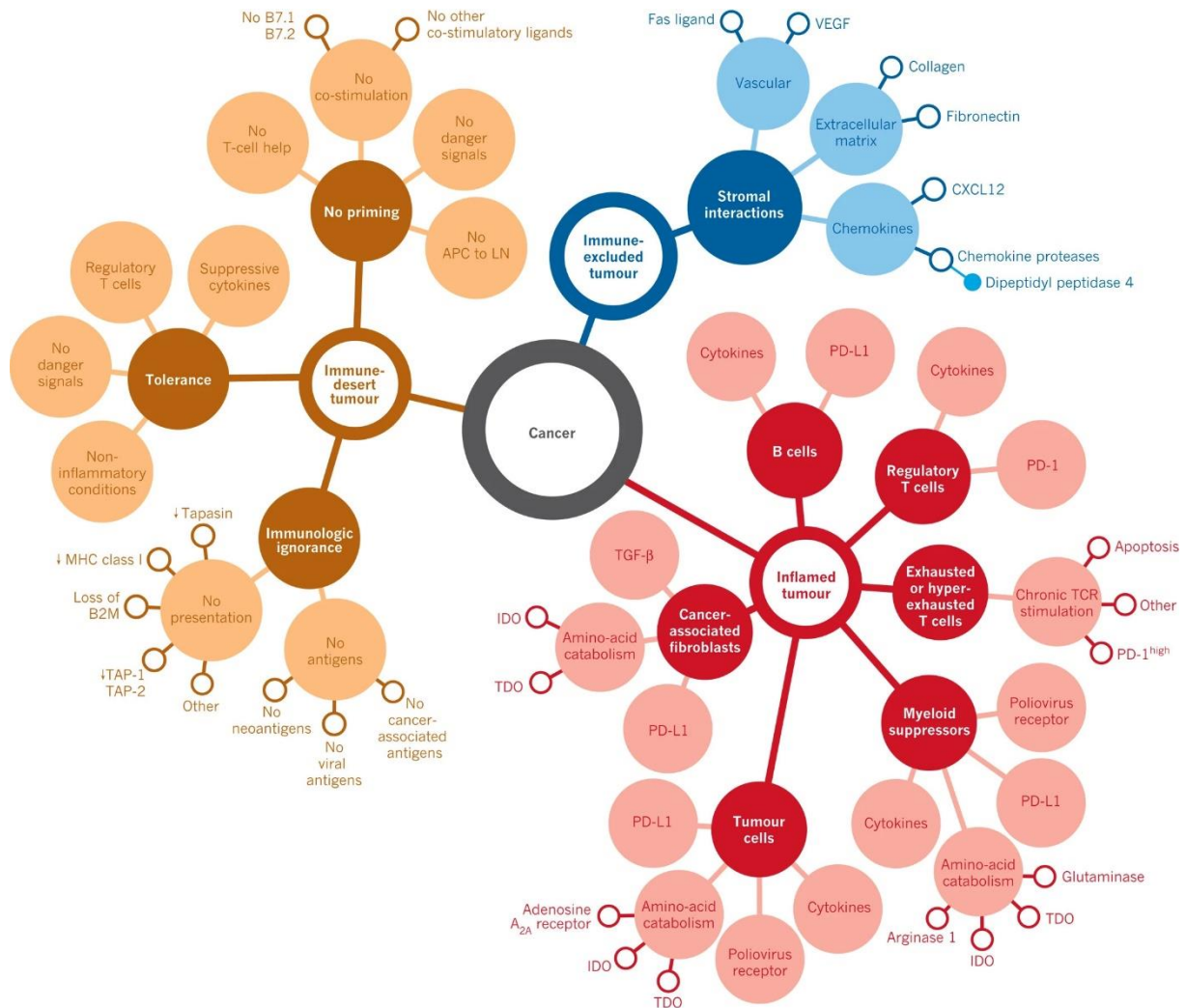


Figure 23: Les trois phénotypes de l'immunité du cancer

Les tumeurs humaines peuvent être classées en trois grands phénotypes : les déserts immunitaires (*Immune-desert tumour*), les tumeurs dont le système immunitaire est exclu (*Immune-excluded tumour*) et les tumeurs inflammées (*Inflamed tumour*). Ces trois phénotypes sont représentés avec les mécanismes de résistances qui leur sont associés. Extrait de Chen & Mellman²⁵¹

Les mécanismes de résistances extrinsèques aux cellules tumorales font intervenir les cellules immunitaires immunosuppressives que nous avons décrit plus tôt : les T_{reg}, les TAM, et les MDSC principalement. Ces cellules inhibent l'activité effectrice des lymphocytes infiltrant la tumeur par leur expression de molécules de surface suppressives (PD-L1, CTLA-4), leur sécrétion de cytokines (TGF-β, IL-10, IL-35) ce qui favorise l'épuisement des lymphocytes T^{153,258}. Les cellules myéloïdes peuvent aussi capturer les anticorps anti-PD-1

grâce à leur FcγR chez la souris et l'humain et ainsi diminuer leur efficacité antitumorale chez la souris²⁵⁹.

Le microenvironnement tumoral est un milieu hostile pour les lymphocytes T : il est fortement hypoxique et la reprogrammation métabolique des cellules tumorales induit de nombreux métabolites immunosuppresseurs comme le lactate, l'adénosine, PGE₂ et la kynurénine^{146,260-262}. Les CD8 sont aussi sensibles au déficit en cholestérol dans le microenvironnement tumoral qui induit chez eux un métabolisme aberrant qui aboutit à leur apoptose autophagique²⁶³. Le métabolisme des sphingolipides est aussi altéré dans le mélanome et cela participe à la résistance aux immunothérapies. En effet, l'expression de la sphingosine kinase 1 par les cellules de mélanome favorise le recrutement des TAM et les oriente vers un phénotype M2-like²⁶⁴. Une forte expression de cette enzyme dans la tumeur est associée à de plus faibles PFS et OS chez les patients atteints de mélanome et traités par anti-PD-1. Le *knock-down* de cette enzyme dans les cellules de mélanome potentialise la réponse aux anti-PD-1 et aux anti-CTLA-4 chez la souris²⁶⁵. La production de céramide par la sphingomyélinase neutre 2 est impliquée dans la formation des exosomes au niveau des corps multivésiculaires²⁶⁶ et la délétion du gène codant pour cette enzyme suffit à supprimer la sécrétion d'exosomes²⁶⁷. Ceci permet de restaurer l'immunité antitumorale dans un modèle de cancer de la prostate chez la souris puisque les exosomes tumoraux portent PD-L1 et inhibent ainsi l'immunité systémique²⁶⁷. Cependant, cette même enzyme est fréquemment sous-exprimée dans le mélanome et particulièrement aux stades avancés de la maladie²⁶⁸. Chez la souris, la surexpression de cette enzyme dans les cellules de mélanome permet une meilleure infiltration des CD8 et oriente l'immunité antitumorale vers une réponse Th1, ce améliore l'efficacité des anti-PD-1 chez la souris²⁶⁸. Le rôle du métabolisme des sphingolipides dans le mélanome a fait l'objet d'un article de revue dont je suis co-premier auteur et qui se trouve en annexe de ce manuscrit (*cf.* annexe II).

Après une réponse initiale aux ICI, des résistances secondaires peuvent se développer si les lymphocytes T spécifiques de la tumeur perdent leurs fonctions effectrices, si les cellules tumorales perdent la présentation de leurs antigènes ou si les cellules tumorales acquièrent des mutations qui leur permettent d'échapper au système immunitaire²⁵².

1.2.L'influence du microbiote

Le microbiote est l'ensemble des microorganismes qui tapissent les barrières naturelles de l'organisme au niveau de la peau, du tractus digestif, des poumons et des muqueuses urogénitales. Le microbiote coévolue avec l'hôte et particulièrement avec son système immunitaire. Ce dialogue permanent commence pendant le développement embryonnaire et amène à un état d'équilibre permettant de maintenir les micro-organismes commensaux à la surface des barrières naturelles tout en veillant à ce qu'ils ne les franchissent pas. Cette « homéostasie » immunitaire entretient la relation mutualiste grâce à une réponse immunitaire spécifique du microbiote qui ne provoque pas d'inflammation²⁶⁹. Une perturbation dans la composition du microbiote affecte le système immunitaire systémique et peut être impliquée dans le développement de maladies inflammatoires ou métaboliques²⁷⁰.

En 2015, Sivan *et al.* ont démontré que la composition du microbiote influe sur la réponse immunitaire antitumorale et sur l'efficacité des anti-PD-L1 dans un modèle murin de mélanome²⁷¹. Ils ont identifié que le genre *Bifidobacterium* est associé à une meilleure réponse antitumorale (avec ou sans anti-PD-L1) et des expériences de transfert de microbiote fécal (FMT) et de gavage de probiotique ont démontré que la colonisation de l'hôte par *Bifidobacterium* est suffisante pour améliorer la réponse immunitaire. En effet, l'infiltration de la tumeur par les CD8, et particulièrement les CD8 spécifiques, est meilleure chez les souris préalablement colonisées par *Bifidobacterium*, grâce à une meilleure activation des DC²⁷¹. La même année, Vétizou *et al.* ont montré que la réponse aux anti-CTLA-4 dépend aussi du microbiote intestinal dans différents modèles de cancer chez la souris et chez les patients atteints de mélanome métastatique et de cancer du poumon²⁷².

En 2018, trois études ont montré une association entre la composition du microbiote et la réponse de patients atteints de cancer du rein, des poumons ou de mélanome aux anti-PD-1²⁷³⁻²⁷⁵. De plus, le traitement par antibiotique semble nuire à la réponse aux anti-PD-1²⁷³. Enfin, le FMT des patients répondeurs chez des souris exemptes de germes (*germ-free*) améliore l'efficacité des anti-PD-1 chez ces souris²⁷³⁻²⁷⁵. Cependant, il est difficile de mettre en évidence une composition microbienne universellement favorable à la réponse aux immunothérapies, d'autant que le régime alimentaire et le lieu (géographique) de vie ont une influence majeure sur la composition basale du microbiote²⁷⁶. Deux autres études montrent que le FMT par des donneurs répondeurs aux ICI permet de lever la résistance chez des patients

receveurs initialement réfractaires aux ICI^{277,278}. La perturbation du microbiote intestinal par traitement antibiotique ou dysbiose pourrait entraîner la diminution de l'expression de l'adressine MadCAM-1 (*Mucosal addressin cell adhesion molecule-1*) ce qui favoriserait la migration de T_{reg} tolérogène exprimant l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ (ligand de MadCAM-1) depuis l'intestin vers la tumeur, où ils exerceraient une activité immunosuppressive et nuiraient à la réponse aux immunothérapies²⁷⁹. La composition du microbiote est aussi associée à la survenue d'effets indésirables immunologiques chez les patients traités par ICI²⁸⁰⁻²⁸². Ce qui est cohérent avec le fait que le FMT de donneurs sains peut soulager des colites de stade 3-4 induites par les ICI et réfractaires aux anti-inflammatoires de première (corticostéroïdes) et deuxième ligne (infliximab et vedolizumab) chez les receveurs²⁸³.

Toutes ces observations ont naturellement abouti à des essais cliniques de phase I visant à évaluer si la supplémentation orale en bactéries ou le FMT de donneurs sains sont capables d'améliorer l'efficacité des ICI chez des patients atteints de cancer avancé^{284,285}. Ces essais démontrent la faisabilité de telles approches et les résultats d'efficacité sont encourageants avec une meilleure PFS chez les personnes supplémentées en bactéries *Clostridium butyricum* parmi des patients atteints de cancer du rein métastatique et traités par anti-PD-1 + anti-CTLA-4 (12,7 vs 2.5 mois, $p=0,001$)²⁸⁴ et 65% de réponse objective parmi les patients atteints de mélanome avancé et traité par anti-PD-1 et FMT²⁸⁵. Une autre stratégie consiste en considérer les micro-organismes commensaux comme de potentielles plateformes vaccinales. Ainsi, la modification génétique d'une bactérie commensale de la peau, *Staphylococcus epidermidis* pour qu'elle exprime un antigène tumoral active les CD8 spécifiques de la tumeur de façon systémique et leur permet de la contrôler dans un modèle de mélanome chez la souris²⁸⁶.

La constatation récente que le microbiote a une influence déterminante sur le système immunitaire de l'hôte et sur sa capacité à répondre aux immunothérapies a fait émerger un nouveau champ de recherches à l'interface entre cancérologie, immunologie et microbiologie. Les nouvelles techniques permettant d'apprécier la composition et la diversité du microbiote devraient permettre de mieux comprendre le dialogue entre commensaux et immunité, ce qui pourrait permettre aux patients atteints de cancer d'être dans de meilleures dispositions pour répondre aux immunothérapies²⁸⁷.

1.3.Nouvelles stratégies

De nouvelles stratégies sont aujourd'hui en développement pour améliorer la réponse et la survie des patients atteints de mélanome. Le succès des ICI administrés en traitement adjuvant de la chirurgie chez les patients dont la tumeur est résécable amène à envisager l'utilisation des ICI avant la chirurgie (néoadjuvant) pour prévenir le risque de rechute. Le développement des vaccins à ARN messagers amène un nouveau souffle pour les vaccins anticancer. Les anticorps bispécifiques ont montré leur intérêt et de très nombreuses molécules sont en développement. Le succès des cellules CAR-T (*Chimeric antigen receptor T cell*) dans les cancers hématologiques n'est pas encore arrivé jusqu'aux cancers solides mais leur développement est aussi en cours. Et enfin, cibler les cytokines en combinaison avec les ICI pourrait permettre d'améliorer la réponse antitumorale tout en diminuant la toxicité associée aux ICI.

1.3.1. Immunothérapie néoadjuvante

Le succès, bien que partiel, des ICI pour traiter le mélanome avancé a motivé leur utilisation pour prévenir les rechutes chez les patients dont la tumeur est résécable. Cette stratégie adjuvante a démontré son efficacité et fait aujourd'hui partie des soins de routine¹⁸. Si bien que les ICI sont aujourd'hui envisagés en stratégie néoadjuvante chez les patients dont la tumeur est résécable afin de faciliter la chirurgie et d'améliorer la réponse des patients²⁸⁸.

En effet, dans un essai clinique comparant la combinaison ipilimumab + nivolumab avant (néoadjuvant) et après (adjuvant) chirurgie, les patients traités en néoadjuvant avaient une meilleure activation des cellules immunitaires circulantes après 6 semaines de traitement que les patients traités en adjuvant. Les clones de T CD8 retrouvés dans la tumeur réséquée avaient notamment un répertoire TCR plus diversifié et plus amplifié dans le sang circulant²⁸⁹. Cependant la toxicité associée est élevée et concerne la quasi-totalité des patients dans les deux cohortes, ce qui est cohérent avec ce qui est observé chez les patients atteints de mélanome avancé²⁴⁸. Dans un essai clinique comparant le pembrolizumab en néoadjuvant ou en adjuvant, les patients recevant le traitement néoadjuvant ont une survie sans rechute significativement plus longue que les patients recevant le traitement adjuvant, avec la même proportion de patients souffrant d'irAEs de grade 3 ou plus dans les deux cohortes (12% vs 14%)²⁹⁰. Bien qu'une méta-analyse semble indiquer, qu'en néoadjuvant, la combinaison anti-PD-1 + anti-

CTLA-4 serait plus efficace pour prévenir les rechutes que la monothérapie anti-PD-1²⁹¹, elle est associée à une toxicité très élevée.

L'administration d'anti-PD-1 en monothérapie avant la résection de la tumeur semble donc être une stratégie envisageable pour les patients atteints de mélanome résecable afin de diminuer le risque de rechute tout en limitant la toxicité.

1.3.2. Vaccins de nouvelle génération

La stratégie de vaccination visant à améliorer la réponse immunitaire n'est pas nouvelle mais les plateformes de vaccination classiques se sont avérées décevantes. Aujourd'hui, le séquençage à haut débit et les nouvelles plateformes de vaccins à ARNm permettent d'envisager des vaccins personnalisés en fonction des mutations propres à la tumeur de chaque patient. Une première étude de phase I, chez des patients atteints de cancer du pancréas résecable, rapporte qu'un vaccin personnalisé (autogène cevumérane) administré en adjuvant et en combinaison avec un anti-PD-L1 et une chimiothérapie (mFOLFIRINOX) permet d'amplifier les CD8 spécifiques des antigènes vaccinaux qui circulent dans le sang des patients²⁹². Les patients chez qui cette amplification est observée bénéficient d'une meilleure survie sans progression. Dans une autre étude de phase II, dont les résultats ont été présentés au congrès 2023 de l'AACR (*American Association for Cancer Research*), mais pas encore été publiés, le vaccin personnalisé « mRNA-4157 » en combinaison avec le pembrolizumab permettrait d'améliorer la survie sans rechute par rapport au pembrolizumab seul²⁹³. Ces résultats, bien que très préliminaires, montrent que les vaccins personnalisés sont capables d'élargir la réponse antitumorale et ont le potentiel d'améliorer la réponse des patients aux ICI. Les vaccins personnalisés actuellement en étude clinique sont répertoriés dans le Tableau 4.

1.1.1. Cellules CAR-T

Les cellules CAR-T (Chimeric antigen receptor T cell) sont des lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur spécifique d'un antigène tumoral. Les lymphocytes du patient sont prélevés puis modifiés et amplifiés avant qu'ils ne soient réinjectés au même patient. L'utilisation des cellules CAR-T a été une avancée majeure dans le traitement de certains cancers hématologiques réfractaires à tous les autres traitements. Cependant ces CAR-T ciblent soit CD19 soit BCMA, deux antigènes exprimés par les lymphocytes B ou les plasmocytes et donc par les cellules tumorales qui en dérivent^{294,295}. Le développement de

cellules CAR-T pour les cancers solides se heurte donc à l'absence d'antigène « public » c'est-à-dire commun à tous les patients ou au moins une partie. De plus, les CAR-T se montrent moins efficaces pour traiter les cancers solides que les cancers « liquides » dans les modèles précliniques²⁹⁶. Cependant, les stratégies d'immunopeptidomique pourraient permettre d'identifier des complexes CMH-peptide fortement présentés par les cellules cancéreuses des cancers solides mais pas par les cellules saines²⁹⁷.

| Vaccin | Fabricant | Plateforme vaccinale | Nombre de néoantigènes | Phase | Indication |
|-------------------------------|--|--|------------------------|-------|---|
| mRNA-4157 | Moderna/ Merck & Co. | ARNm modifié | Jusqu'à 34 | II | Mélanome (adjuvant) |
| Autogène cevumeran | BioNTech/ Genentech | ARNm non modifié | Jusqu'à 20 | II | Mélanome métastatique, cancer colorectal (adjuvant), cancer du pancréas (adjuvant) |
| GRANITE | Gritstone bio | Priming: adenvirus du chimpanzé Boost: ARN auto-amplifiant | Jusqu'à 20 | II | Cancer colorectal métastatique non traité |
| EVX-01 | Evaxion Biotech | Peptide | Jusqu'à 10 | II | Mélanome métastatique |
| EVX-02 | Evaxion Biotech | ADN | Jusqu'à 13 | I | Mélanome (adjuvant) |
| SW1115C3 | Stemirna Therapeutics | ARNm modifié | 10 à 30 | I | Cancers solides avancés |
| GNOS-PV02 | Geneos Therapeutics | ADN | Jusqu'à 40 | I | Cancer du foie métastatique |
| VB10.NEO | Nykode/ Genentech | ADN | Jusqu'à 40 | I | Cancers solides avancés |
| NOUS-PEV | Nouscom | Priming: adeno- virus du gorille Boost: vaccinia Ankara modifié | Jusqu'à 60 | I | Mélanome et cancer du poumon non à petites cellules métastatiques |
| TG4050 | Transgene | Vaccinia Ankara modifié | Jusqu'à 30 | I | Cancer tête et cou et cancer de l'ovaire (adjuvant) |
| YE-NEO-001 | ImmunityBio | Levure | Jusqu'à 24 | I | Cancers solides avancés (adjuvant) |
| iNeo-Vac-P01 | Hangzhou Neoantigen Therapeutics | Peptide | 5 à 20 | I | Cancer du pancréas et cancer de l'œsophage (adjuvant) |

Tableau 4: Vaccins anti-cancer personnalisés en développement clinique

Adapté de Dolgin et al.²⁹⁸

1.1.2. Anticorps multi-spécifiques

Les anticorps bispécifiques reconnaissent deux épitopes différents sur le même antigène ou sur deux antigènes différents. Ils ont d'abord été utilisés pour favoriser l'interaction entre un lymphocyte T et sa cible en ciblant CD3 et un antigène tumoral (BiTE pour « Bispecific T cell Engager »)²⁹⁹. Mais toutes les combinaisons sont possibles et on peut envisager d'inhiber

plusieurs points de contrôle immunitaire avec un seul anticorps ou de bloquer un récepteur inhibiteur tout en activant un récepteur de stimulation sur la même cellule. Ce développement technologique est en plein essor et une centaine d'anticorps bispécifiques sont aujourd'hui étudiés dans des essais cliniques. Des anticorps trispécifiques sont aussi déjà en développement et testés chez l'humain^{300,301}. Cette nouvelle technologie devrait permettre d'affiner les stratégies d'inhibition et d'activation des points de contrôle immunitaire afin d'améliorer l'efficacité et de diminuer la toxicité des ICI. Cependant, un développement rationnel est nécessaire afin d'identifier les combinaisons les plus intéressantes parmi les possibilités potentiellement infinies. Jusqu'à présent les anticorps bispécifiques ont été principalement générés par génie génétique ou par ingénierie des protéines mais l'utilisation de la chimie « click » pourrait permettre plus de possibilités et de souplesse dans la conception des futurs anticorps thérapeutiques³⁰².

1.1.3. Cibler les cytokines

Le rôle de l'inflammation dans le développement et la croissance du cancer n'est plus à démontrer³⁰³. En tant que médiatrices de l'inflammation, les cytokines sont des cibles intéressantes par ce qu'elles peuvent être facilement ciblées de façon systémique³⁰⁴. Ainsi l'efficacité des inhibiteurs de TNF, IL-6 (ou son récepteur), IL-1 β (ou son récepteur) et du TGF- β en combinaison avec les ICI est actuellement évaluée dans plusieurs essais cliniques³⁰⁴. Les cytokines inflammatoires que sont l'IL-6 et le TNF sont des cibles d'autant plus intéressantes puisqu'elles participent à la fois à la progression du cancer et au développement des effets indésirables associés aux ICI^{305,306}.

Le TNF est une cytokine majeure de l'inflammation. Cependant, en situation d'inflammation chronique, le TNF a des effets immunosuppresseurs qui favorisent la résolution de l'inflammation³⁰⁷. Il est aujourd'hui largement démontré que le TNF participe au développement du cancer et à sa progression, notamment en *via* ses effets immunosuppresseurs³⁰⁸⁻³¹⁰. Pour ces raisons (explicitées dans le chapitre III), le TNF est devenu une cible thérapeutique dans le but d'améliorer l'efficacité des ICI, ce qui fait l'objet de ce travail de thèse.

Chapitre III : Le TNF, une cytokine ambivalente

L'histoire du TNF et de l'immunothérapie du cancer ont débuté au même moment : dans les années 1890³¹¹. À cette époque, William Coley, un chirurgien New-Yorkais, remarqua qu'un patient guérit spontanément d'un sarcome que l'on croyait incurable. Ce patient avait contracté une infection nosocomiale puis le cancer avait régressé spontanément. Coley fit le lien entre ces deux événements apparemment indépendants. Il développa alors un traitement consistant en un cocktail de bactéries atténuées, visant à traiter des patients atteints de cancers réputés incurables³¹². Il est difficile de savoir aujourd'hui si ce traitement était vraiment efficace mais on peut le considérer comme la première immunothérapie du cancer. Avec l'apparition de la chimiothérapie, le traitement de Coley a été peu à peu oublié.

Il faudra attendre 1975 pour que Carswell *et al.* comprennent que les extraits de bactéries qu'utilisait Coley induisent la production d'une protéine soluble par les leucocytes. C'est cette protéine qui est responsable de la disparition des tumeurs par nécrose, ils la nomment donc « *Tumor necrosis factor* »³¹³. À cette époque le traitement du cancer par le TNF est très prometteur car il provoque une régression très spectaculaire des tumeurs chez la souris. Mais quand il est utilisé chez l'humain, le TNF s'avère trop toxique pour être administré comme traitement³¹⁴. Depuis 1975, il a été largement démontré que, paradoxalement, le TNF participe au développement du cancer et a un effet délétère sur la reconnaissance de la tumeur par le système immunitaire^{308,310}.

1. Biologie du TNF

Le TNF est une cytokine inflammatoire qui est impliquée dans la réponse précoce à toute lésion ou invasion d'un pathogène mais aussi dans les chocs septiques, l'inflammation chronique, les pathologies auto-immunes ainsi que le cancer. Les principales cellules productrices de TNF sont les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes T mais les mastocytes, les lymphocytes B et NK en produisent aussi^{307,315}. Le TNF est capable d'interagir avec deux récepteurs : le TNFR1 (*Tumor necrosis factor receptor 1*, CD120a) et le TNFR2 (*Tumor necrosis factor receptor 2*, CD120b). Ensemble, ils appartiennent à de grandes familles appelées respectivement « *TNF Superfamily* » (TNFSF) et « *TNF Receptor Superfamily* »

(TNFRSF) composées de nombreux ligands et récepteurs dont les structures sont proches et qui induisent des voies de signalisation complexes et qui se recoupent en partie³¹⁶.

L'interaction entre ces récepteurs régit des signaux de survie, de prolifération, de différenciation et de fonctions effectrices puisqu'ils induisent l'activation de NF- κ B mais ils peuvent aussi mener à plusieurs formes de mort cellulaire. À ce jour, on compte dix-neuf ligands dans la TNFSF et vingt-neuf récepteurs dans la TNFRSF chez l'humain, issus de duplications et de mutations au cours de l'évolution³¹⁷. Au sein de la TNFRSF figurent de nombreux points de contrôle immunitaire, soulignant l'importance de cette famille de protéine dans la fonction du système immunitaire. Parmi les membres de la TNFSF, un autre ligand se lie aux mêmes récepteurs que le TNF, il s'agit de la lymphotoxine alpha (LT α , anciennement connue sous le nom de TNF- β)³¹⁶.

1.1. Structure

Le TNF est codé par le gène *TNF* (*Tnf* chez la souris) qui se trouve sur le chromosome 6 humain et le chromosome 17 murin. Chez l'humain, le TNF, la LT α et la lymphotoxine beta (LT β) se situent dans les régions codant pour le CMH sur le chromosome 6. Les autres membres de la TNFSF se situent à proximité des régions paralogues du CMH sur les chromosomes 1, 9 et 19. Ces duplications et sélections conjointes au cours de l'évolution pourraient expliquer le rôle majeur de la TNFSF dans le système immunitaire³¹⁶. Le TNF est une protéine homotrimérique et transmembranaire de type II (Fig. 24). Son domaine THD (*TNF homology domain*) est responsable de sa trimérisation et lui permet d'interagir avec les domaines riches en cystéine sur la partie N-terminale des TNFR. Bien que le TNF soit biologiquement actif sous sa forme transmembranaire (tmTNF), il peut aussi être sécrété quand il est clivé par l'enzyme de conversion du TNF (*TNF alpha converting enzyme*, TACE)³¹⁸. La forme soluble du TNF (sTNF) est elle aussi active. La masse moléculaire d'un monomère de TNF est de 26kDa pour la forme membranaire et 17 kDa pour la forme soluble. Les TNFR sont quant à eux des protéines transmembranaires de type I de structure similaire. Cependant, le TNFR1 possède un domaine de mort dans sa partie cytoplasmique contrairement au TNFR2^{315,316,319}.

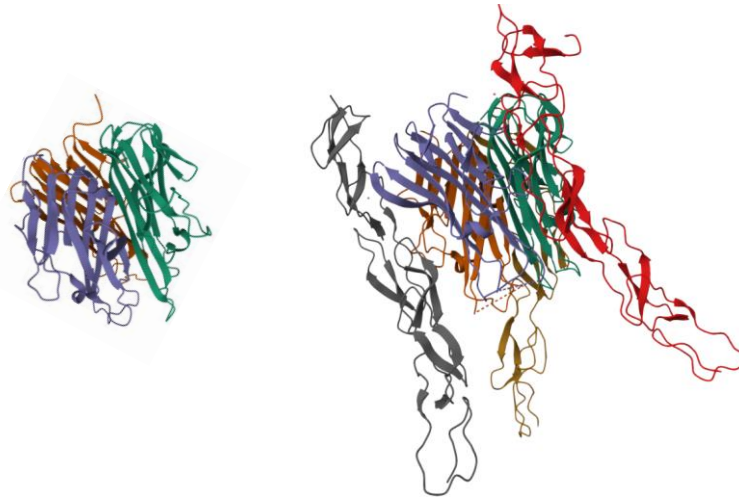


Figure 24: Structure du TNF et du complexe TNF / TNFR2

Structure du TNF humain (Gauche ; PDB : 1TNF) et du complexe qu'il forme avec le TNFR2 humain (Droite ; PDB : 3ALQ) évaluées par cristallographie à rayon X. Chaque couleur correspond à un monomère. Source : [RCSB Protein Data Bank \(www.rcsb.org\)](http://www.rcsb.org)

1.2. Signalisation

Les formes transmembranaire et soluble du TNF sont toutes les deux actives et elles interagissent avec leurs deux récepteurs qui sont le TNFR1 et le TNFR2, cependant le TNFR2 est préférentiellement activé par le tmTNF³²⁰. Les deux récepteurs diffèrent aussi par leur expression : la plupart des types cellulaires expriment le TNFR1 tandis que seuls les lymphocytes T, les cellules myéloïdes, les cellules endothéliales et certaines cellules du système nerveux central expriment le TNFR2³¹⁶. Il existe une homologie partielle du TNF et ses récepteurs entre la souris et l'humain. En conséquence, le TNF humain se lie au TNFR1 murin mais pas au TNFR2³⁰⁸.

1.2.1. TNFR1

Le TNFR1 a une masse moléculaire de 55 kDa et peut être activé aussi bien par la forme soluble que par la forme membranaire du TNF. À l'état basal, le TNFR1 est retrouvé dans la membrane sous forme monomérique et la protéine SODD (*Silencer of death domain*) masque son domaine de mort afin d'empêcher une signalisation constitutive³²¹. La liaison de son ligand sur le TNFR1 entraîne la trimérisation de ce dernier et le détachement de SODD, ce qui permet aux protéines partenaires de se lier au domaine de mort. En fonction de l'état d'ubiquitinylation des protéines recrutées en aval du TNFR1 ainsi que l'activité des caspases, celui-ci peut induire

des voies de signalisation différentes. La formation du complexe I induit l'expression de gènes inflammatoires favorisant la survie et la prolifération tandis que les complexes de type II (a, b et c) induisent une signalisation amenant à la mort cellulaire par apoptose (complexes IIa et IIb) ou par nécroptose (complexe IIc) (Fig. 25).

1.2.1.1. Complexe I et voie canonique de NF- κ B

La liaison du TNF au TNFR1 induit le recrutement de TRADD (*TNFR1-associated death domain*), une protéine adaptatrice contenant un domaine de mort. TRADD permet le recrutement de TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*), TRAF5 et RIPK1 (*Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*). Elles-mêmes vont induire le recrutement des protéines cIAP (*Cellular inhibitor of apoptosis protein*) 1 et 2. Une fois réunies, toutes ces protéines constituent le complexe I.

Les cIAP1/2 sont des enzymes ubiquitine ligases E3 qui ubiquitinylent les résidus lysines de RIPK1. L'assemblage d'une chaîne d'ubiquitine liée en lysine 63 sur RIPK1 forme une armature permettant le recrutement du complexe LUBAC (*Linear ubiquitin chain complex*). Ce dernier est lui-même constitué de HOIL-1L (*Heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase 1*), HOIP (*HOIL-1-interacting protein*) et de SHARPIN (*SHANK-associated RH domain-interacting protein*). LUBAC attache des chaînes d'ubiquitine liées en méthionine 1 à RIPK1, ce qui forme un réseau complexe de chaînes d'ubiquitine qui stabilise le complexe I et permet le recrutement d'autres partenaires. Parmi eux, figurent les kinases TAB2 (*TGF- β -activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 2*), TAB3 et TAK1 (*TGF- β -activated kinase 1*). L'assemblage de ces trois protéines permet l'activation de TAK1.

En parallèle, l'ubiquitinylation de RIPK1 permet le recrutement du complexe IKK (*I κ B kinase*) constitué des sous-unités IKK α , IKK β et NEMO (*NF- κ B essential modulator*) grâce au domaine de liaison à l'ubiquitine de NEMO. Ces événements permettent à TAK1 d'activer le complexe IKK en phosphorylant IKK β qui va lui-même phosphoryler I κ B (*Inhibitor of NF- κ B*). La forme phosphorylée de I κ B est reconnue par β -TrCP (*Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase*) qui est une protéine à boîte F appartenant au complexe SCF $^{\beta$ -TrCP. L'ubiquitinylation de I κ B phosphorylé par SCF $^{\beta$ -TrCP aboutit finalement à sa dégradation protéasomale³²². Libéré de I κ B, le NF- κ B (*Nuclear factor-kappa B*) cytosolique (constitué de p50 et p65, aussi connu sous le nom de RelA) peut transloquer dans le noyau et

activer la transcription d'une grande variété de gènes cibles pro-inflammatoires. C'est la voie canonique de la signalisation NF- κ B.

Indépendamment de la voie NF- κ B, TAK1 engage les MAPKK (*Mitogen-activated protein kinase kinases*) pour activer les voies de signalisation JNK (*JUN NH₂-terminal kinase*) et p38 qui aboutissent à l'activation du facteur de transcription AP-1 (*Activator protein 1*). La signalisation induite par le complexe induit donc l'expression de gènes cibles de NF- κ B et AP-1 qui favorisent l'inflammation, la survie et la prolifération^{315,316,319}.

1.2.1.2. Complexe II et mort cellulaire

L'ubiquitinylation de RIPK1 est nécessaire à la formation du complexe I au niveau de la membrane plasmique et le stabilise. Si RIPK1 est dé-ubiquitinylé ou s'il n'est pas ubiquitinylé quand il est recruté au niveau du TNFR1, le complexe est déstabilisé et se détache de la membrane, menant ainsi à la formation d'un complexe II cytosolique³²³.

Complexe IIa : Les chaînes d'ubiquitine associées à RIPK1 peuvent être éliminées par des déubiquitinases comme la CYLD (*CYLD lysine 63 deubiquitinase*). Le complexe I est alors déstabilisé et RIPK1 se détache de la membrane en emportant avec lui TRADD. S'ensuit le recrutement de FADD (*Fas-associated death domain*), de la procaspase 8 et de FLIP_L (*FLICE-like inhibitory protein*) qui complète la formation du complexe IIa dans le cytosol, ce qui permet l'activation de la caspase 8 et mène à l'apoptose.

Complexe IIb : Quand cIAP1/2 sont absents ou dégradés par auto-ubiquitinylation en réponse à la protéine SMAC (*Second mitochondria-derived activator caspase*), RIPK1 est faiblement ou pas ubiquitinylé lorsqu'il est recruté au niveau du TNFR1. Dans ce cas, RIPK1 se désolidarise du complexe I sans emporter TRADD. Le complexe IIb se forme alors dans le cytosol par le recrutement de FADD, de la procaspase 8 et de FLIP_L. La formation du complexe IIb active la caspase 8, ce qui mène à l'apoptose.

Complexe IIc : Quand ils sont activés, la caspase 8 et l'hétérodimère procaspase 8 / FLIP_L sont capables de cliver et donc d'inactiver RIPK1 et RIPK3. Cette inactivation est nécessaire à la mise en route du processus d'apoptose. Si RIPK1 n'est pas ubiquitinylé et que lui-même et RIPK3 ne sont pas inactivés, le complexe IIc se forme dans le cytosol. Dans ce cas, RIPK1 s'associe à RIPK3 et tous deux s'autophosphorylent pour former une structure de

type amyloïde appelée nécrosome. Le nécrosome phosphoryle la protéine MLKL (*Mixed lineage kinase domain-like*) qui s'oligomérisse et transloque vers la membrane plasmique, qu'elle déstabilise en s'associant avec les phosphatidylinositides. La rupture de la membrane entraîne un influx d'ions positifs tels que Ca^{2+} , Na^+ et K^+ , ce qui déclenche la nécroptose. Ce type de mort cellulaire nécessite donc que RIPK1 ne soit pas ubiquitinylé, que la caspase 8 soit inactive et que l'activité kinase de RIPK1 et RIPK3 soit fonctionnelle^{315,316,319}.

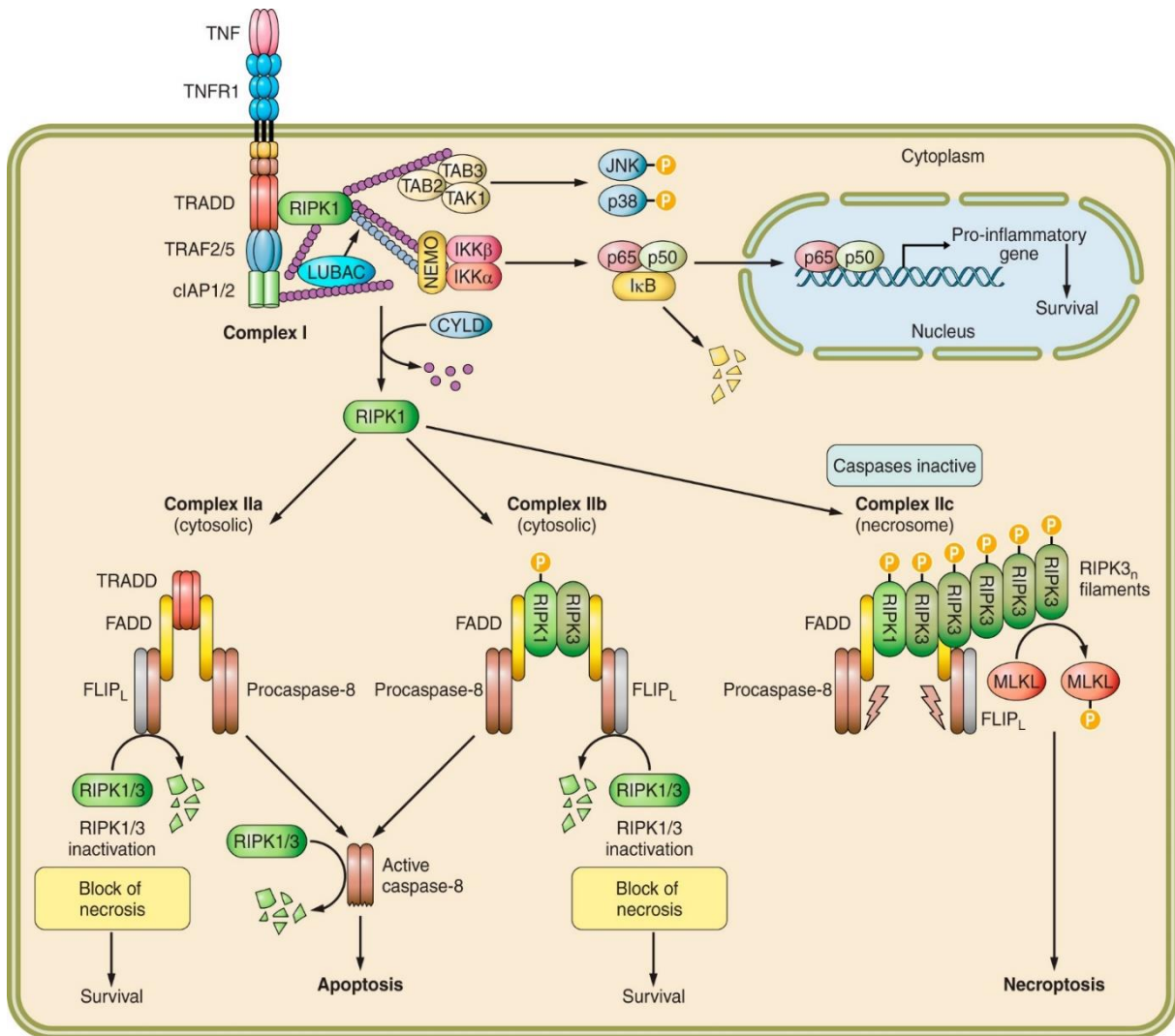


Figure 25: Signalisation en aval du TNFR1

En fonction de l'état d'ubiquitinylation de RIPK1 et de l'activité des caspases, l'activation du TNFR1 par le TNF conduit à la formation d'un complexe I membranaire qui mène à la signalisation canonique de NF-κB ou à la formation d'un complexe II cytosolique qui mène à la mort cellulaire par apoptose (complexes IIa et IIb) ou par nécroptose (complexe IIc). Les chaînes d'ubiquitine liées en lysine 63 sont représentées en violet tandis que celles liées en méthionine 1 sont représentées en bleu. Extrait de Dostert *et al.*³¹⁶

1.2.2. TNFR2

Le TNFR2 a une masse moléculaire de 75 kDa et est capable d'induire la voie canonique de NF- κ B comme le TNFR1, mais il peut aussi activer la voie non-canonique décrite ci-après. La voie canonique est rapide, transitoire et majoritairement médiée par le TNFR1 tandis que la voie non canonique, induite par le TNFR2 (mais aussi d'autres TNFRSF), est plus lente et continue : elle intervient classiquement après la voie canonique. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le TNF transmembranaire est plus efficace pour induire la signalisation du TNFR2 que le TNF soluble³²⁰. Contrairement au TNFR1, le TNFR2 ne possède pas de domaine de mort. La liaison du TNF entraîne directement le recrutement de TRAF2 et TRAF3 associés à cIAP1/2. Les chaînes d'ubiquitine générées par cIAP1/2 permettent de recruter LUBAC qui recrutera à son tour le complexe IKK, ce qui aboutira à l'activation de la voie canonique de NF- κ B de manière similaire à la signalisation TNFR1 (Fig. 25).

A l'état basal, le complexe constitué par TRAF2, TRAF 3 et cIAP1/2 ubiquitinylyse NIK (*NF- κ B inducing kinase*) dans le cytosol, ce qui mène à sa dégradation protéasomale. Quand le TNFR2 est activé, TRAF2, TRAF3 et cIAP1/2 sont recrutés au niveau de la membrane et NIK s'accumule dans le cytosol. Il est alors libre de phosphoryler et ainsi d'activer IKK α qui pourra phosphoryler à son tour p100 ce qui entraîne sa polyubiquitinylation. Sa prise en charge par le protéasome aboutit finalement au clivage de p100 en p52. NF- κ B formé par l'hétérodimère RelB/p52 pourra alors transloquer dans le noyau et activer l'expression des gènes cibles^{316,319}. C'est la voie non canonique de la signalisation NF- κ B (Fig. 26).

Contrairement au TNFR1 dont l'expression est ubiquitaire, le TNFR2 est exprimé par un nombre restreint de types cellulaires parmi lesquels figurent les lymphocytes T, les cellules myéloïdes et les cellules endothéliales. Une interaction entre les signalisations en aval du TNFR1 et du TNFR2 est donc présente dans ces cellules. Cette interaction peut aboutir à une mort cellulaire induite par le TNFR2³⁰⁷. En effet, suite à l'engagement du TNFR2, TRAF2 peut être dégradé par le protéasome suite à son ubiquitinylation par cIAP1/2³¹⁹. Dans ce cas, TRAF2 fait défaut aux signalisations du TNFR1 et du TNFR2, ce qui favorise la formation d'un complexe II en réponse à la stimulation par le TNF. De même, cIAP1/2 ne peuvent pas être recrutés au niveau du TNFR1, ce qui accentue ce phénomène³¹⁶. Le recrutement de TRAF2 par le TNFR2 titre aussi la quantité de TRAF2 disponible dans le cytosol, ce qui interfère dans la

signalisation médiée par le TNFR1 et favorise la formation d'un complexe II pro-apoptotique au détriment du complexe I anti-apoptotique³²⁴.

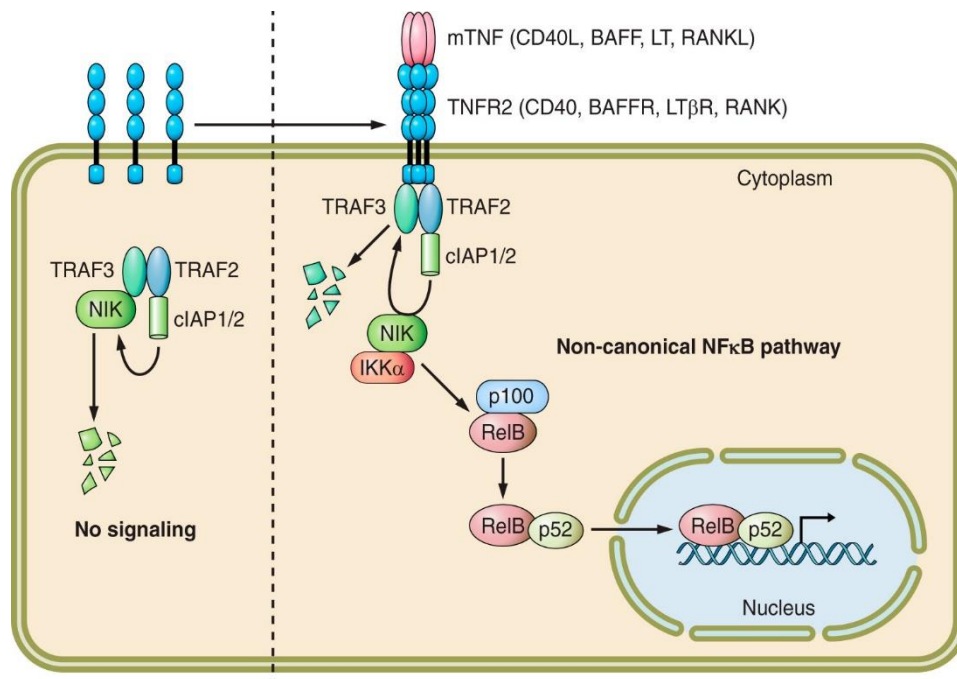


Figure 26: Voie non canonique de NF-κB en aval du TNFR2

À l'état basal, NIK est dégradé dans le cytosol. Quand le TNFR2 est activé, NIK s'accumule dans le cytosol et permet l'activation de la voie non canonique de NF-κB. La même signalisation peut être induite par d'autres TNFRSF tels que CD40, BAFFR, LTβR, RANK et leur ligand respectif. Extrait de Dostert *et al.*³¹⁶

1.2.3. Signalisation inversée : « reverse signaling »

La signalisation inverse (ou « *reverse signaling* ») intervient lorsque le TNF membranaire agit comme un récepteur et transduit un signal vers l'intérieur de la cellule en réponse à la liaison du TNFR1 ou du TNFR2 qui agissent comme un ligand dans cette situation. Cette signalisation inverse conduit à l'activation de la voie canonique de NF-κB ou l'activation des voies de signalisation MAPK/ERK dans la cellule exprimant le tmTNF par des mécanismes encore peu connus^{319,325,326}.

1.2.4. La lymphotoxine

En dehors du TNF, la lymphotoxine est le seul membre de la TNFSF à être capable de se lier au TNFR1 et au TNFR2³¹⁶. Initialement connue sous le nom de « lymphocyte cytotoxic factor »³²⁷ la lymphotoxine est décrite comme un facteur soluble (identifié dans des surnageants contenant aussi probablement du TNF et d'autres protéines cytotoxiques) sécrété par les

lymphocytes activés et dont l'activité induit la mort de la cellule cible³²⁸. La lymphotoxine sera ensuite isolée peu après le TNF^{329,330}.

La lymphotoxine est classiquement exprimée sous la forme d'une cytokine soluble homotrimérique composée de trois molécules de lymphotoxine alpha (LT α). Elle est sécrétée par les lymphocytes T activés, les lymphocytes B au repos, les cellules myéloïdes et certaines cellules non-hématopoïétiques³¹⁶. Une autre isoforme de la lymphotoxine est composé d'un homotrimère de LT β qui est exclusivement exprimé de façon membranaire par les lymphocytes B naïfs spléniques, les CD4 et les DC. Ces cellules peuvent aussi produire des hétérotrimères membranaires composés d'une sous-unité α et de deux sous-unités β (LT α 1 β 2) ou inversement (LT α 2 β 1). Ces différents isoformes ne se lient pas sur les mêmes récepteurs : comme le TNF, la LT α se lie au TNFR1 et au TNFR2 tandis que la LT β se lie exclusivement au LT β R (*Lymphoxin beta receptor*). La LT α 1 β 2 se lie au LT β R avec une grande affinité, tandis que la LT α 2 β 1 active le TNFR1 et le TNFR2 (Fig. 27).

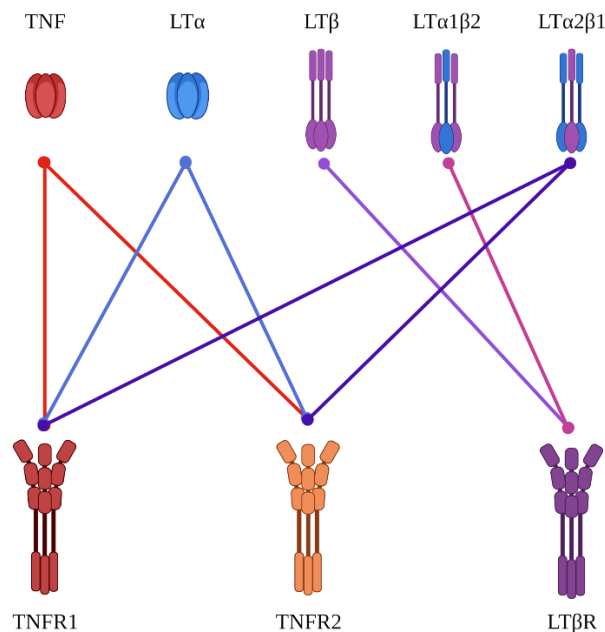


Figure 27: Récepteurs activés par le TNF et la lymphotoxine

Le TNF (soluble ou membranaire) et la LT α (soluble) se lient au TNFR1 et au TNFR2. La LT β (membranaire) se lie exclusivement au LT β R. La LT α 1 β 2 (membranaire) se lie au LT β R avec une grande affinité. La LT α 2 β 1 (membranaire) se lie au TNFR1 et au TNFR2. Réalisé avec Biorender.

Le LT β R est exprimé par les fibroblastes, les cellules épithéliales (dont les cellules endothéliales), les monocytes et les mastocystes³¹⁶. Quand il est activé, il peut induire la voie canonique de la signalisation NF- κ B mais aussi la voie non canonique en recrutant TRAF2,

TRAF3 et TRAF5 (Fig. 25 et 26). Son expression est nécessaire à l'organogénèse lymphoïde durant le développement mais aussi chez l'adulte pour le maintien des organes lymphoïdes secondaires tels que le GALT (Gut-associated lymphoid tissue), les ganglions lymphatiques, les plaques de Peyer et la formation de centres germinatifs. Il est par exemple nécessaire à la ségrégation des lymphocytes T et des lymphocytes B dans leur zone respective au sein des organes lymphoïdes³¹⁶.

Le rôle du LT β R dans la différenciation des HEV est bien décrit¹⁷⁰ mais il connaît un regain d'intérêt récent dans le contexte du cancer. En effet, la présence de HEV à l'intérieur des tumeurs est associée à une réponse favorable aux immunothérapies. Les HEV intra-tumoraux sont une voie d'entrée majeure des lymphocytes pour infiltrer la tumeur en réponse aux immunothérapies³³¹. La signalisation du LT β R est impliquée dans la différenciation des HEV intra-tumoraux et ceux-ci favorisent l'infiltration des CD8 progéniteurs PD1⁺TCF1⁺ qui prolifèrent et se différencient en CD8 effecteurs PD1⁺GzmB⁺³³². Le LT β R pourrait donc être une cible thérapeutique visant à induire des HEV dans les tumeurs peu infiltrées afin d'améliorer l'efficacité des immunothérapies.

1.3. Physiopathologie

Le TNF est une cytokine majeure de l'inflammation et il est nécessaire à la bonne mise en place de la réponse immunitaire précoce. Il est notamment impliqué dans le recrutement massif des monocytes et des neutrophiles sur un site inflammatoire³³³⁻³³⁵ et dans l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1 et ELAM-1 (sélectine E) à la surface des cellules endothéliales qui permettent l'extravasation des leucocytes³³⁶. En activant la voie canonique de la signalisation NF- κ B, le TNF active sa propre expression ainsi que celle de plusieurs autres cytokines inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-1 β ³¹⁵. Il est aussi impliqué dans la maturation des cellules dendritiques^{337,338} et la stimulation des lymphocytes T^{339,340}, ainsi que la cytotoxicité des lymphocytes CD8³⁴¹ et NK³⁴². Le TNF a aussi d'importants rôles homéostatiques dans l'organisation des organes lymphoïdes et la réparation tissulaire. Les souris déficientes pour le TNF ont un développement normal mais sont très vulnérables aux infections. Elles ne développent pas de réaction d'hypersensibilité de contact et sont aussi résistantes au choc septique. La délétion du TNF n'a pas d'effet sur la commutation de classe des immunoglobulines mais elle entrave le développement des follicules primaires et des réseaux de cellules dendritiques folliculaires. Ces souris ne sont donc pas capables de

développer de centre germinatif³⁴³. Enfin, le TNF a une importance majeure dans les mécanismes d'immunosuppression que sont la tolérance et la résolution de l'inflammation en agissant sur les cellules myéloïdes et sur les lymphocytes T.

1.3.1. TNF et macrophages

Les macrophages font partie des principales cellules productrices de TNF mais ils répondent aussi à son action. Le TNF induit une réponse rapide et transitoire des macrophages *via* les voies de signalisation dépendantes de NF- κ B et des MAPK qui induisent l'expression de gènes codant pour des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8³¹⁵. Cette réponse initiale a une durée d'environ 24h et est suivie par un état de désensibilisation appelé « *cross-tolerance* »³⁰⁷. Les macrophages désensibilisés ne répondent plus à la stimulation par le LPS qui est un puissant activateur de la réponse inflammatoire médiée par les TLR. En effet, 24h après la stimulation par le TNF, les macrophages activent GSK3 (« *glycogen synthase kinase 3* ») et TNFAIP3 (« *TNF-induced protein 3* »), ce qui inhibe NF- κ B³⁴⁴. Ces macrophages désensibilisés ont une moindre capacité à produire de l'IL-12 et de l'IL-23 en réponse à une re-stimulation par LPS et IFN- γ ³⁴⁵. Cette désensibilisation peut être modulée de façon épigénétique, notamment par les interférons de type I qui préservent la réponse interféron antivirale et baissent le seuil de réponse aux signaux pro-inflammatoires en modulant l'accessibilité de la chromatine^{346,347}. La désensibilisation des macrophages par le TNF a probablement pour rôle biologique d'éviter un emballement de la réponse inflammatoire et de favoriser la résolution de l'inflammation^{307,348}.

1.3.2. TNF et cellules myéloïdes suppressives

La signalisation *via* le tmTNF et le TNFR2 joue un rôle majeur dans la fonction immunosuppressive des MDSC. Cette signalisation provoque la phosphorylation de p38 et l'activation de NF- κ B, ce qui active l'expression de l'arginase-1 et de iNOS, et augmente donc la production de NO et de ROS par les MDSC mais aussi d'IL-10 et de TGF- β , ce qui inhibe la prolifération des lymphocytes³⁴⁹ et la production d'IFN- γ par les CD4³⁵⁰. L'expression ectopique d'un tmTNF non clivable dans des cellules tumorales mammaires 4T1 favorise la croissance tumorale en stimulant l'angiogenèse et l'accumulation de T_{reg} et de MDSC dans la tumeur, ce qui s'accompagne d'une augmentation de production de NO, d'IL-10 et de TGF- β et d'une diminution de l'infiltration des lymphocytes. Au contraire, l'expression d'un sTNF qui

ne s'exprime pas à la membrane, dans le même modèle 4T1, diminue l'accumulation de MDSC dans la tumeur et favorise l'infiltration par les lymphocytes³⁴⁹. Cette dernière observation souligne le rôle dual du TNF, avec un effet opposé de la forme soluble et membranaire du TNF, via une modulation potentiellement différente de la signalisation des deux types de récepteurs selon la nature des ligands. Dans un modèle de fibrosarcome chez la souris, le TNF est responsable de l'accumulation et de la survie des MDSC CD11b⁺Gr1⁺ dans la tumeur mais aussi en périphérie, ce qui favorise la croissance tumorale. Dans ce modèle, la signalisation TNFR2 induit l'expression de c-FLIP qui inhibe à son tour la caspase-8, ce qui favorise la survie des MDSC. Cet effet est annulé par l'administration d'un anticorps anti-TNF qui permet aux souris de contrôler la tumeur³⁵¹. Dans un contexte d'inflammation chronique, le TNF freine la différenciation cellules myéloïdes immatures en stimulant l'expression de S100A8 et S100A9 et de leur récepteur RAGE. Il augmente leurs capacités immunosuppressives sur les lymphocytes T et NK qui deviennent dysfonctionnels en diminuant leur expression de la chaîne ζ . Ces effets sont bloqués par l'administration d'etanercept qui réduit les capacités immunosuppressives des MDSC et favorise leur différenciation en cellules dendritiques et macrophages³⁵². Dans les cellules myéloïdes CD11b⁺, la signalisation autocrine du TNF *via* le TNFR1 favorise l'immunosuppression et l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T³⁵³. L'expression du TNFR1 est aussi nécessaire à leur recrutement sur le site inflammatoire dans un modèle d'uvéorétinite auto-immune expérimentale³⁵³. Le TNF provoque aussi le recrutement des MDSC dans la tumeur de façon indirecte. En effet, le TNF produit par les lymphocytes et les macrophages induit la sécrétion d'IL-8 par les cellules tumorales³⁵⁴ ce qui attire les MDSC et favorise la nétose des neutrophiles³⁵⁵.

1.3.3. TNF et lymphocytes T régulateurs

Le TNF est considéré comme une cytokine majeure dans la biologie des T_{reg}: il est impliqué dans leur expansion, leur fonction immunosuppressive et leur différenciation³⁰⁷. Les effets du TNF sur les T_{reg} sont probablement imputables au TNFR2 puisque le TNFR1 n'est pas détecté à la surface des T_{reg}³⁵⁶. Les T_{reg} étant les garants de la tolérance immunitaire et le TNF la cible privilégiée pour traiter les maladies auto-immunes, leurs relations ont principalement été étudiées dans un contexte d'auto-immunité.

La signalisation TNF/TNFR2 est impliquée dans l'expansion des T_{reg} chez la souris et l'humain^{356,357} en induisant la signalisation NF- κ B canonique^{358,359}. L'expansion correspond à

la résultante de la prolifération, de la survie et de la stabilité phénotypique, processus qui sont difficilement dissociables les uns des autres d'un point de vue expérimental. Certaines études ont cependant montré précisément ces mécanismes et il en ressort que le TNF agit sur les trois processus en augmentant la prolifération des T_{reg} ³⁶⁰, leur survie³⁵⁸ et leur stabilité en maintenant l'expression de FoxP3^{361,362}.

L'effet du TNF sur les capacités immunosuppressives des T_{reg} est débattu. Certaines études *in vitro* montrent que le TNF diminue directement les capacités immunosuppressives des T_{reg} sur des cellules effectrices^{359,363,364} quand d'autres indiquent que le TNF n'a pas d'effet voire qu'il exacerbe l'immunosuppression médiée par les T_{reg} ^{356,365,366}. Ces études *in vitro* évaluent les capacités immunosuppressives des T_{reg} sur l'activation de cellules effectrices (lymphocytes T CD4) en mesurant la prolifération de ces dernières ou leur production de cytokines. Dans ces conditions expérimentales, la pureté de la population de T_{reg} ainsi que les conditions de prétraitement des T_{reg} avec le TNF sont cruciaux³⁰⁷. En effet, des cellules effectrices contaminantes parmi les T_{reg} prétraités au TNF ou la présence de TNF dans la coculture ont vraisemblablement un effet sur l'activation mesurée des cellules effectrices. De même, nous avons vu que le TNF favorise la prolifération des T_{reg} . Des T_{reg} prétraités au TNF peuvent donc potentiellement entrer en prolifération et s'expandre pendant la durée de la coculture et donc avoir un pouvoir immunosuppresseur apparent plus important en biaisant la proportion de cellules en leur faveur. De telles conditions expérimentales ne permettent donc pas de généraliser l'effet observé du TNF sur les capacités immunosuppressives des T_{reg} en conditions réelles. En effet le système de coculture simple ne fait intervenir que certains mécanismes qu'utilisent les T_{reg} pour réprimer une réponse inflammatoire. *In vivo*, le TNF pourrait avoir des effets sur d'autres leviers d'immunosuppression indirects tels que l'expression des ectonucléotidases CD39 et CD73 par exemple¹¹⁵. Toujours est-il que le TNF favorise l'expression de CD25³⁵⁶, récepteur à haute affinité pour l'IL-2 qui est un mécanisme majeur d'immunosuppression des T_{reg} en privant l'environnement local en IL-2¹⁴³. Le TNF stabilise aussi l'expression de FoxP3³⁵⁸ et l'expression de TNFR2 par les T_{reg} est associée à un pouvoir immunosuppresseur plus important³⁶⁷, autant d'arguments en faveur du TNF favorisant l'immunosuppression par les T_{reg} .

Le TNF n'est pas nécessaire à la différenciation de T_{reg} naturels dans le thymus puisque les souris déficientes pour le TNF ou ses récepteurs sont viables, contrairement aux souris déficientes pour *Foxp3* qui survivent moins de 30 jours³⁶⁸. Cependant le TNFR2 participe avec

GITR et OX40 à la différenciation des T_{reg} dans le thymus puisque l'inhibition ou la délétion simultanées de ces trois membres de la TNFRSF mènent à une absence complète de T_{reg} ³⁶⁹. Au contraire, l'inhibition du TNF semble favoriser la différenciation des T_{reg} en périphérie. Dans un modèle d'encéphalomyélite chez la souris, l'inhibition du TNF induit l'expansion des T_{reg} périphériques et une amélioration de l'état clinique sans impacter les T_{reg} naturels³⁷⁰. De même, chez l'humain, l'inhibition du TNF par l'infliximab induit l'expansion d'une population de T_{reg} périphériques (CD62L⁻) chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde *ex vivo*, mais pas chez les donneurs sains. Les T_{reg} naturels (CD62L⁺) ne semblent pas être affectés chez les patients traités par infliximab. Chez ces mêmes patients, les T_{reg} périphériques induits par l'inhibition du TNF ont des capacités immunosuppressives plus importantes que les T_{reg} naturels³⁷¹. Cependant les auteurs n'ont étudié que l'effet de l'inhibition du TNF et il aurait été intéressant de voir l'effet que pourrait directement avoir le TNF sur l'expansion de ces populations de T_{reg} .

On voit bien que l'effet du TNF sur les T_{reg} est plus complexe qu'il n'en a l'air au premier abord et les limitations expérimentales ne facilitent pas l'interprétation de toutes ces études. Un consensus se dégage sur l'expansion des T_{reg} en réponse à la signalisation TNF/TNFR2 mais il est beaucoup plus complexe de trancher sur l'impact du TNF sur les capacités immunosuppressives et la différenciation des T_{reg} . De même, une grande partie de ces travaux ont été menés dans un contexte de maladie auto-immune où les T_{reg} ne sont pas capables de maintenir la tolérance et de contenir l'inflammation chronique, situation opposée à celle qui nous intéresse où les T_{reg} participent activement à l'immunosuppression du microenvironnement tumoral. Il est donc difficile d'extrapoler l'effet du TNF ou de son inhibition dans le contexte du cancer à partir de ces travaux.

1.3.4. TNF, dysfonction des lymphocytes T et AICD

Quand il est produit de façon aigüe, le TNF active les lymphocytes T. Cependant en cas d'inflammation et de production chronique de TNF, il peut avoir des effets immunosuppresseurs en atténuant la signalisation en aval du TCR et en provoquant la mort induite par l'activation (AICD : « *activation-induced cell death* ») de lymphocytes T.

Dans un modèle infectieux chez la souris, l'injection chronique de TNF un jour sur deux pendant trois semaines atténue la signalisation du TCR³⁷². Un tel traitement amoindrit la

prolifération et la sécrétion de cytokines en entravant la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire en réponse à une stimulation antigénique spécifique. La signalisation TNFR1 est suffisante pour induire cet effet chez la souris³⁷². Au contraire, chez l'humain, on retrouve ces effets en aval du TNFR2 mais pas du TNFR1³⁷³. Le TNF participe ainsi à la dysfonction des CD4 *via* NF- κ B en diminuant l'expression de l'IL-2, l'IL-21, l'INF- γ et de CD40L et en augmentant l'expression de PD-1 dans un contexte d'infection chronique par le VIH chez l'humain et dans des modèles murins³⁷⁴. Par contre, le TNF ne semble pas impliqué dans l'épuisement des CD8³⁷⁴.

Au contraire, le TNF est impliqué de façon majeure dans l'AICD des CD8 *via* le TNFR2 chez la souris^{324,375}, les CD4 étant plus sensibles à l'interaction entre Fas et son ligand³⁷⁵. Une autre étude chez la souris montre que les anticorps bloquant le TNFR1 réduisent l'apoptose des lymphocytes et induisent leur prolifération de façon indépendante à FasL³⁷⁶. Chez l'humain, une étude confirme que le TNF est impliqué dans l'AICD des CD8 en induisant la production de ROS par hyperpolarisation des mitochondries *via* le TNFR2. Ceci mène à des dommages à l'ADN et l'activation de la Caspase 3³⁷⁷. La mort induite par la signalisation TNFR2 pourrait être due à une interaction entre les signalisations en aval du TNFR1 et du TNFR2^{307,324}, comme vu au chapitre III§1.2.2.

1.4. Inhiber le TNF pour traiter l'auto-immunité

Dans les années 80, le TNF est détecté dans les articulations de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde³⁰⁷. Quelques années plus tard, la surexpression du *Tnf* chez la souris met en évidence son rôle causal dans l'apparition de l'arthrite auto-immune³⁷⁸. Les modèles de maladie inflammatoire chronique de l'intestin ont aussi révélé le rôle du TNF dans le déclenchement de la maladie³⁷⁹. Chez la souris, la déficience pour le TNFR1 protège généralement contre les symptômes de maladies inflammatoires et auto-immunes expérimentales tandis que ces symptômes sont aggravés chez les souris déficientes pour le TNFR2³⁰⁷. La signalisation TNFR1 semble donc avoir un effet pro inflammatoire tandis que le TNFR2 semble induire l'immunosuppression dans ces modèles d'inflammation chronique. Depuis ces découvertes, le développement de médicaments visant à inhiber le TNF a largement amélioré la prise en charge des maladies inflammatoires et auto-immunes que sont la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique, l'arthrite chronique juvénile, le rhumatisme psoriasique, le psoriasis en plaques et la spondylarthrite ankylosante. Cinq médicaments « *first-in-class* » sont disponibles (Tableau 5) ainsi que de nombreux

génériques. Leurs mécanismes d'actions ne sont que peu connus et leur indication est essentiellement basée sur l'augmentation des concentrations de TNF observées chez les patients atteints de maladie auto-immunes et dans les modèles murins. Néanmoins, ils sont très efficaces pour traiter ces pathologies.

De manière générale, les maladies auto-immunes sont causées par une inflammation chronique dans le tissu affecté. Le TNF en particulier mais aussi l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-17 favorisent l'accumulation de macrophages et de lymphocytes Th1 et Th17 ainsi que de lymphocytes B et de DC. Le TNF active aussi les cellules locales et en réponse, les fibroblastes sécrètent des cathepsines et des métalloprotéases matricielles ainsi que du collagène, ce qui entraîne la destruction du tissu et la fibrose. Les kératinocytes prolifèrent et amplifient le recrutement de cellules inflammatoires qui aggraveront les symptômes³⁸⁰.

Paradoxalement, les gardiens de la tolérance immunitaire que sont les T_{reg} s'accumulent dans le sang et les articulations de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Les études visant à évaluer leurs capacités immunosuppressives donnent des résultats contradictoires et soulignent surtout l'inter-variabilité entre les patients³⁰⁷. Cependant le développement de la pathologie auto-immune démontre bien leur incapacité à contrôler l'inflammation. Plusieurs études ont montré que le traitement par infliximab augmente la proportion de T_{reg} circulants chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde³⁰⁷. Sous traitement par adalimumab ou etanercept, la proportion de T_{reg} augmente ou reste stable. De même, chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin traités par infliximab, la proportion de T_{reg} circulants augmente ou reste constante³⁰⁷. Cette augmentation est particulièrement observée chez les patients dont la maladie répond au traitement.

L'augmentation apparente de la proportion de T_{reg} dans le sang des patients traités par infliximab pourrait avoir plusieurs explications. Premièrement, les anticorps anti-TNF peuvent paradoxalement induire l'activation du TNFR2 à la surface des T_{reg} en favorisant l'expression du tmTNF par les monocytes³⁶⁰. Deuxièmement, chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou de maladie inflammatoire chronique de l'intestin, les T_{reg} sont plus sensibles à l'apoptose que chez les individus sains. Ils pourraient donc potentiellement être protégés de l'apoptose par l'inhibition du TNF³⁰⁷. Enfin, chez les patients atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin, l'infliximab augmente la proportion de T_{reg} dans le sang tout en diminuant l'expression de *FOXP3* dans la muqueuse intestinale³⁸¹. L'infliximab pourrait donc

bloquer la migration des T_{reg} vers les tissus inflammatoires, ce qui expliquerait leur augmentation relative dans le sang.

| Médicament | Nom commercial | Molécule | Indications |
|---------------------------|----------------|---|--|
| Etanercept | Enbrel | Protéine de fusion TNFR2 humain – IgG1 Fc | Polyarthrite rhumatoïde Psoriasis en plaques Rhumatisme psoriasique Spondylarthrite ankylosante Arthrite chronique juvénile |
| Infliximab | Remicade | Anticorps anti-TNF chimérique humanisé IgG1/κ | Maladie de Crohn Rectocolite hémorragique Polyarthrite rhumatoïde Rhumatisme psoriasique Psoriasis en plaques Spondylarthrite ankylosante |
| Adalimumab | Humira | Anticorps humain anti-TNF IgG1/κ | Polyarthrite rhumatoïde Rectocolite hémorragique Maladie de Crohn Psoriasis en plaques Rhumatisme psoriasique Spondylarthrite ankylosante Arthrite chronique juvénile Hidrosadénite Uvéite non infectieuse |
| Certolizumab pegol | Cimzia | Fragment Fab' PEGylé d'un anticorps humain anti-TNF | Polyarthrite rhumatoïde Rhumatisme psoriasique Spondylarthrite ankylosante Maladie de Crohn |
| Golimumab | Simponi | Anticorps humain anti-TNF IgG1/κ | Polyarthrite rhumatoïde Rhumatisme psoriasique Spondylarthrite ankylosante Rectocolite hémorragique |

Tableau 5: Inhibiteurs du TNF et leurs indications approuvées

2. TNF et cancer

Le TNF, prototype de la cytokine inflammatoire, a été découvert pour son pouvoir nécrotique dans les tumeurs³¹³. Cependant, les doses nécessaires à la nécrose tumorale sont très supérieures aux doses maximales tolérées³¹⁴. Au contraire, à dose physiologique, le TNF participe à l'inflammation chronique du microenvironnement tumoral, au développement de la tumeur et à l'immunoéchappement^{308,310}. Dans le contexte du cancer, le TNF est donc une cytokine réellement ambivalente.

2.1. Le TNF anti-tumoral

En 1975, Carswell *et al.* montrent que les souris infectées avec le bacille de Calmette-Guérin et traitées avec de l'endotoxine produisent une protéine sérique qui provoque la nécrose hémorragique de sarcomes³¹³. Cette protéine, le TNF, semble avoir une toxicité spécifique pour les cellules tumorales puisqu'elle n'est pas toxique pour les fibroblastes embryonnaires de souris. La découverte et le clonage du TNF humain³⁸² permet de vérifier son efficacité dans le traitement de tumeurs syngéniques et de xénogreffes de tumeurs humaines chez la souris³⁸²⁻³⁸⁴. Dans ce contexte, l'administration de fortes doses de TNF recombinant humain est efficace pour induire la nécrose hémorragique. Cependant, l'efficacité est plus importante quand le TNF est administré de façon répétée directement dans la tumeur et en combinaison avec de l'IFN- γ ³⁸⁴. Le TNF murin, quant à lui, n'a pas d'effet additif avec l'IFN- γ et est plus toxique que le TNF humain^{383,385,386}. Ces résultats prometteurs aboutissent aux premiers essais cliniques évaluant la tolérance et l'efficacité de l'administration systémique de TNF recombinant à haute dose pour le traitement de cancers. Malheureusement, ces études concluent à une faible efficacité et une forte toxicité^{314,387-389}. Pour éviter la toxicité systémique, une stratégie de traitement local par perfusion de membre isolé a été développée (Fig. 28)³⁹⁰. Ainsi, la combinaison du TNF avec l'IFN- γ et la chimiothérapie au melphalan en hyperthermie démontre son efficacité pour traiter le mélanome et le sarcome en perfusion de membre isolé³⁹¹. Les études mécanistiques dans un modèle de sarcome chez le rat montrent que le TNF et le melphalan administrés seuls n'ont pas une grande efficacité mais le TNF altère l'intégrité des vaisseaux sanguins tumoraux et augmente leur perméabilité. La combinaison avec le melphalan potentialise la nécrose hémorragique et permet une efficacité prolongée³⁹². La même synergie est observée avec la doxorubicine³⁹³ : l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux augmente la concentration intra-tumorale de chimiothérapie. Ces résultats réservèrent l'utilisation du TNF pour le traitement du cancer aux patients atteints de sarcomes ou de mélanomes localement avancés et non-opérable avec le protocole de perfusion de membre isolé en combinaison avec le melphalan³⁹⁰.

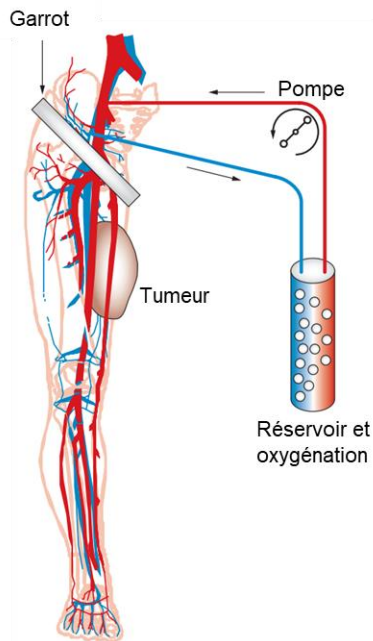


Figure 28: Protocole de perfusion d'un membre isolé.

Représentation schématique du protocole de perfusion de membre isolé pour traiter une tumeur au niveau de la jambe. L'isolement du membre est réalisé en utilisant un garrot et en ligaturant les vaisseaux collatéraux. L'artère et la veine principales sont clampées et canulées puis connectées à un circuit extracorporel oxygéné. Adapté de Grünhagen et al.³⁹⁰

Cependant, le potentiel antitumoral du TNF n'est pas tombé dans l'oubli et de nouvelles stratégies plus ciblées visent à induire la nécrose des cellules endothéliales intra-tumorales. Ainsi, des protéines fusionnant le TNF et un anticorps ciblent des isoformes de la fibronectine issus d'épissages alternatifs et fortement exprimés dans les vaisseaux sanguins tumoraux comparativement aux tissus sains. Ces molécules sont efficaces en combinaison avec une chimiothérapie dans des modèles précliniques de sarcome et de glioblastome^{394,395}. En particulier, la combinaison du L19TNF et de la lomustine (chimiothérapie utilisée après progression sous radio-chimiothérapie au temozolomide chez les patients atteints de glioblastome) induit une nécrose de la tumeur associée à des dommages de l'ADN, une augmentation de l'expression de ICAM-1 dans les cellules endothéliales et une augmentation de l'infiltration par les lymphocytes T et NK dans un modèle préclinique de glioblastome. Un essai clinique de phase I/II est en cours pour évaluer la tolérance et l'efficacité de la combinaison chez des patients en progression sous radio-chimiothérapie classique. Les premiers résultats sont encourageant avec 2 patients sur 6 bénéficiant d'une réponse de plus de 20 mois³⁹⁵.

2.2. Le TNF pro-tumoral

2.2.1. Rôle dans l'angiogenèse et le développement tumoral

À la fin du siècle dernier, des travaux ont montré que le TNF a beau inhiber la prolifération des cellules endothéliales *in vitro*, il a au contraire un effet angiogénique *in vivo*

dans des modèles de cornée de lapin³⁹⁶ et de rat³⁹⁷ ainsi que de membrane chorio-allantoïde embryonnaire de poulet³⁹⁷. Cet effet paradoxal pourrait être dû à la dose ou la voie de signalisation : à faible dose le TNF stimulerait l'angiogénèse³⁹⁸ tandis qu'il l'inhiberait à forte dose³⁹⁹ et le TNFR2 serait principalement responsable de l'effet angiogénique *via* l'expression de VEGF⁴⁰⁰. Le TNF est aussi capable d'induire la différenciation des monocytes recrutés dans la tumeur en un phénotype endothélial qui favorisent la vascularisation et la croissance du mélanome (B16F10), du cancer du poumon (LLC) et du sein (PyMT) chez la souris³⁹⁸. En 1987, Leibovich *et al.* proposent que le TNF peut stimuler le développement tumoral³⁹⁷. À la même époque, on découvre que les cellules tumorales elles-mêmes peuvent produire du TNF^{401,402} et que le TNF stimule sa propre expression et sécrétion dans des cellules du cancer du sein⁴⁰³. On détecte aussi du TNF et son ARNm dans des cellules tumorales et des cellules stromales environnantes dans des biopsies humaines⁴⁰⁴⁻⁴⁰⁶. De même, les concentrations de TNF mesurées dans le plasma de patients atteints de cancers corrént avec la gravité de la maladie^{407,408}. L'ensemble de ces résultats fait basculer la théorie du TNF antitumoral vers un rôle protumoral, d'autant que le TNF potentialise les capacités métastatiques des cellules tumorales chez la souris⁴⁰⁹⁻⁴¹¹.

2.2.2. Rôle dans la carcinogénèse

La création du modèle de souris déficientes pour le TNF (TNF^{-/-})³⁴³ permettra à Moore *et al.*⁴¹² d'apporter la preuve expérimentale que le TNF endogène participe aux stades précoces du développement tumoral. En effet, les souris TNF^{-/-} sont protégées de la carcinogénèse induite dans la peau par application de DMBA (7,12-diméthylbenz[a]anthracène). Une fois la tumeur établie, l'évolution des lésions est similaire chez les souris WT et TNF^{-/-}. Les auteurs ont donc conclu que le TNF participe à la carcinogénèse *de novo* et aux stades précoces du développement tumoral. Cet effet nécessite la signalisation en aval des récepteurs du TNF car les souris déficientes pour le TNFR1 ou le TNFR2 développent significativement moins de tumeurs de la peau induites par l'exposition aux UV, comparativement aux souris WT⁴¹³. Le TNF peut aussi provoquer des dommages de l'ADN qui peuvent aboutir au développement du cancer dans un contexte d'inflammation chronique chez la souris⁴¹⁴⁻⁴¹⁷. L'inhibition du TNF protège aussi les souris de cancers du côlon⁴¹⁸ et du poumon⁴¹⁹ chimiquement induits. Enfin, les cellules tumorales elles-mêmes produisent du TNF qui participe à leur croissance et leur invasion chez la souris⁴²⁰⁻⁴²⁴.

Chez l'humain, il existe un polymorphisme du promoteur du *TNF* en position -308 et qui substitue une guanine par une adénosine⁴²⁵. Cet allèle rare est associé à une augmentation de l'expression du gène *TNF*⁴²⁶ et à un doublement de la sécrétion de la protéine évaluée *in vitro* après stimulation des cellules sanguines totales par le lipopolysaccharide (LPS)⁴²⁷. Plusieurs méta-analyses ont étudié le lien entre ce polymorphisme et la survenue d'un cancer. L'homozygotie pour le polymorphisme -308G>A est notamment associée à un *odds ratio* de 1,44 (95% CI = [1,19 ; 1,73]) de développer un cancer digestif⁴²⁸ dans une étude regroupant 9 986 patients atteints de cancer colorectal, de l'œsophage, de l'estomac, du foie ou du pancréas ainsi que 15 511 individus sains. Une autre analyse sur 5 757 patients atteints de cancer de la prostate et 6 137 sujets sains montre que les individus homozygotes et hétérozygotes ont ensemble un *odds ratio* de 1,531 (95% CI = [1.093 ; 2.145]) de développer un cancer prostatique⁴²⁹. Cette association renforce donc l'hypothèse du rôle protumoral du TNF dans la survenue des cancers chez l'humain.

2.2.3. Dédifférenciation du mélanome

En 2012, Landsberg *et al.* ont montré que le TNF pouvait être impliqué dans la « dédifférenciation » des cellules de mélanome : une perte réversible des antigènes mélanocytaires qui participe à l'immunoéchappement²⁵⁶. Ce travail a démontré chez la souris que l'inflammation provoquée par le transfert adoptif de lymphocytes T CD8 spécifiques de l'antigène tumoral gp-100 provoquait la dépigmentation des cellules tumorales (Fig. 29) associée à la diminution de l'expression de gp-100, une augmentation de l'expression d'un antigène de la crête neurale (NGFR) et une rechute des tumeurs. Le TNF en particulier, est causalement impliqué dans ce phénomène qui s'est aussi vérifié dans des lignées de mélanome humain. En effet, les cellules traitées au TNF sont moins bien reconnues par les lymphocytes T spécifiques de l'antigène gp-100 tandis que cela n'affecte pas la reconnaissance par les lymphocytes T spécifiques d'un antigène non-mélanocytaire. Le même groupe a ensuite décrit le mécanisme sous-jacent qui implique l'activation de c-Jun, inhibiteur de l'expression du facteur de transcription MITF⁴³⁰. MITF lui-même se lie aux régions régulatrices de c-Jun et la diminution d'expression de MITF amplifie l'expression de c-Jun qui mène à une suppression importante de MITF. Le phénotype MITF^{low}/c-Jun^{high} du mélanome est associé à une importante infiltration des cellules myéloïdes potentiellement immunosuppressives chez la souris et l'humain⁴³⁰. Dans des lignées humaines de mélanome, le TNF diminue l'expression de MITF et de sa cible MART-1 (Melan A) *via* l'activation des facteurs de transcription Myc et BRN2⁴³¹.

Myc est aussi impliqué dans la mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur⁴³² et son amplification est associée à la résistance aux ICI⁴³³. L'expression de BRN2 est inversement corrélée à celle de MITF et elle est impliquée dans la progression et le phénotype invasif du mélanome⁴³⁴. De même, dans des lignées humaines et murines de mélanome, le TNF induit l'expression du récepteur d'aryl hydrocarbure (AHR) qui participe à la dédifférenciation et à la métastase *in vivo*⁴³⁵. En plus de la perte d'immunogénicité due à la diminution d'expression des antigènes mélanocytaires, la dédifférenciation est associée à une augmentation de l'expression de CD73⁴³⁶ et PD-L1⁴³⁷ qui peuvent aussi participer à l'immunoéchappement. En effet, CD73 est une ectonucléotidase qui convertit l'AMP extracellulaire en adénosine qui est un métabolite immunosuppresseur¹⁴⁶. Le phénomène de dédifférenciation a depuis été décrit chez un patient atteint de mélanome métastatique et traité par transfert adoptif de lymphocytes T CD8 spécifiques de l'antigène MART-1⁴³⁸.

L'inhibition pharmacologique de la voie des MAPK induit une augmentation de l'infiltration des macrophages de la tumeur⁴³⁹. De façon surprenante, le TNF produit par ces macrophages induit l'expression de MITF en aval de la voie IKK / NF- κ B, ce qui induirait un signal de survie dans les cellules de mélanome et une résistance aux inhibiteurs de BRAF et de MEK^{439,440}. Le TNF pourrait donc avoir un effet dual sur l'expression de MITF : inhiber son expression *via* c-Jun dans un contexte de pression de sélection immunitaire ou activer son expression pour induire un signal de survie en réponse à l'inhibition de la voie MAPK.

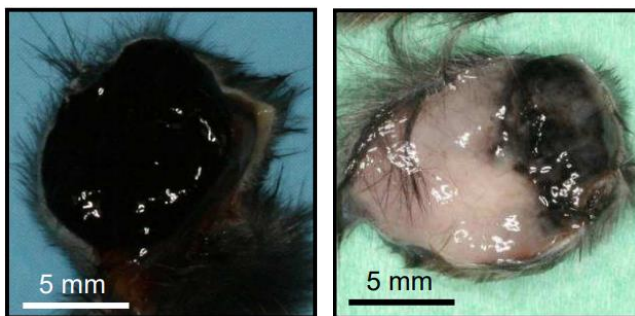


Figure 29: Mélanome dédifférencié. Tumeur de souris dédifférenciée après rechute sous transfert adoptif de lymphocytes T CD8 (droite) comparée à une tumeur contrôlée sans transfert adoptif (gauche). Extrait de Landsberg *et al.*²⁵⁶

2.2.4. Métastases

L'exposition aux UV est le principal facteur de risque de développement du mélanome¹, mais elle augmente le potentiel angiotropique et métastatique des cellules de mélanome⁴⁴¹. Ainsi, les kératinocytes endommagés par les UV relarguent HMGB1, un « *damage-associated molecular pattern* (DAMP) », qui est reconnu par le « *Toll-like receptor 4* (TLR4) » des

neutrophiles. L'inflammation induite par le recrutement de neutrophiles dans le microenvironnement tumoral favorise la croissance tumorale ainsi que l'angiotropisme et les métastases *via* la sécrétion de TNF. En effet, les cellules de mélanome traitées au TNF ont un phénotype plus migratoire, en particulier sur un tapis cellulaire composé de cellules endothéliales comparé à un tapis de kératinocytes⁴⁴¹. Ces résultats sont cohérents avec les expériences historiques qui montrent que le TNF augmente le potentiel métastatique des cellules tumorales dans des modèles de métastase expérimentale chez la souris⁴⁰⁹⁻⁴¹¹.

2.2.5. Immunosuppression

Le TNF est impliqué dans l'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire. Il a notamment un effet cytotoxique dans l'interaction des lymphocytes T CD8^{341,442} et NK⁴⁴²⁻⁴⁴⁴ avec les cellules tumorales cibles. Cet effet serait beaucoup plus lent que la cytotoxicité médiée par perforine/granzyme et serait essentiellement dû au TNF membranaire³⁴¹. L'effet antitumoral des macrophages médié par la production d'oxyde nitrique implique aussi le TNF *via* la signalisation dépendante du TNFR2⁴⁴⁵. Cependant nous avons vu que les doses physiologiques de TNF ne suffisent pas à obtenir une efficacité antitumorale. Au contraire, le TNF semble être impliqué dans plusieurs mécanismes qui altèrent la réponse immunitaire et qui participent à la résistance aux traitements.

Comme nous l'avons vu dans le chap.III§1.3.3, le TNF a un rôle majeur dans la biologie des T_{reg} : il est impliqué dans leur différenciation, leur expansion, leur capacité immunosuppressive et leur survie^{356,367}. Les T_{reg} sont des cellules immunosuppressives majeures dans le microenvironnement tumoral et ils sont impliqués dans la résistance aux immunothérapies¹¹⁵. Ce sont donc des cibles privilégiées pour lever ces résistances et l'axe TNF/TNFR2 pourrait être une piste. En effet, les T_{reg} exprimant le TNFR2 ont un pouvoir immunosuppresseur supérieur et s'accumulent dans la tumeur chez la souris³⁶⁷. Dans un modèle de métastase expérimentale de mélanome chez la souris, le TNF provoque l'augmentation du nombre de T_{reg} retrouvés dans les métastases pulmonaires *via* la signalisation dépendante du TNFR2⁴⁴⁶. La signalisation TNFR2 augmente les capacités immunosuppressives des lymphocytes T folliculaires régulateurs (T_{FR}) humains en augmentant leur expression de PD-1 et ICOS⁴⁴⁷. Ceci qui a pour effet d'inhiber la prolifération des T_{FR} et des lymphocytes B ainsi que la différenciation des lymphocytes B et leur production d'IgM en coculture. Le TNF joue aussi un rôle (mineur comparé à la LT α) dans la mise en place des TLS qui sont associés

favorablement à la réponse aux immunothérapies^{163,165}, mais il pourrait aussi exercer un effet immunosuppresseur en activant les T_{FR}.

Chez la souris, le TNF est aussi impliqué dans la différenciation des lymphocytes B régulateurs (B_{reg}) qui produisent de l'IL-10 et qui inhibe la réponse anti-tumorale⁴⁴⁸. Les B_{reg} sont surreprésentés dans le sang des patients atteints de mélanome (comparativement aux donneurs sains) et leur sécrétion de TGF- β est capable d'induire la différenciation de T_{reg} *ex vivo*⁴⁴⁹. Une étude a montré *in vitro* que des lignées de mélanome ayant une expression aberrante du CMH-II activent de façon spécifique les lymphocytes T CD4 autologues qui, en réponse, sécrètent du TNF. Ce TNF est capable d'inhiber l'activité des CD8 dans un environnement riche en IFN- γ ⁴⁵⁰.

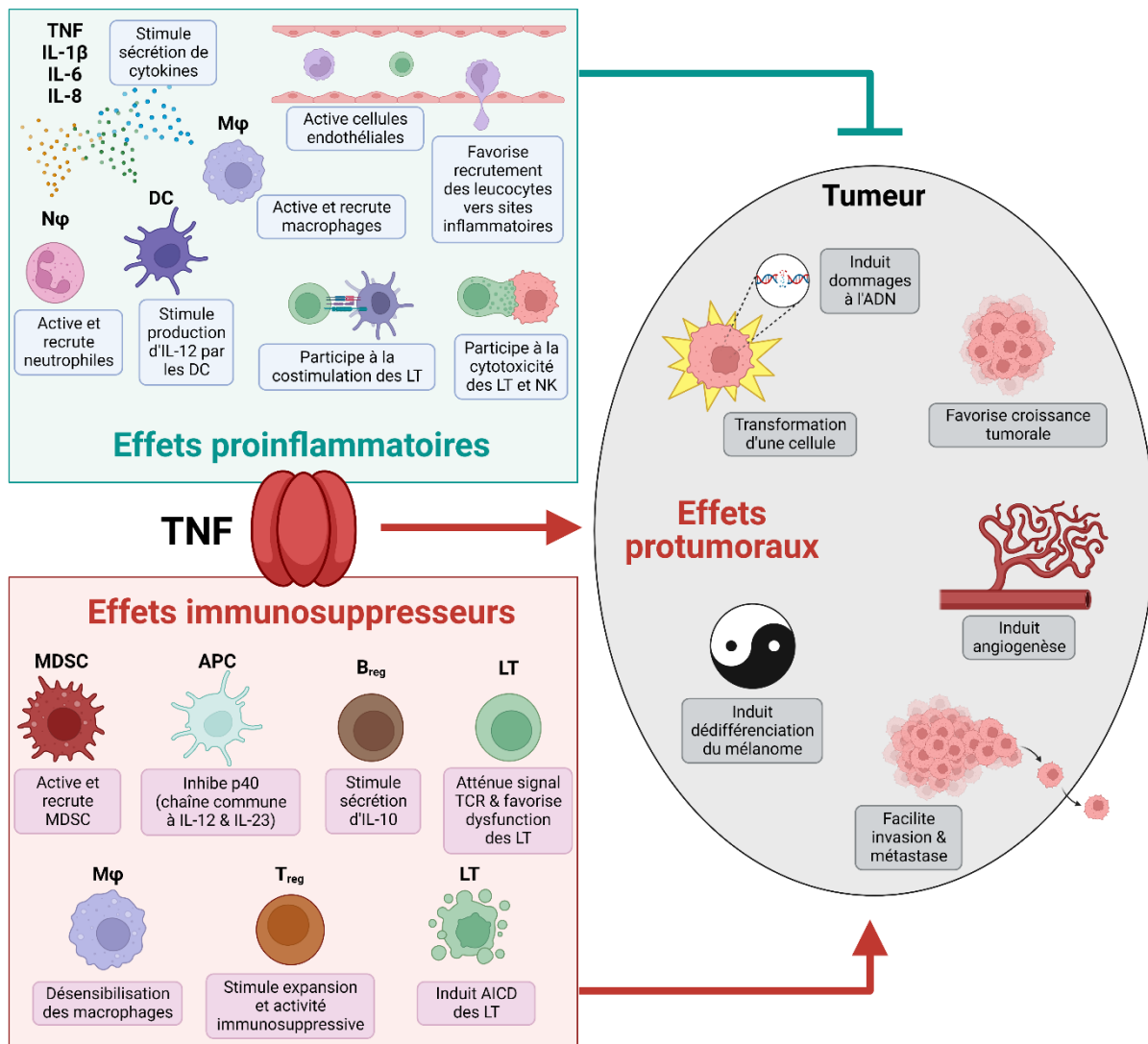


Figure 30: Effets du TNF dans l'immunologie et la progression du mélanome.

Le TNF a des effets pro-inflammatoires ainsi que des effets immunosuppresseurs qui ont respectivement un impact antitumoral ou pro-tumoral. Le TNF agit aussi directement sur la tumeur en favorisant son développement et l'échappement au système immunitaire. AICD : mort cellulaire induite par l'activation ; APC : cellule présentatrice d'antigènes ; B_{reg} : lymphocytes B régulateurs ; DC : cellule dendritique ; LT : lymphocytes T ; MDSC : cellules myéloïdes suppressives ; M ϕ : macrophages ; N ϕ : neutrophiles ; T_{reg} : lymphocytes T régulateurs. Réalisé avec Biorender.

3. TNF et immunothérapies

Bien qu'il ait été découvert grâce à ses propriétés anticancéreuses, il est aujourd'hui largement admis que le TNF participe à la cancérogénèse et aux mécanismes d'échappement immunitaire. Ces découvertes ont naturellement été suivies d'essais cliniques visant à étudier la tolérance et l'efficacité de molécules ciblant le TNF comme traitement du cancer. Nous verrons aussi que le TNF est impliqué dans les effets indésirables immunitaires provoqués par les ICI et peut donc être ciblé pour les traiter. Enfin, au vu de l'implication du TNF dans la résistance aux immunothérapies ainsi que dans les effets indésirables associés, nous présenterons les stratégies les plus récentes consistant à bloquer le TNF en combinaison avec les ICI, recherches sur lesquelles ce travail de thèse est bâti.

3.1. Inhiber le TNF pour traiter le cancer

Au début des années 2000, le groupe du Professeur Balkwill a initié une série d'essais cliniques visant à évaluer l'inhibition du TNF pour traiter le cancer. Deux essais cliniques de phase Ib et II ont évalué la tolérance et l'activité biologique de l'etanercept chez des patientes atteintes de cancer des ovaires⁴⁵¹ ou de cancer du sein métastatique⁴⁵² après rechute ou résistance sous thérapie conventionnelle. Ces études ont conclu que l'administration de l'etanercept est sûre et qu'elle entraîne une rapide augmentation de la concentration plasmatique de TNF accompagnée d'une baisse d'IL-6 et de CCL2 plasmatiques. Le TNF lié par l'etanercept s'est avéré biologiquement inactif, confirmant l'efficacité de l'inhibition. Dans ces deux essais cliniques, une minorité de patientes (6/30 et 1/16, respectivement) ont bénéficié d'une stabilisation temporaire de la maladie.

En parallèle, deux essais cliniques de phase II ont évalué la tolérance et l'activité biologique de l'infliximab chez des patients atteints de carcinome à cellules rénales⁴⁵³ ou de cancer solide avancé et/ou métastatique⁴⁵⁴ pour lesquels aucun traitement n'était disponible ou après rechute / résistance sous traitements conventionnels. Ces études ont démontré la sûreté de l'administration d'infliximab chez des patients atteints de cancer avancé et l'efficacité de l'inhibition du TNF circulant ainsi que de l'IL-6 et CCL2. Encore une fois, une minorité de patients ont bénéficié d'une stabilisation de la maladie : 1 réponse partielle et 14 maladies stables parmi les 37 patients atteints de carcinome à cellules rénales et 7/41 maladies stables parmi la deuxième cohorte multi-cancer.

Ces résultats furent considérés prometteurs compte tenu de l'histoire médicale des patients⁴⁵¹⁻⁴⁵⁴ mais il est à noter qu'une étude plus récente a conclu que l'etanercept n'apportait pas de bénéfice thérapeutiques en combinaison à la gemcitabine chez des patients atteints de cancer du pancréas⁴⁵⁵. L'inhibition du TNF n'a pas été envisagée dans le mélanome avancé et on peut penser que l'apparition des thérapies ciblées et des ICI ont éclipsé cette stratégie.

3.2. Traitement des effets indésirables immunitaires

Comme nous l'avons vu au chap.II§2.5, le TNF est impliqué dans certains effets indésirables immunologiques induits par ICI et il peut être ciblé pour les traiter. Notamment, les inflammations du colon et des articulations induites par immunothérapies s'apparentent respectivement aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin^{456,457} et à la polyarthrite rhumatoïde⁴⁵⁸. Cette ressemblance entre maladies inflammatoires chroniques et effets indésirables des immunothérapies est la raison pour laquelle l'infliximab est utilisé pour inhiber le TNF chez les patients traités par ICI et qui développent des colites réfractaires aux corticostéroïdes, avec une efficacité démontrée^{249,250}.

3.3. Inhiber le TNF en combinaison avec les immunothérapies

En se basant sur le potentiel pro-tumoral du TNF, mon équipe a étudié la croissance du mélanome chez la souris TNF^{-/-}. Pour cela ils ont utilisé la lignée de mélanome murin B16K1 qui correspond à des B16F10 transfectées pour surexprimer H-2K^b (CMH-I murin). Les tumeurs issues de cellules B16K1 greffées en intradermique croissent moins vite chez les souris TNF^{-/-} que chez les souris WT⁴⁵⁹. La même observation a été faite avec les tumeurs issues de la lignée YUMM⁴⁶⁰ qui exprime fortement le CMH-I mais pas avec les B16F10 (qui expriment faiblement le CMH-I), ce qui indique que le TNF pourrait inhiber la réponse immunitaire restreinte au CMH-I et donc dépendante des lymphocytes T CD8. En effet, chez la souris TNF^{-/-}, les tumeurs sont infiltrées de façon plus importante par les lymphocytes T CD8, dont les CD8 spécifiques de l'antigène mélanocytaire TRP2, mais aussi par les CD4 (dont les T_{reg}) et les cellules CD45⁺ en général. Toujours chez la souris TNF^{-/-}, les tumeurs contiennent plus de HEV qui sont une voie d'entrée majeure des lymphocytes dans les tumeurs¹⁷⁰. Un phénotype semblable est observé chez les souris TNFR1^{-/-}: diminution de la croissance tumorale, augmentation de l'infiltration des lymphocytes T CD8, dont les spécifiques de TRP2 et augmentation du contenu des tumeurs en HEV. Cependant ce phénotype n'est pas retrouvé chez

la souris *TNFR2^{-/-}*, indiquant que le TNF inhibe la réponse immunitaire *via* la signalisation dépendante du TNFR1. *In vitro*, le TNF induit l'AICD des lymphocytes T CD8 *via* la signalisation du TNFR1. L'inhibition de la croissance tumorale et l'augmentation de l'infiltration des lymphocytes T CD8 ont été reproduites en inhibant le TNF chez la souris WT avec l'etanercept, ce qui a ouvert la voie à la combinaison de l'inhibition du TNF avec les ICI. En effet, parmi les cas de mélanome répertoriés dans la base de données TCGA, une forte expression du *TNF* est associée à une signature d'immunoéchappement. L'expression du *TNF* est aussi corrélée à l'expression de *HAVCR2*, *PDCD1LG1* et *PDCD1LG2*, codant respectivement pour TIM-3, PD-L1 et PD-L2 dans les mélanomes avant traitement (TCGA) et sous traitement anti-PD-1⁴⁶¹.

Mon équipe a ensuite démontré que l'efficacité d'un anti-PD-1 est augmentée chez les souris *TNF^{-/-}* et *TNFR1^{-/-}* porteuses d'une tumeur B16K1⁴⁶¹. Cette meilleure efficacité est associée à une augmentation de l'infiltration tumorale des leucocytes CD45⁺, y compris les lymphocytes T CD8 et CD4. Cette meilleure infiltration est probablement due à une diminution de l'AICD induite par le TNF puisqu'il n'y a pas de différence dans la proportion de lymphocytes T CD4 et CD8 proliférant (Ki67⁺) parmi ceux qui infiltrent la tumeur et il n'a pas non plus de différence dans l'expression des chimiokines CXCL9, CXCL10, CCL5, CCL2, CCL19 et CCL21 dans les tumeurs, qui auraient pu expliquer un influx de lymphocytes. Les lymphocytes infiltrant la tumeur voient leur expression de PD-L1 et TIM-3 augmentées sous traitement anti-PD-1 chez les souris WT mais cet effet disparaît chez les souris *TNF^{-/-}*. Au contraire, la déficience pour le *TNF* n'a pas d'effet sur l'expression membranaire des points de contrôles immunitaires TIGIT, LAG-3 et CTLA-4 sur les CD8. *In vitro*, le TNF induit l'expression de TIM-3 à la surface des CD8 *via* le TNFR1 et la signalisation dépendante de la p38 MAPK. Le TNF exogène augmente aussi l'expression de TIM-3 à la surface des lymphocytes T CD8 isolés de mélanome humain. Enfin, la potentialisation de l'efficacité du traitement anti-PD-1 par la déficience en *TNF* est retrouvée lorsque l'on combine des anticorps anti-TNF aux anti-PD-1 chez les souris WT greffées avec un mélanome B16K1⁴⁶¹. De même, l'inhibition du TNF accentue l'infiltration des lymphocytes T CD8 dans la tumeur et diminue l'expression de TIM-3 à la surface de ces cellules ainsi que leur mort, par rapport au traitement anti-PD-1 seul.

L'équipe d'Ignacio Melero s'est aussi intéressée à l'inhibition du TNF mais dans une stratégie prophylactique, pour prévenir la toxicité de la combinaison anti-PD-1 + anti-CTLA-

4³⁰⁵. En effet, l'expression du *TNF* est augmentée dans les prélèvements de muqueuse du côlon chez les patients souffrant de colite induite par les ICI, comparativement à la muqueuse saine adjacente, mais sans atteindre les niveaux d'expression observés chez des patients souffrant de maladie inflammatoire chronique de l'intestin³⁰⁵. Dans ces deux situations pathologiques, la signalisation induite par le TNF est fortement activée. Dans cette étude, Perez-Ruiz *et al.* ont utilisé un modèle de colite induite par dextran sulfate de sodium (DSS) dans l'eau de boisson chez la souris. Cette colite expérimentale est aggravée par l'inhibition de PD-1 et CTLA-4 mais un anti-TNF ou l'etanercept permet d'atténuer la colite. L'inhibition du TNF augmente l'efficacité de l'inhibition de PD-1 et CTLA-4 pour traiter des souris greffées avec des cellules MC38 (lignée murine de cancer du côlon) ou B16-OVA (B16F10 modifiées pour exprimer l'ovalbumine) sous la peau. De plus, quand ils induisent une colite avec du DSS chez les souris porteuses de tumeurs MC38, l'anti-TNF et l'etanercept permettent non seulement d'améliorer la colite, mais aussi l'efficacité de l'inhibition de PD-1 et CTLA-4 et la survie des souris. Dans ce modèle, l'inhibition du TNF favorise l'infiltration des lymphocytes T CD8 spécifiques d'un antigène tumoral (gp70 pour MC38 et ovalbumine pour B16-OVA) mais n'a pas d'effet sur l'expression membranaire de PD-1 et TIM-3 sur ces mêmes cellules. L'expression des autres points de contrôle immunitaire que sont CTLA-4, LAG-3, BTLA, 2B4, CD160 ainsi que dans la prolifération (Ki67) ne sont pas non plus affectés dans ces CD8 spécifiques de la tumeur. En accord avec les résultats de notre équipe^{459,461}, les auteurs ont proposé que l'augmentation observée des lymphocytes T CD8 spécifiques infiltrant la tumeur est probablement due à une prévention de l'AICD induite par le TNF. Ils ont confirmé *in vitro* que l'inhibition du TNF diminue la mort des CD8 murins et humains, activés en présence d'anti-PD-1 et d'anti-CTLA-4. Enfin dans un modèle de transfert adoptif de PBMC issus de donneurs sains chez des souris *Rag2^{-/-}*, *Il2rg^{-/-}* qui induit une maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) associée notamment à des hépatites et colites, les ICI aggravent la GVHD. Dans ce contexte, l'etanercept inhibe significativement la GVHD sans affecter l'efficacité de la combinaison nivolumab + ipilimumab pour rejeter des tumeurs issues de la lignée humaine HT29 de cancer du côlon.

Objectifs de la thèse :

En se basant sur ce corpus et sur ces résultats précliniques très encourageants, mon équipe a initié deux essais cliniques qui ont fait l'objet de ce travail de thèse :

- MELANF α ([NCT03348891](#)) est un essai clinique prospectif translationnel visant à évaluer la capacité des taux plasmatiques de TNF à identifier les patients atteints de mélanome avancé qui présenteront une maladie non progressive à la semaine 12.
- TICIMEL ([NCT03293784](#)) est un essai clinique de phase Ib visant à évaluer la tolérance de la combinaison concomitante d'anti-TNF : infliximab ou certolizumab avec des ICI : nivolumab et ipilimumab.

En parallèle, j'ai utilisé des modèles de mélanome chez la souris afin d'étudier l'effet de l'inhibition concomitante du TNF avec des anticorps anti-PD-1 et anti-CTLA-4 sur l'efficacité de ces traitements ainsi que sur la modulation des populations immunitaires, dans la tumeur et en périphérie.

Ainsi, mon travail de thèse s'est articulé autour de trois questions principales :

- 1) L'évolution des concentrations plasmatiques de TNF pendant le traitement est-elle associée à la réponse des patients atteints de mélanome avancé et traités par anti-PD-1 ou la combinaison anti-PD-1 + anti-CTLA4, ainsi qu'à l'évolution d'autres biomarqueurs circulants ?
- 2) Quel est l'impact de l'inhibition concomitante du TNF, de PD-1 et de CTLA-4 chez les patients atteints de mélanome avancé sur la réponse immunitaire ?
- 3) L'inhibition de TNF permet-elle d'améliorer l'efficacité de la combinaison anti-PD-1 + anti-CTLA-4 chez la souris et quel est son impact sur les populations leucocytaires dans la tumeur et en périphérie ?

RÉSULTATS

Article 1 : TNF signature in advanced melanoma patients treated with immune checkpoint inhibitors: results from the MELANF α clinical study

Article en préparation pour soumission dans une revue à comité de lecture

Résumé :

Les ICI ont révolutionné le traitement des patients atteints de mélanome métastatique et permettent une réponse clinique durable. Cependant, seule une minorité de patients répond à ces traitements et les biomarqueurs prédictifs de la réponse disponibles ne sont pas satisfaisants. Le TNF est une cytokine pléiotropique qui favorise la croissance tumorale et nuit à l'immunité antitumorale. Les études précliniques montrent que le TNF nuit aussi à la réponse aux ICI et son blocage permet d'améliorer la survie des souris. Nous avons donc envisagé le TNF comme un biomarqueur de résistance aux ICI.

MELANF α est un essai clinique prospectif qui vise à évaluer la capacité de l'évolution des concentrations de TNF plasmatiques à prédire la réponse des patients atteints de mélanome avancé et traités par anti-PD-1 seul (monothérapie) ou par la combinaison anti-PD-1 + anti-CTLA-4 (bithérapie) dans une cohorte de 60 patients. Nous avons aussi évalué la relation entre le TNF (et sa signalisation) et les proportions de sous-populations de lymphocytes T circulants.

En comparant les concentrations plasmatiques de TNF avant (S0) et pendant le traitement (S6 : semaine 6 et S12 : semaine 12), nous avons observé que les concentrations plasmatiques de TNF augmente pendant le traitement. Cependant, cette évolution n'est pas associée avec la réponse objective des patients évaluée à la semaine 12, même si la concentration plasmatique de TNF était plus élevée chez les patients non-répondeurs que chez les répondeurs, à la semaine 12. Nous n'avons par contre pas détecté de changement dans les concentrations d'IL-6 et d'IFN- γ sous traitement.

Seule la bithérapie semble avoir un effet sur les proportions et le phénotype des sous-populations de lymphocytes T circulants, en tous cas selon les paramètres que nous avons évalués. Parmi les patients traités par bithérapie, le ratio S12/S0 des proportions de lymphocytes T CD8 effecteurs mémoires était plus élevé chez les non-répondeurs que chez les répondeurs. Au contraire, les ratios S12/S0 des proportions de CD8 centraux mémoires et de Th1 (CD4⁺CXCR3⁺CCR6⁻) étaient plus élevés chez les patients répondeurs que chez les non-répondeurs. L'analyse du séquençage sur cellule unique des PBMC de 8 patients traités par bithérapie montre que les lymphocytes T ne produisent pas de TNF dans le sang. Par contre, ils présentent une signature de signalisation TNF qui est plus active chez les patients non-répondeurs que chez les répondeurs à la semaine 6.

Bien que l'évolution des concentrations de TNF plasmatique ne soit pas associée à la réponse clinique objective des patients atteints de mélanome avancé et traités par ICI, les patients non-répondeurs ont une concentration plasmatique de TNF plus élevée que les patients répondeurs à la semaine 12. De plus, les lymphocytes T des patients non-répondeurs présentent une signature de signalisation TNF plus active que ceux des répondeurs.

Research article: Cancer therapy: Clinical

TNF signature in advanced melanoma patients treated with immune checkpoint inhibitors: results from the MELANF α clinical study.

Mathieu Virazels^{1,2}, Amélie Lusque^{3,4}, Stéphanie Brayer^{1,2,5}, Matthieu Genais^{1,2}, Carine Dufau^{1,2}, Jean Milhès^{1,2}, Thomas Filleron^{3,4}, Cécile Pagès^{1,2,4,6}, Vincent Sibaud^{4,6}, Laurent Mortier⁷, Olivier Dereure⁸, Maha Ayyoub^{1,2,4}, Amandine Fabre^{4,6}, Nathalie Andrieu-Abadie^{1,2}, Vera Pancaldi¹, Céline Colacios^{1,2}, Nicolas Meyer^{1,2,4,5}, Bruno Ségui^{1,2,*}, Anne Montfort^{1,2,*}

Affiliations

¹Unité Mixte de Recherche INSERM 1037, CNRS 5071, Université Toulouse III - Paul Sabatier, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), 31037 Toulouse, France.

²Equipe Labellisée Fondation ARC pour la recherche sur le cancer, 31037 Toulouse, France.

³Biostatistics & Health Data Science Unit, Oncopole Claudius Regaud, 31059 Toulouse, France.

⁴Institut Universitaire du Cancer (IUCT-O), 31059 Toulouse, France.

⁵Service d'Oncodermatologie, IUCT-O, CHU de Toulouse, 31059 Toulouse, France.

⁶Clinical Research department, Oncopole Claudius Regaud, 31059 Toulouse, France.

⁷Dermatologie, CHRU de Lille, 59037 Lille, France.

⁸Department of Dermatology, University of Montpellier, Montpellier, France.

*: equal contribution and co-corresponding authors.

Running title: TNF in melanoma patients on immunotherapy.

Keywords: Melanoma, clinical trial, immune checkpoint inhibitors, TNF, T cells

Additional information:

Claudius Regaud Oncopole (OCR) and Cancer Research Center of Toulouse (CRCT) designed the MELANF α clinical trial. OCR and CRCT wrote the MELANF α protocol, which has been reviewed and approved by Bristol Myers-Squibb (BMS). BMS has funded the clinical trial and part of the ancillary study. Oncopole Claudius Regaud was the sponsor of the study. Cancéropôle Grand Sud-Ouest (GSO), La ligue contre le Cancer (Région Occitanie), IUCT-O (Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), INCa and TRANSCAN have funded part of the ancillary study. Fondation Toulouse Cancer Santé (FTCS) has funded the salary support of M. Virazels and S. Brayer. Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) has funded the salary support of J. Milhes. Collection, analysis, and interpretation of data have been jointly assessed by OCR and CRCT. Decision to submit the paper for publication has been jointly taken by OCR and CRCT. The corresponding authors confirm that they had full access to all the data in the study and share the final responsibility for the decision to submit for publication.

Conflict of interest:

B.S. has worked as investigator, consultant and speaker for BMS. N.M. has worked as investigator and/or consultant and/or speaker for BMS, MSD, Roche, Novartis, Pierre Fabre, Amgen, Incyte, Abbvie. B.S., C.C., N.A.A. have a patent US10144772B2 issued, a patent WO2015173259A1 pending, a patent EP3142685B1 issued, a patent ES2748380T3 issued. B.S., C.C., N.A.A., N.M. have a patent EP3407911A1 pending, a patent JP2019503384A pending, a patent US20190038763A1 pending, and a patent WO2017129790A1 pending. The other authors declare that they have no conflict of interest.

Word count: 4995 (Introduction, materials and methods, results, discussion)

Number of figures: 5

Number of tables: 1

Translational Relevance

TNF may contribute to melanoma progression and resistance to immune checkpoint inhibitors. Whether TNF is a biomarker of response to immune checkpoint inhibitors in advanced melanoma patients and whether its evolution during treatment is linked to immune modulations and treatment efficacy remained to be evaluated. Here, a prospective clinical trial was conducted in advanced melanoma patients treated with nivolumab or pembrolizumab in combination (bitherapy cohort) or not (monotherapy cohort) with ipilimumab. TNF plasma levels as well as circulating T cells were monitored prior to treatment implementation and during treatment at week 6 (W6) and 12 (W12). While changes in TNF plasma concentrations between baseline and W12 were not associated with the clinical response at W12, non-responders had a higher TNF signature in T cells at W6 and higher TNF plasma levels at W12 compared to responders, further arguing that TNF may compromise response to immune checkpoint inhibitors in advanced melanoma patients.

Abstract

Purpose: Resistance mechanisms to immune checkpoint inhibitors (ICI) in cancer patients are currently not fully understood and predictive biomarkers are lacking.

Patients and Methods: MELANF α (NCT03348891) is an open-label, prospective, multicenter cohort of 60 advanced melanoma patients receiving ICI (bitherapy: ipilimumab + nivolumab; monotherapy: pembrolizumab or nivolumab). Its primary objective was to investigate whether the evolution of plasma TNF between baseline (W0) and week 12 (W12) identified patients presenting non-progressive disease at W12. Among secondary and exploratory objectives, we assessed the association of plasma TNF levels with changes in circulating T cells to find putative biomarkers of response.

Results: TNF plasma levels increased along therapy but their evolution from W0 to W12 was not associated with non-progressive disease at W12. However, TNF plasma levels at W12 were significantly higher in non-responders (NR) than in responders (R). Changes in proportions and numbers of circulating T cell subpopulations were nearly exclusively triggered upon bitherapy. In this setting, the W12/W0 ratio of effector memory CD8 T cells was higher in NR than in R and the W6/W0 ratio of central memory CD8 and Th1 cells were significantly higher in R than in NR. Single cell RNA sequencing analysis showed that NR displayed a higher TNF signaling signature in T cells at W6 than in R.

Conclusions: Our results show that elevated TNF plasma levels and TNF signaling signature in T cells along therapy are associated with a poorer clinical outcome and reinforces the notion that TNF might dampen ICI efficacy.

Introduction

Immune checkpoint inhibitors (ICI) targeting CTLA-4 and PD-1 brought unprecedented results in the treatment of patients with advanced melanoma, and have thus become the new standards of care. The Checkmate 067 trial demonstrated the durable survival benefit of nivolumab (anti-PD-1, monotherapy) and the combination of nivolumab plus ipilimumab (anti-PD-1 + anti-CTLA-4, bitherapy) over ipilimumab alone (1). However, there is still room for improvement, as more than half of patients initially fail to respond or eventually relapse within 2 years of treatment induction (1). The basic mechanisms underlying the response or resistance to ipilimumab and nivolumab as single agents are not completely understood (2) and the combination of the two may generate specific effects that do not correspond to the addition of the two monotherapies (3). Although the bitherapy confers a demonstrated advantage in case of brain metastases (4), it is unclear which patients benefit most from each regimen in the absence of brain lesions (5). Furthermore, the bitherapy is associated with a more severe and frequent toxicity than the monotherapy (1), arguing for a cautious choice of treatment. As these therapies are now being considered in adjuvant (6) and neo-adjuvant (7) settings, the same questions apply.

The available predictive markers of response are not satisfactory. The tumor mutational burden (TMB) (8) and PD-L1 expression (9) were shown to correlate with ICI efficacy, however they do not reliably predict patient's response. Indeed, some patients with low TMB and/or PD-L1 expression can respond to ICI (10). There is a need for biomarkers that could help stratify patients to find the best treatment regimen and improve the clinical objective response and survival. To be used effectively in the clinic, predictive biomarkers need to be easily assessable and require minimally invasive procedures, such as blood sampling.

Inflammatory cytokines, such as TNF, are known to play a role in cancer progression and resistance to ICI (11), and there is increasing evidence that chronic production of TNF in the tumor microenvironment promotes tumor growth and impairs the anti-tumor immune response (12,13). Our team notably showed that TNF blockade improves the efficacy of anti-PD-1 in preclinical models (14). Moreover, TNF blockade can improve anti-PD-1 plus anti-CTLA-4 efficacy while reducing colon and liver toxicity in mice (15). In the clinic, TNF inhibitors are administered to treat steroid-refractory colitis after discontinuation of ICI. However, the impact of anti-TNF on the response to ICI is still debated (16-18). Recently, our phase Ib clinical trial, TICIMEL, demonstrated that the concomitant combination of anti-TNF (either certolizumab or infliximab) with nivolumab and ipilimumab was safe in advanced melanoma patients, with a promising efficacy signal when certolizumab was co-administered with ICI (19).

Given its immunosuppressive effects in tumors, TNF could serve as a putative biomarker of response to ICI. To our knowledge, the predictive value of plasma TNF on the response to ICI has not been prospectively evaluated in advanced melanoma patients treated with ICI. For these reasons, we designed MELANF α (NCT03348891), an open-label, prospective, multicenter, translational proof-of-concept cohort study of 60 advanced melanoma patients treated with ICI. Patients were treated with either anti-PD-1 monotherapy (pembrolizumab or nivolumab) or with the ipilimumab plus nivolumab bitherapy. In the present study, the primary objective was to assess whether the evolution of TNF plasma levels between baseline and week 12 after treatment induction could identify patients whose disease had not progressed at week 12 after ICI administration. Secondary objectives were to explore and compare the mechanisms of action of both monotherapy and bitherapy by monitoring the pharmacodynamics of ICI on circulating immune cells and plasma cytokines.

Patients and Methods

Study design and participants

MELANF α is an open-label, prospective, multicenter, translational proof-of-concept clinical trial performed in three centers in France (Institut Universitaire du Cancer de Toulouse - Oncopole [IUCT-O; Toulouse, France]; CHRU Lille; CHU Montpellier). The study was sponsored by OCR. A total of 60 histologically-proven Stage IIIc/IV metastatic and/or unresectable cutaneous melanoma patients (mucosal melanoma included) with documented BRAFV600 mutation status were enrolled. They were treated with either nivolumab or pembrolizumab (anti-PD-1) and referred to as the “monotherapy cohort” or with nivolumab + ipilimumab (anti-CTLA-4) and referred to as the “bitherapy cohort”. Eligible patients, were older than 18 years, naïve to immune checkpoint inhibitor treatments and had an Eastern Oncology Group Performance status (ECOG) of 0 to 2. Additional inclusion and exclusion criteria are available online. The trial protocol was reviewed and approved by the French committee for the protection of persons (Comité de protection des personnes Sud Est III) and the French drug agency (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé; date of approval January 24, 2018; EudraCT 2017-A02511-52). All study procedures were carried in accordance to the International Council for Harmonization tripartite guideline on good clinical practice (Helsinki declaration). MELANF α is registered under ClinicalTrials.gov, number NCT03348891.

Objectives

The study primary objective was to evaluate whether the evolution of TNF plasma levels between week 0 (W0) and week 12 (W12) allows to identify patients with non-progressive disease at week 12 upon ICI as evaluated by Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis.

Secondary objectives were to assess the association of plasma TNF with tumor response, the presence of immune-related adverse events and whether it is correlated to changes in circulating T cell subpopulations. Exploratory objectives were to monitor the pharmacodynamics of anti-PD-1 +/- anti-CTLA-4 on circulating immune cells and plasma cytokines to find putative biomarkers of response.

Population and treatments

All patients enrolled in MELANF α provided their written informed consent before study entry. Treatments were scheduled according to the standard dosing regimen described in the French summary of product characteristics (SPC) for each drug. Briefly, in the monotherapy group, patients were treated with nivolumab, either at 240 mg or 480 mg every 2 or 4 weeks, respectively, or with pembrolizumab at 2 mg/Kg every 3 weeks from September 2018 to February 2019. According to changes in the drug SPC, from February 2019 and on, patients treated with pembrolizumab received 200 mg or 400 mg flat dose every 3 or 4 weeks respectively. In the bitherapy group, patients received 1 mg/Kg of nivolumab and 3 mg/Kg of ipilimumab every 3 weeks for 4 infusions and then 240 mg or 480 mg of nivolumab every 2 or 4 weeks, respectively. Tumor responses were assessed between baseline (W0) and W12 using the RECIST 1.1 guidelines as primary criteria. Then, tumor status and/or survival status were collected every 3 months for a maximum of one year from the first infusion. Treatment-related adverse events (TRAEs) were graded according to the NCI Common Terminology Criteria for AE version V4.03. Blood samples were collected on EDTA at W0, W6 (or W8 for patients treated with pembrolizumab) and W12 after treatment initiation. Complete methods are available in the study protocol and the flowchart of the MELANF α study is shown in supplementary Fig S1.

Statistical analyses

The primary endpoint was the discrimination ability of changes in TNF plasma levels between baseline (W0) and week 12 (W12) visits to identify patients presenting non-progressive disease at W12. Discrimination ability was assessed by the area under the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve and its 95% confidence interval (Hanley method). Based on a rate of non-progression at W12 estimated between 30% and 40% in the literature, we determined that a sample of 60 patients would have allowed to estimate a 95% confidence interval (95% CI) of an area under the ROC curve (AUC) equal to 0.80 with a precision of +/-13.5%. More details are provided in the protocol of the study. Usual descriptive statistics were used to summarize patient characteristics, biomarkers at each time points, irAEs and response data on the overall population and by groups: median and range (min-max) for continuous variables and frequencies and percentages for qualitative variables. Paired continuous data were compared between visits (W0 versus W6 or W12) using the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test. Correlations between continuous data were assessed using Spearman's rank correlation test and comparisons between groups were performed using Mann-Whitney test. The progression-free survival (PFS) was calculated from the inclusion date and estimated using the Kaplan-Meier method. Changes at W12 (or W6) were defined as the ratio of the value at W12 (or W6) divided by the value at W0. All statistical tests were two-sided and a p-value <0.05 was considered significant. Statistical analyses were carried out using Stata software version 16 (College Station, TX, StataCorp LLC).

Data sharing

The anonymized derived data from this study that underlie the results reported in this article will be made available beginning 12 months and ending 5 years after this article's publication, to any investigator who signs a data access agreement and provide a methodologically sound proposal. Single cell RNAseq data and analysis script will be deposited on a password protected repository and made available after a period of 2 years starting from this article's publication.

Results

Patients' treatments and characteristics

Between September 2018 and November 2020, sixty patients with stage IIIc/IV melanoma have been enrolled. One patient who did not respect inclusion criteria was excluded from all analyses. Among the 59 patients analyzed, 34 patients were treated with monotherapy (nivolumab [n=21] or pembrolizumab [n=13]) and 25 with the bitherapy combining nivolumab and ipilimumab. Patient demographics and baseline characteristics are shown in Table 1.

The median age at inclusion in the monotherapy and bitherapy cohorts was 76 [range: 41-91] and 65 [range: 25-78] years, respectively (Table 1). Among patients diagnosed with stage IV melanoma, brain metastases were detected in 7 patients (31.8%) from the bitherapy cohort and 2 patients (6.9%) from the monotherapy cohort. Liver metastases were also detected in 8 patients (36.4%) from the bitherapy cohort and 4 patients (13.8%) from the monotherapy cohort. Of note, 18 (72%) and 13 (38.2%) patients from the bitherapy and monotherapy cohorts had a BRAFV600 mutation, respectively.

Outcome and safety assessment

Patient outcomes

Patients were followed over a median period of 11.7 months [95% CI: 11.4-11.9]. The median progression-free survival (PFS) was 5.6 months [95% CI: 2.8-not reached] for all patients (Fig 1A). In the monotherapy cohort, 11 of 34 (32.4%) patients achieved an objective response (OR) 12 weeks after treatment induction. This included one complete response (CR), and 10 partial responses (PR) (Table 1). In the bitherapy cohort, 7 of 25 patients (28%) developed a PR.

Safety assessment

Fifteen (44.1%) and 19 (76.0%) patients developed at least one treatment-related adverse event (TRAE) in the monotherapy and bitherapy cohort, respectively. The proportion of patients who developed at least one immune-related adverse event (irAE) was 38.2% in the monotherapy cohort and 56% in the bitherapy cohort, with a majority of gastrointestinal disorders (monotherapy: 5 of 34 patients [14.7%]; bitherapy: 3 of 25 patients [12%]) as well as skin and subcutaneous tissue disorders (monotherapy: 2 of 34 patients [5.9%]; bitherapy 5 of 25 patients [20%]) (Fig 1B and Supplementary table 3).

Plasma TNF monitoring and patient outcomes

Plasma TNF monitoring

We monitored TNF concentrations in patients' plasma prior to initiating the treatment (i.e., at W0) and along treatment at W6-8 (i.e., W6 for nivolumab-treated patients and W8 for pembrolizumab-treated patients) as well as at W12 (for all patients). Compared with concentrations measured at W0, TNF plasma levels were significantly increased at W6 ($p=0.0022$) and W12 ($p=0.0416$) when taking into account both cohorts ("All" patients: monotherapy + bitherapy) (Fig. 1C and D and Supplementary tables 4 and 5). When analyzed separately, we did observe a significant increase in TNF plasma levels in the monotherapy cohort between W0 and W6-8 ($p=0.0101$) as well as between W0 and W12 ($p=0.0366$). We also observed a trend towards an increase in TNF plasma concentrations in the bitherapy cohort between W0 and W6-8 ($p=0.0680$) but not between W0 and W12 ($p=0.4997$) (Fig. 1C-D and Supplementary tables 4 and 5). In parallel, we also assessed for IL6 and IFN γ plasma concentrations and did not detect any significant difference in their levels between W0 and W6-8 or W12 in both cohorts (Supplementary tables 4 and 5).

Plasma TNF and immune-related adverse events

irAEs, especially those related to colitis, may be treated with antibodies targeting TNF (16). Taking into account all patients, we detected a trend towards higher concentration of plasma TNF at W0 in patients who developed an irAE after treatment initiation (median [range]: 0.982 [0.180 - 5.451]) compared to patients without irAE (median [range]: 0.738 [0.304 - 1.938]) ($p=0.088$) (Supplementary table 6).

Plasma TNF and tumor response to ICI

Our primary endpoint was to determine whether changes in TNF plasma levels between W0 and W12 could discriminate patients whose disease had not progressed at W12 after ICI administration (Supplementary figure 1). The Receiver Operating Characteristic (ROC) curves displayed in Fig. 1E show that the W12/W0 ratio of TNF plasma levels did not allow to identify patients who did not progress at W12. Indeed, the area under the curve (AUC) is 0.568 (95% CI: 0.390-0.746) when taking into account all patients (monotherapy + bitherapy). For the monotherapy cohort, we obtained an AUC of 0.563 (95% CI: 0.343-0.784) and for the bitherapy cohort an AUC of 0.736 (95% CI: 0.496-0.977) (Fig. 1E and Supplementary table 7). Nevertheless, we detected lower TNF plasma concentrations at W12 in responder patients (CR/PR) (median [range]: 0.713 pg/ml [0.313-1.880]) compared to non-responders (stable disease [SD]/ progressive disease [PD]) (1.060 pg/ml [0.403-4.835]) ($p=0.0129$) when taking into account all patients (Fig. 1F). When the two cohorts were analyzed separately, a trend towards higher TNF plasma levels was also observed in SD/PD patients from the bitherapy cohort ($p=0.0562$) (Fig. 1F).

Monitoring circulating T cell responses and patient outcomes

CD4 T cell responses

As immunotherapies are used to boost anti-tumor immune responses, we investigated how the monotherapy and bitherapy modulated the phenotype and differentiation of patients' peripheral blood T cell subpopulations and whether this correlated with changes in TNF plasma levels.

Based on the differential expression of the CXCR3, CCR6 and CCR4 chemokine receptors (Fig 2A), we identified T helper 1 (Th1), Th2, Th17 or Th1/Th17CD4 T cells (20,21) and assessed for the impact the monotherapy and bitherapy have on the proportions and numbers of these cells in patients' blood.

Taking into account all patients, the proportions and absolute numbers of circulating Th1 cells were significantly increased at W6 and W12 (Fig 2B and Supplementary Fig S2A). After monotherapy treatment, we detected a significant, although low, increase in the proportions of circulating Th1 cells at W6 ($p=0.024$) but not at W12. This effect was more pronounced in the bitherapy cohort at both W6 and W12 in terms of proportions and absolute numbers (Fig 2B, supplementary Fig S2A and supplementary tables 8 and 9). Apart from a slight increase in the proportion (but not numbers) of circulating Th2 cells in the monotherapy cohort, we did not detect any effect of either therapy on the proportion and numbers of circulating Th17 and Th1/Th17 cells (Supplementary tables 8 and 9).

In this context, bitherapy-treated patients displaying CR or PR showed higher increases in absolute numbers of circulating Th1 cells between W0 and W6 ($p=0.0492$) (Fig 2C and Supplementary table 10 and 11). The evolution of Th1 cells between W0 and W12, however, was not associated with OR (Supplementary Fig. S2B). Finally, although Th1 cells are known producers of TNF, no correlation was identified between variations in the proportions and numbers of Th1 cells between W0 and W6 or W12 and changes in TNF plasma concentrations in bitherapy cohort (Supplementary Fig S3A-B and Supplementary tables 12 and 13).

We then assessed for naïve and memory CD4 T cell subpopulations based on their differential expression of CCR7 and CD45RA (20,21) (Fig. 2D). ICI-treated patients displayed significant decreases in the proportions of circulating naïve CD4 T cells between W0 and W6-8 or W12 as well as increases in the proportions (W0 to W6-8 and W12) and numbers (W0 to W6-8) of effector memory (CD45RA⁺CCR7⁻) CD4 T cells (CD4 EM) (Fig 2E and Supplementary tables 8 and 9). This was mostly driven by the bitherapy treatment in terms of percentages and numbers as no difference was detected for these parameters upon monotherapy at both time points (Fig 2E and Supplementary tables 8 and 9). The variation in proportions and numbers of CD4 EM T cells between W0 and W6 or W12 was however similar in SD/PD and CR/PR patients (Supplementary tables 10 and 11). Moreover, we found no correlation between the W6/W0 or W12/W0 ratios of proportions or numbers of CD4 EM T cells and the W6/W0 or W12/W0 ratios of TNF plasma concentrations (Supplementary tables 12 and 13). Finally, the proportion and numbers of the central memory (CD45RA⁻CCR7⁺) CD4 T cells (CD4 CM), were minimally impacted along therapy (Supplementary tables 8 and 9).

CD8 T cell responses

We also monitored naïve and memory CD8 T cell subpopulations (Fig. 3A). Considering all patients, we observed a significant decrease in the proportions of circulating naïve CD8 T cells at W6-8 and W12 following initiation treatment initiation (Supplementary tables 8 and 9). This was concomitant with a significant increase in the proportions of CD8 EM and a decrease in the proportions CD8 CM (Figs 3B and C). More than a remodeling of T cell subpopulations, we detected significant increases in the absolute numbers of circulating CD8 EM T cells between W0 and W6-8 or W12 (Supplementary Fig S4A-B and supplementary tables 8 and 9). These changes were almost exclusively associated with the bitherapy treatment as monotherapies did not impact these parameters when the two cohorts were analyzed separately (Fig 3B-C and Supplementary Fig S4A). Finally, absolute numbers of CD8 CM as well as proportions and numbers of CD45RA⁺ effector memory CD8 T cells (TEMRA) did not change between W0 and W6-8 or W12 (Supplementary Fig S4C-D, and supplementary tables 8 and 9).

We next asked whether the variations in circulating CD8 T cells observed upon immunotherapy could be related to response at W12. Considering all patients, proportions of circulating CD8 EM between W0 and W12, but not W6-8, were increased in SD/PD patients ($p=0.0358$, all patients) (Fig 4A). This difference was not observed when analyzing the monotherapy ($p=0.4201$) and bitherapy cohorts

($p=0.0593$) separately, although a trend could be seen in the latter (Fig 4A). Additionally, proportions of CD8 CM between W0 and W6-8, but not W12, were lower in SD/PD patients, compared to CR/PR patients ($p=0.0160$) (Fig 4B and Supplementary tables 10 and 11). This difference was conserved when analyzing the bitheraPy cohort separately ($p=0.0205$) but not in the monotherapy cohort ($p=0.3020$) (Fig 4B and Supplementary tables 10 and 11).

We then tested whether the variations in the proportions and numbers of CD8 EM and CD8 CM observed in bitheraPy-treated patients between W0 and W6-8 or W12 were related to changes in TNF plasma concentrations. Spearman-rank correlation analyses showed a partial positive correlation between changes in absolute numbers ($R^2=0.5386$; $p=0.0174$) as well as a trend for proportions ($R^2=0.4120$; $p=0.0710$) of CD8 EM T cells and TNF plasma levels between W0 and W6. We also observed a trend towards a correlation for these parameters between W0 and W12 (Supplementary Fig. S5A and supplementary tables 12 and 13). No correlation was identified between changes in the proportions or numbers of circulating CD8 CM and TNF plasma concentrations at any time point (Supplementary Fig. S5B and supplementary tables 12 and 13).

ScRNA Seq analyses

To evaluate the impact TNF signaling has on T cells, we performed CiteSeq 3' single cell RNA sequencing (CiteSeq scRNAseq) on W0 and W6 PBMC from 8 patients (4 PD; 1 CR, 3 PR) treated with bitheraPy. Single cells from all patients and all time points were analyzed using the Seurat R software package in a single batch. After principal component analysis, cell clustering was visualized as U-MAP and immune subtype annotation was performed using the study by Hao *et al.* (22). The identified CD4 T cells and CD8 T cells were then analyzed separately. CD4 T cells were subclustered into naïve, proliferating, EM, CTL (Cytotoxic T lymphocyte) and Treg (regulatory T cells) whereas CD8 T cells were subclustered into naïve, CM and EM (22) (Fig 5A). Data for protein expression on identified CD4 and CD8 subpopulations are shown in supplementary Fig. S6. Gene expression analysis on all samples showed that TNF expression in circulating CD4 and CD8 T cells was barely detectable and restricted to EM CD4 and CD8 T cells (Fig 5A). We then investigated whether CD4 and CD8 T cells showed evidence of TNF-mediated signal transduction. Pathway analysis using Progeny (23) showed the activation of a signature related to "TNF signaling" in CD4 CM, CD4 EM, CD8 CM and CD8 EM circulating T cells (Fig 5A). Interestingly, patients with PD displayed higher frequencies of CD4 and CD8 T cells expressing this "TNF signaling" signature at W6 compared to responders (Fig 5B). When monitoring the evolution of this parameter between W0 and W6, the proportion of CD8 expressing this signature was increased upon bitheraPy in PD patients (Fig 5B). Moreover, the expression intensity of this signature was significantly increased at W6 in naïve, CM and EM CD4 T cells as well as in naïve, CM and EM CD8 T cells from PD compared to CR/PR patients (Fig 5C). Longitudinal analysis between W0 and W6 showed that the intensity of this signature was significantly increased in naïve, CM and EM CD4 T cells as well as naïve, CM and especially EM CD8 T cells in PD patients (Supplementary figure S7). Conversely, it was slightly but significantly decreased in naïve, CM and EM CD4 T cells as well as naïve and CM CD8 T cells from CR/PR patients (Supplementary figure S7). We found no significant correlations between the changes of TNF plasma levels and the "TNF signaling" signature in CD8 T cells between W0 and W6 (Spearman $R=0.23$; $p=0.58$).

Overall, our results showed no association between the evolution of TNF plasma levels and the response of patients to ICI. However, higher TNF plasma concentrations were detected at W12 in non-responders. Changes in circulating T cell subpopulations were observed in patients treated with bitheraPy but not monotherapy. Decreased proportions of CD8 CM T cells and increased numbers of Th1 cells occurred in patients responding to bitheraPy, while increased proportions and numbers of

circulating CD8 EM T cells were seen in non-responders. In this context, a higher cell frequency with TNF signaling activity and higher intensity of this pathway in circulating CD8 and CD4 T cells after bitherapy initiation was detected in non-responders compared to responders (Fig 5D).

Discussion

In melanoma, studies aiming at identifying factors related to the response of patients to ICI have shown higher expression of TNF-related gene signatures in tumors from responder patients (24,25). This observation is however not surprising as the augmented *TNF* gene expression is concurrent to increased expression of IFN γ and T cell-related gene signatures (24). In this work, we detected an increase in TNF plasma concentrations upon ICI (nivolumab or pembrolizumab or ipilimumab+nivolumab) at W6-8 and W12 compared to W0, a phenomenon mainly related to data from the monotherapy cohort. In bitherapy-treated patients, only a trend was detected at W6 and no significant increase in TNF plasma levels was seen at W12 as compared to W0. One explanation for this finding could be the small number of patients included in the bitherapy cohort. Moreover, 5 out of 17 patients treated with ipilimumab + nivolumab prematurely stopped their treatment due to drug-related toxicity. Of those, 3 patients received systemic corticosteroid therapy to decrease the immune-related adverse events, which likely had a negative impact on TNF plasma levels and thus constitutes another bias in our analyses.

Upon ICI treatment, the evolution of TNF plasma levels between W0 and W12 did not predict a non-progressive disease at W12. However, when the ROC analysis was restricted to the bitherapy cohort, the AUC was 0.736 and did not reach statistical significance ($p=0.1019$), possibly due to the small number of patients included in this analysis ($n=17$). Interestingly, patients with SD/PD had higher TNF plasma concentrations than patients with CR/PR at W12. In these settings, higher TNF levels could reflect specific changes in blood cellularity over time and/or rather the onset of systemic inflammation related to poor physical condition of patients. We hence compared the impact the monotherapy and bitherapy have on the differentiation of circulating T cell subpopulations. Considering both cohorts, treatment with ICI increases the percentage and number of circulating CD4 EM and CD8 EM between W0 and W6 or W12. This effect is mainly induced during bitherapy since the separate analysis of both cohorts shows no significant remodeling of these populations in the monotherapy cohort. These results are consistent with the work from Fairfax BP et al showing a greater remodeling of CD8⁺ T cell transcriptional responses with anti-PD-1 + anti-CTLA-4 than with anti-PD-1 alone (3). Another study also showed that in melanoma patients, anti-CTLA-4 but not anti-PD-1 promotes the expansion of circulating CD8 T cells directed against melanoma antigens (26). Finally, the single targeting of CTLA-4 with ipilimumab was associated with increased numbers of CD4 and CD8 EM in the blood of stage III/IV melanoma patients (27).

We found that increased proportions of circulating CD8 EM between W0 and W12 were associated with SD/PD at W12. A corroborating observation was made in a cohort of late-stage melanoma patients, in which a decrease in the proportions of a circulating CD8 T cells was seen in CR/PR patients (28). The authors hypothesize that this decrease may be related to the efficient recruitment of CD8 EM in patients' tumors (28). Whether in our study, the circulating CD8 EM from SD/PD patients were defective in their ability to infiltrate melanoma tumors could not be evaluated due to the lack of accessibility to post-treatment tumor biopsies.

Metastatic melanoma patients treated with ipilimumab alone have been shown to display higher numbers of circulating CD8 CM (27). On the contrary, we found bitherapy treatment to be associated with a decrease in the percentages and numbers of circulating CD8 CM T cells. However, when separating patients according to their OR, we did detect increased percentages and a trend towards increased numbers of circulating CD8 CM in CR/PR patients at W6 compared to W0. Conversely, we detected a decrease in CD8 CM in patients with SD/PD. Whether an increase in circulating CD8 CM is a necessary step for optimal ICI efficacy remains to be determined. Nevertheless, an interesting study demonstrated that, on a per-cell basis, CD8 CM T cells exhibited superior anti-tumor capacities than CD8 EM in a murine melanoma model treated with adoptive T-cell transfer therapy (29).

Besides the impact ICI have on circulating CD8 T cells, treatment of patients with bitherapy was accompanied with increased proportions and numbers of circulating Th1-like (CXCR3⁺CCR6⁻) CD4 T cells at both W6 and W12. Of note, ipilimumab alone has previously been shown to increase the percentage of circulating CD4⁺CXCR3⁺T cells (27). In our study, this increase was also observed in the monotherapy cohort at W6 but not W12 and only at the percentage level. This suggests that anti-PD-1 alone might be minimally effective at promoting the differentiation of this cell population .

In the bitherapy cohort, CR/PR patients showed higher increases of Th1-like cells compared to SD/PD patients at W6 post-treatment initiation. Although little is known about the functional relevance that systemic fluctuations in this cell population may have on anti-tumor immune responses, one study did demonstrate that elevated levels of circulating anti-telomerase specific Th1 CD4 cells were associated with longer PFS and OS in immunotherapy-treated melanoma patients (30).

Overall, these results suggest that a remodeling of circulating T cell responses with increased Th1 and CD8 CM T cells at W6 is of good prognosis when treating patients with bitherapy. At this time point, the increased proportions and numbers of CD8 EM are not related to OR. However, persistence at W12 of high percentages of CD8 EM in bitherapy-treated patients rather reflects a defective response to treatment. In this context, changes in the number of CD8 EM, but not Th1 or CD8 CM T cells between W0 and W6, was correlated with that of TNF plasma levels upon bitherapy. A trend was also observed between W0 and W12. As our scRNAseq analyses suggest that CD8 EM are unlikely the cells which produce the most TNF in the blood, one might wonder whether these cells could indirectly participate to the modulation of TNF plasma levels after bitherapy treatment. Interestingly, a number of studies suggest that tissue-resident CD8 T cells can act as danger sensors and promote TNF production by myeloid cells (31). It is unclear whether CD8 EM T cells are more likely to promote this type of responses than CD8 CM and whether this effect can be translated to systemic immune/inflammatory responses.

To our knowledge, our current investigation shows for the first time that poor responders to bitherapy display higher levels of a signature related to sensing TNF signaling. Indeed, pathway analysis in circulating CD4 and CD8 T cells from these patients showed that these cells express a Progeny-derived signature related to "TNF signaling activity". The frequency of T cells expressing the "TNF signaling" signature as well as the expression intensity of this pathway were higher at W6 in PD compared with CR/PR patients. Interestingly, bitherapy treatment itself might influence these parameters as the expression intensity of the "TNF signalling" signature in T cells was increased in non-responders but not in responders between W0 and W6. This was especially observed in EM CD8 T cells, for which we also observed an increase in the percentage of cells expressing this signature after treatment initiation. Whether this phenomenon can be linked to the poor prognosis property of this cell populations remains to be determined. In CD8 T cells, the level of expression of the "TNF signaling" signature is not dependent on variations in TNF plasma concentrations between W6 and W0. These data suggest that

CD8 T cells from PD and CR/PR patients display molecular differences associated with a different ability to respond to TNF signals. Whether and how these molecular differences affect the phenotype of CD8 T cells, their functionality and ultimately their anti-tumor properties remain to be investigated.

Acknowledgments

We thank the patients who participated in this study; the clinical research staff, including all sub-investigators, nurses, clinical research associates, data managers, secretaries. We thank Bristol-Myers Squibb (BMS) for funding the clinical trial and part of the ancillary study. We thank Fondation ARC pour la recherche sur le cancer, Institut National du Cancer (INCa), Labex Toucan, Cancéropôle Grand Sud-Ouest (GSO) and Institut Universitaire du cancer Toulouse-Oncopole (IUCT-O), and Ligue Régionale contre le Cancer Midi Pyrénées for funding part of the ancillary study. This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under grant agreement No. 964264. We thank Fondation Toulouse Cancer Santé (FTCS) and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) for covering the salary supports of MV, SB and JM. This study has been partially supported through the grant EUR CARE N°ANR-18-EURE-0003 in the framework of the Programme des Investissements d'Avenir. We thank the CARE graduate school support for Mathieu Virazels and Matthieu Genais. We thank the technology cluster of the CRCT. We thank the Oncopole Claudius Regaud (OCR) members who contributed to the study setting and management.

Protocol

The full protocol of this trial is available.

Data sharing

Anonymized data that underlie the results reported in this Article will be made available beginning 12 months and ending 5 years after this Article's publication, to any investigators who sign a data access agreement and provide a methodologically sound proposal.

Author's contributions

MV, AM performed the experiments. MV, AM and BS wrote the paper. AL carried out the biostatistics and edited the paper. TF wrote the methodology of the clinical trial protocol and supervised the biostatistics. SB, CD and JM contributed to the experiments of the ancillary part. MG and VP performed the bioinformatic analyses. CP, VS, LM, OD, NM contributed to patient enrolment and clinical monitoring of patients. MA, NAA, and CC contributed to design the ancillary part and interpreted immunological data, and edited the paper. AF contributed to write the clinical protocol and edited the paper. BS and NM designed the clinical trial. BS and AM supervised the ancillary part. NM was the principal investigator.

References

1. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, *et al.* Long-Term Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab or Nivolumab Alone Versus Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol* 2022;**40**(2):127-37 doi 10.1200/JCO.21.02229.

2. Sharma P, Goswami S, Raychaudhuri D, Siddiqui BA, Singh P, Nagarajan A, *et al.* Immune checkpoint therapy-current perspectives and future directions. *Cell* 2023;**186**(8):1652-69 doi 10.1016/j.cell.2023.03.006.
3. Fairfax BP, Taylor CA, Watson RA, Nassiri I, Danielli S, Fang H, *et al.* Peripheral CD8(+) T cell characteristics associated with durable responses to immune checkpoint blockade in patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 2020;**26**(2):193-9 doi 10.1038/s41591-019-0734-6.
4. Long GV, Atkinson V, Lo S, Sandhu S, Guminski AD, Brown MP, *et al.* Combination nivolumab and ipilimumab or nivolumab alone in melanoma brain metastases: a multicentre randomised phase 2 study. *Lancet Oncol* 2018;**19**(5):672-81 doi 10.1016/S1470-2045(18)30139-6.
5. Sullivan RJ, Atkins MB, Kirkwood JM, Agarwala SS, Clark JI, Ernstoff MS, *et al.* An update on the Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumor immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma: version 2.0. *J Immunother Cancer* 2018;**6**(1):44 doi 10.1186/s40425-018-0362-6.
6. Livingstone E, Zimmer L, Hassel JC, Fluck M, Eigentler TK, Loquai C, *et al.* Adjuvant nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus placebo in patients with resected stage IV melanoma with no evidence of disease (IMMUNED): final results of a randomised, double-blind, phase 2 trial. *Lancet* 2022;**400**(10358):1117-29 doi 10.1016/S0140-6736(22)01654-3.
7. Menzies AM, Amaria RN, Rozeman EA, Huang AC, Tetzlaff MT, van de Wiel BA, *et al.* Pathological response and survival with neoadjuvant therapy in melanoma: a pooled analysis from the International Neoadjuvant Melanoma Consortium (INMC). *Nat Med* 2021;**27**(2):301-9 doi 10.1038/s41591-020-01188-3.
8. Hodi FS, Wolchok JD, Schadendorf D, Larkin J, Long GV, Qian X, *et al.* TMB and Inflammatory Gene Expression Associated with Clinical Outcomes following Immunotherapy in Advanced Melanoma. *Cancer Immunol Res* 2021;**9**(10):1202-13 doi 10.1158/2326-6066.CIR-20-0983.
9. Daud AI, Wolchok JD, Robert C, Hwu WJ, Weber JS, Ribas A, *et al.* Programmed Death-Ligand 1 Expression and Response to the Anti-Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma. *J Clin Oncol* 2016;**34**(34):4102-9 doi 10.1200/JCO.2016.67.2477.
10. Nishino M, Ramaiya NH, Hatabu H, Hodi FS. Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;**14**(11):655-68 doi 10.1038/nrclinonc.2017.88.
11. Propper DJ, Balkwill FR. Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2022;**19**(4):237-53 doi 10.1038/s41571-021-00588-9.
12. Montfort A, Colacios C, Levade T, Andrieu-Abadie N, Meyer N, Segui B. The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. *Front Immunol* 2019;**10**:1818 doi 10.3389/fimmu.2019.01818.
13. Chen AY, Wolchok JD, Bass AR. TNF in the era of immune checkpoint inhibitors: friend or foe? *Nat Rev Rheumatol* 2021;**17**(4):213-23 doi 10.1038/s41584-021-00584-4.
14. Bertrand F, Montfort A, Marcheteau E, Imbert C, Gilhodes J, Filleron T, *et al.* TNFalpha blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. *Nat Commun* 2017;**8**(1):2256 doi 10.1038/s41467-017-02358-7.
15. Perez-Ruiz E, Minute L, Otano I, Alvarez M, Ochoa MC, Belsue V, *et al.* Prophylactic TNF blockade uncouples efficacy and toxicity in dual CTLA-4 and PD-1 immunotherapy. *Nature* 2019;**569**(7756):428-32 doi 10.1038/s41586-019-1162-y.
16. Lesage C, Longvert C, Prey S, Maanaoui S, Dreno B, Mchet L, *et al.* Incidence and Clinical Impact of Anti-TNFalpha Treatment of Severe Immune Checkpoint Inhibitor-induced Colitis in Advanced Melanoma: The Mecolitis Survey. *J Immunother* 2019;**42**(5):175-9 doi 10.1097/CJI.000000000000268.
17. Badran YR, Cohen JV, Brastianos PK, Parikh AR, Hong TS, Dougan M. Concurrent therapy with immune checkpoint inhibitors and TNFalpha blockade in patients with gastrointestinal

- immune-related adverse events. *J Immunother Cancer* 2019;**7**(1):226 doi 10.1186/s40425-019-0711-0.
18. Verheijden RJ, May AM, Blank CU, Aarts MJB, van den Berkmortel F, van den Eertwegh AJM, *et al.* Association of Anti-TNF with Decreased Survival in Steroid Refractory Ipilimumab and Anti-PD1-Treated Patients in the Dutch Melanoma Treatment Registry. *Clin Cancer Res* 2020;**26**(9):2268-74 doi 10.1158/1078-0432.CCR-19-3322.
 19. Montfort A, Filleron T, Virazels M, Dufau C, Milhes J, Pages C, *et al.* Combining Nivolumab and Ipilimumab with Infliximab or Certolizumab in Patients with Advanced Melanoma: First Results of a Phase Ib Clinical Trial. *Clin Cancer Res* 2021;**27**(4):1037-47 doi 10.1158/1078-0432.CCR-20-3449.
 20. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, *et al.* Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007;**8**(6):639-46 doi 10.1038/ni1467.
 21. Sallusto F, Kremmer E, Palermo B, Hoy A, Ponath P, Qin S, *et al.* Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *Eur J Immunol* 1999;**29**(6):2037-45 doi 10.1002/(SICI)1521-4141(199906)29:06<2037::AID-IMMU2037>3.0.CO;2-V.
 22. Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, Mauck WM, 3rd, Zheng S, Butler A, *et al.* Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* 2021;**184**(13):3573-87 e29 doi 10.1016/j.cell.2021.04.048.
 23. Schubert M, Klinger B, Klunemann M, Sieber A, Uhlitz F, Sauer S, *et al.* Perturbation-response genes reveal signaling footprints in cancer gene expression. *Nat Commun* 2018;**9**(1):20 doi 10.1038/s41467-017-02391-6.
 24. Grasso CS, Tsoi J, Onyshchenko M, Abril-Rodriguez G, Ross-Macdonald P, Wind-Rotolo M, *et al.* Conserved Interferon-gamma Signaling Drives Clinical Response to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Melanoma. *Cancer Cell* 2020;**38**(4):500-15 e3 doi 10.1016/j.ccell.2020.08.005.
 25. Vredevoogd DW, Kuilman T, Ligtenberg MA, Boshuizen J, Stecker KE, de Bruijn B, *et al.* Augmenting Immunotherapy Impact by Lowering Tumor TNF Cytotoxicity Threshold. *Cell* 2019;**178**(3):585-99 e15 doi 10.1016/j.cell.2019.06.014.
 26. Gangaev A, Rozeman EA, Rohaan MW, Isaeva OI, Philips D, Patiwaal S, *et al.* Differential effects of PD-1 and CTLA-4 blockade on the melanoma-reactive CD8 T cell response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021;**118**(43) doi 10.1073/pnas.2102849118.
 27. Felix J, Lambert J, Roelens M, Maubec E, Guermouche H, Pages C, *et al.* Ipilimumab reshapes T cell memory subsets in melanoma patients with clinical response. *Oncoimmunology* 2016;**5**(7):1136045 doi 10.1080/2162402X.2015.1136045.
 28. Wistuba-Hamprecht K, Martens A, Heubach F, Romano E, Geukes Foppen M, Yuan J, *et al.* Peripheral CD8 effector-memory type 1 T-cells correlate with outcome in ipilimumab-treated stage IV melanoma patients. *Eur J Cancer* 2017;**73**:61-70 doi 10.1016/j.ejca.2016.12.011.
 29. Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, Kerstann K, Cardones AR, Finkelstein SE, *et al.* Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**(27):9571-6 doi 10.1073/pnas.0503726102.
 30. Nardin C, Laheurte C, Puzenat E, Boullerot L, Ramseyer M, Marguier A, *et al.* Naturally Occurring Telomerase-Specific CD4 T-Cell Immunity in Melanoma. *J Invest Dermatol* 2022;**142**(2):435-44 doi 10.1016/j.jid.2021.07.160.
 31. Lauvau G, Boutet M, Williams TM, Chin SS, Chorro L. Memory CD8(+) T Cells: Innate-Like Sensors and Orchestrators of Protection. *Trends Immunol* 2016;**37**(6):375-85 doi 10.1016/j.it.2016.04.001.

Table and Figures

Table 1. Patients' characteristics and outcomes in all patients analyzed (n=59)

| | All patients (n=59) N (%) | Nivolumab or pembrolizumab (n=34) N (%) | Nivolumab + ipilimumab (n=25) N (%) |
|--|--|--|--|
| Sex (N=59) | | | |
| Male | 33 (55.9%) | 23 (67.6%) | 10 (40.0%) |
| Female | 26 (44.1%) | 11 (32.4%) | 15 (60.0%) |
| Age at inclusion (N=59) | | | |
| Median | 71 | 76 | 65 |
| Range | (25-91) | (41-91) | (25-78) |
| ECOG performance status (N=59) | | | |
| 0 or 1 | 52 (88.1%) | 28 (82.4%) | 24 (96.0%) |
| >1 | 7 (11.9%) | 6 (17.6%) | 1 (4.0%) |
| LDH at baseline (N=59) | | | |
| Normal | 16 (27.1%) | 13 (38.2%) | 3 (12.0%) |
| 1-2 *N | 34 (57.6%) | 19 (55.9%) | 15 (60.0%) |
| >2 *N | 9 (15.3%) | 2 (5.9%) | 7 (28.0%) |
| AJCC stage at baseline (N=59) | | | |
| Stage IIIc | 8 (13.6%) | 5 (14.7%) | 3 (12.0%) |
| Stage IV | 51 (86.4%) | 29 (85.3%) | 22 (88.0%) |
| Number of metastatic sites^u (N=51) | | | |
| 1 site | 16 (31.4%) | 12 (41.4%) | 4 (18.2%) |
| 2 sites | 16 (31.4%) | 10 (34.5%) | 6 (27.3%) |
| 3 sites | 13 (25.5%) | 5 (17.2%) | 8 (36.4%) |
| 4 sites | 2 (3.9%) | 2 (6.9%) | 0 (0.0%) |
| 5 sites | 1 (2.0%) | 0 (0.0%) | 1 (4.5%) |
| 6 sites | 3 (5.9%) | 0 (0.0%) | 3 (13.6%) |
| Brain metastasis^u (N=51) | | | |
| Yes | 9 (17.6%) | 2 (6.9%) | 7 (31.8%) |
| No | 42 (82.4%) | 27 (93.1%) | 15 (68.2%) |
| Liver metastasis^u (N=51) | | | |
| Yes | 12 (23.5%) | 4 (13.8%) | 8 (36.4%) |
| No | 39 (76.5%) | 25 (86.2%) | 14 (63.6%) |
| BRAFV600 (N=59) | | | |
| Unmutated | 28 (47.5%) | 21 (61.8%) | 7 (28.0%) |
| Mutated | 31 (52.5%) | 13 (38.2%) | 18 (72.0%) |
| Non-progression at week 12 (N=59) | | | |
| Yes | 33 (55.9%) | 23 (67.7%) | 10 (40.0%) |
| No | 25 (42.4%) | 11 (32.3%) | 14 (56.0%) |
| NE* | 1 (1.7%) | 0 (0.0%) | 1 (4.0%) |
| Overall response at week 12 (N=59) | | | |

| | | | |
|-----|------------|------------|------------|
| CR | 1 (1.7%) | 1 (2.9%) | 0 (0%) |
| PR | 17 (28.8%) | 10 (29.4%) | 7 (28.0%) |
| SD | 12 (20.3%) | 10 (29.4%) | 2 (8.0%) |
| PD | 25 (42.4%) | 11 (32.4%) | 14 (56.0%) |
| NE# | 4 (6.8%) | 2 (5.9%) | 2 (8.0%) |

: if metastatic disease

*One patient received a new therapy before the first tumor assessment (TA)

#One patient received a new therapy before the first TA, one had a TA at W12 non-evaluative and two did not perform the TA at W12

CR: complete response, PR: partial response, SD: Stable disease, PD: progressive disease, NE: not evaluative.

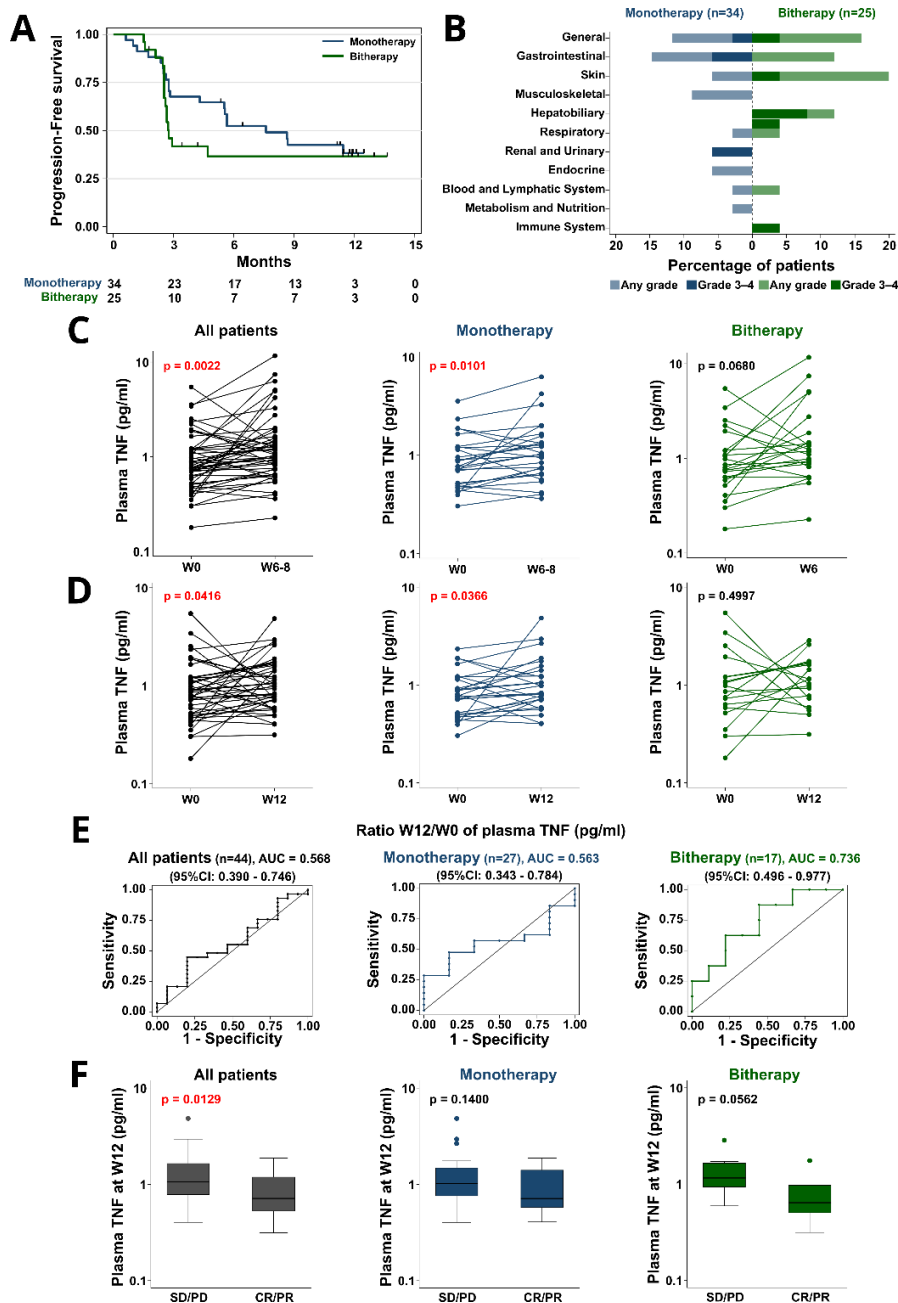


Figure 1. TNF plasma levels and clinical response at week 12 upon ICI. **A**, Kaplan-Meier curves for progression-free survival. Patients were followed for a median of 11.7 months (95%CI, 11.4-11.9). Tick marks indicate censored data. **B**, Incidence of Immune-related adverse events (irAEs). Proportions of patients exhibiting irAEs are represented by system organ in monotherapy or bithery cohort. Blue: monotherapy, green: bithery. Light colors: any grade, dark colors: grade 3 or 4 AEs. **C and D**, TNF concentrations (pg/mL) measured in the plasma of patients between baseline (W0) and week 6-8 (W6-8) [W6, nivolumab and nivolumab+ipilimumab]; [W8, pembrolizumab]) (C) or week 12 (W12) (D) after treatment induction. *P*-values were calculated using Wilcoxon matched-pairs signed-rank test. **E**, The area under the receiver operating characteristic (ROC) curves (AUC) evaluating whether the evolution of TNF plasma levels between W0 and W12 (W12/W0 ratio of TNF plasma concentration) can identify patients presenting non-progressive disease at week 12 (primary endpoint). **F**, TNF plasma concentrations measured at week 12 according to overall response at week 12. SD/PD: non-responder patients presenting stable disease (SD) or progressive disease (PD), and CR/PR: responder patients presenting complete (CR) or partial response (PR). All patient: SD/PD (n=27), CR/PR (n=16); monotherapy: SD/PD (n=16), CR/PR (n=10); bithery: SD/PD (n=11), CR/PR (n=6). *P*-values were calculated using Mann-Whitney test. **C-F**, Left panels: all patients; middle: monotherapy; right: bithery.

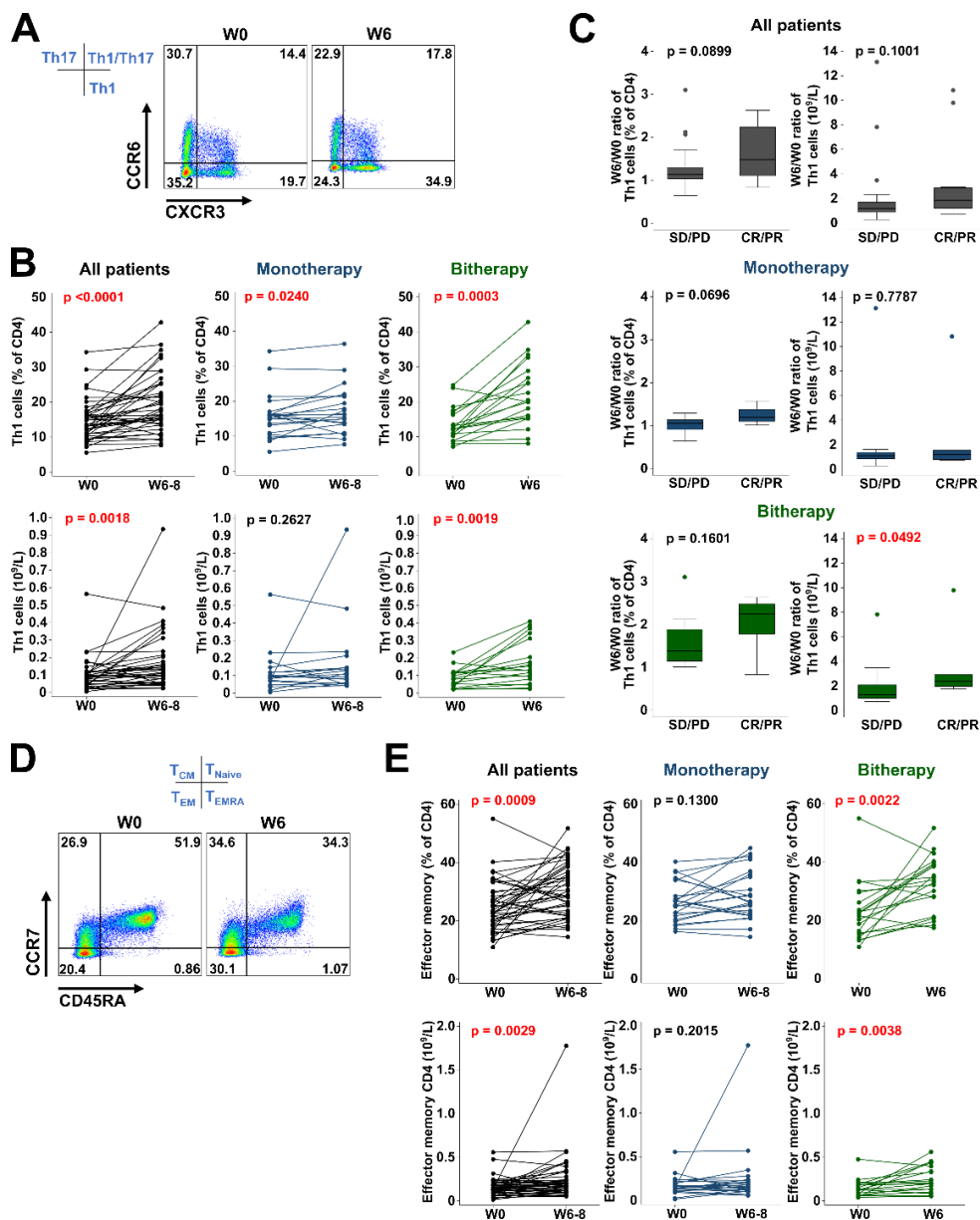


Figure 2. The evolution of CD4 T cells and its impact on patients' objective response. Proportions of circulating CD4⁺ T cells were evaluated by flow cytometry in the peripheral blood at baseline (W0) and week 6-8 (W6-8 [W6, nivolumab and nivolumab+ipilimumab]; [W8, pembrolizumab]). Absolute numbers were extrapolated from the cell blood counts obtained at each time point. Patients' responses were assessed at W12. Non-responding: SD/PD; Responding: PR/CR; SD: stable disease; PD: progressive disease; CR: complete response; PR: partial response. **A**, Representative dot plots of flow cytometry staining for T helper subpopulations of CD4 T cells. **B**, Proportions (upper panels) and absolute numbers (lower panels) of circulating Th1 cells (CXCR3⁺CCR6⁺) were assessed by flow cytometry at W0, W6-8 following treatment initiation. Left panel: all patients; middle: monotherapy (nivolumab or pembrolizumab); right: bithery (nivolumab + ipilimumab). *P*-values were calculated using Wilcoxon matched-pairs signed-rank test. **C**, W6/W0 ratios of percentages (left) and absolute numbers (right) of Th1 cells among CD4⁺ T cells according to patients' response. *P*-values were calculated using Mann-Whitney test. **D**, Representative dot plots of flow cytometry staining for central memory (CM, CCR7⁺CD45RA⁻) and effector memory (EM, CCR7⁻CD45RA⁺) CD4 T cells. **E**, Proportions (upper panels) and absolute numbers (lower panels) of circulating EM CD4 T cells were assessed by flow cytometry between W0 and W6-8 following treatment initiation. Left panel: all patients; middle: monotherapy (nivolumab or pembrolizumab); right: bithery (nivolumab + ipilimumab). *P*-values were calculated using Wilcoxon matched-pairs signed-rank test.

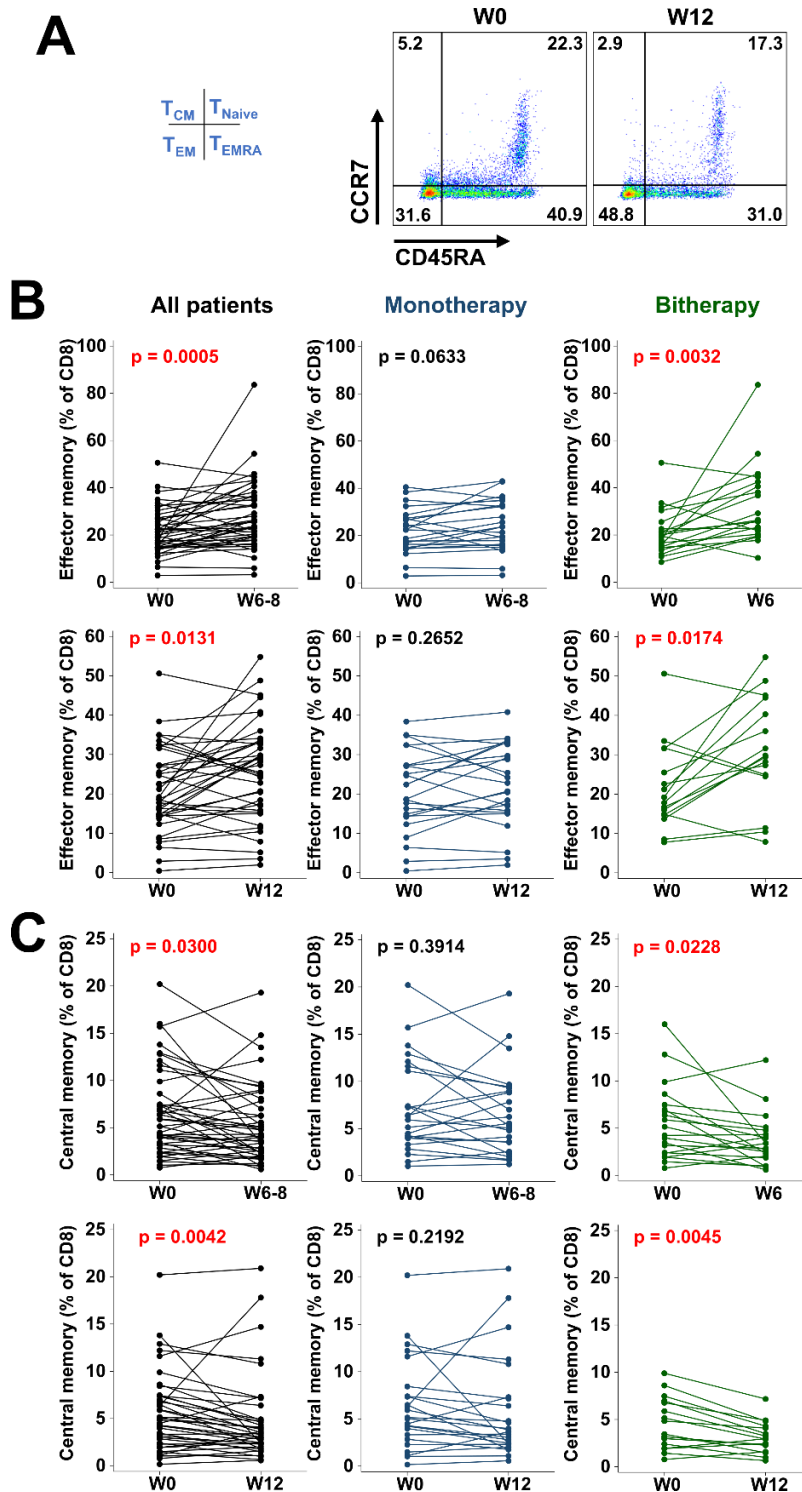


Figure 3. Bithery is the main treatment associated with increased proportions of circulating effector memory CD8 T cells and decreased proportions of central memory CD8 T cells. Proportions of circulating CD8⁺ T cells were evaluated by flow cytometry in the peripheral blood at baseline (W0) and week 6-8 (W6-8 [W6, nivolumab and nivolumab+ipilimumab]; [W8, pembrolizumab]) or week 12 (W12). **A**, Representative flow cytometry plots depicting the evolution of CD8 T cells subpopulations between W0 and W12; central memory (CM, CCR7⁺CD45RA⁻) and effector memory (EM, CCR7⁻CD45RA⁺) CD8 T cells. **B and C**, Proportions of circulating EM (B) and CM (C) CD8 T cells were assessed by flow cytometry between W0 and W6/8 (upper panels) or W12 (lower panels) following treatment initiation. Left panel: all patients; middle: monotherapy (nivolumab or pembrolizumab); right: bithery (nivolumab + ipilimumab). *P*-values were calculated using Wilcoxon matched-pairs signed-rank test.

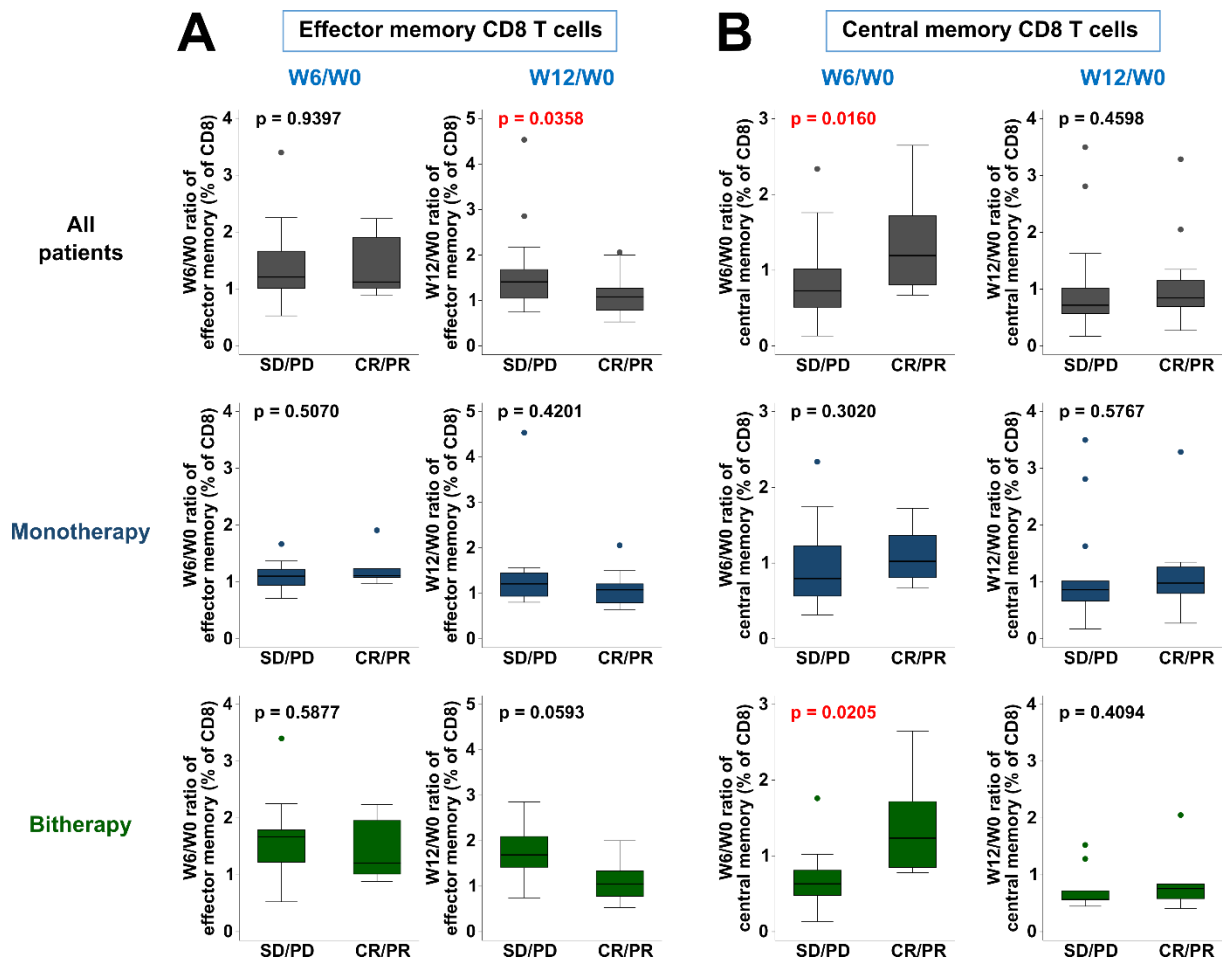


Figure 4. The evolution of circulating effector and central memory CD8 T cells is linked to prognosis. Proportions of circulating effector memory (EM, CCR7⁻CD45RA⁺) and central memory (CM, CCR7⁺CD45RA⁺) CD8 T cells were evaluated by flow cytometry in the peripheral blood at baseline (W0), week 6 or 8 (W6-8 [W6, nivolumab and nivolumab+ipilimumab]; [W8, pembrolizumab]) and week 12 (W12) after treatment induction. Patients' responses were assessed at W12. *P*-values were calculated using Mann-Whitney test. **A**, W6-8/W0 (left) or W12/W0 (right) ratios of the percentage of EM among total CD8⁺ T cells in SD/PD and CR/PR patients. **B**, W6/W0 (left) or W12/W0 (right) ratios of the percentages of CM among total CD8⁺ T cells in SD/PD and CR/PR patients.

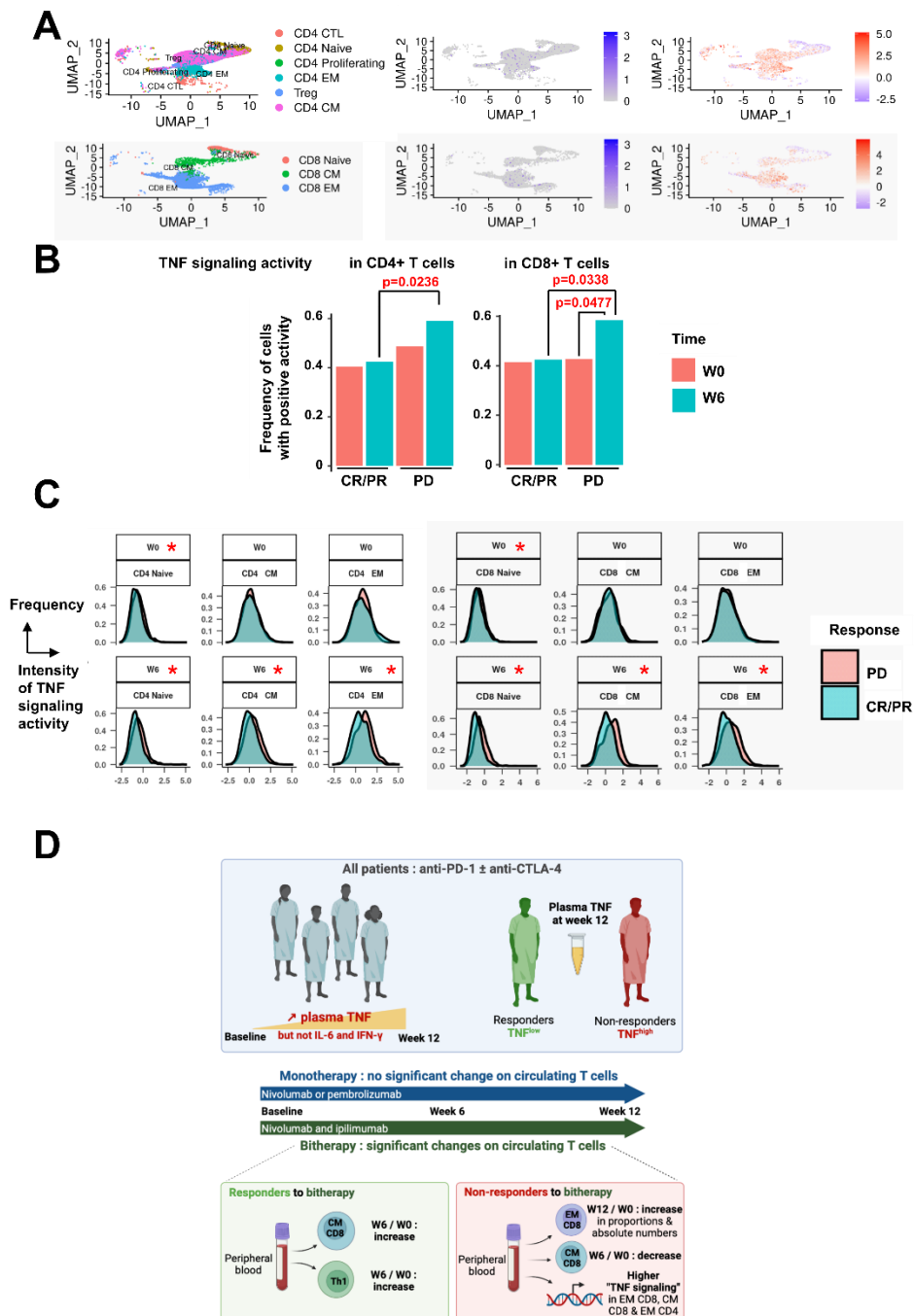


Figure 5: TNF signaling activity is higher in T cells of bithersy-treated patients with progressive disease. Peripheral blood mononuclear cells taken at W0 and W6 from 8 bithersy-treated patients (4 patients with progressive disease [PD]; 1 patient with complete response [CR], 3 patients with partial response [PR]) were analyzed by CiteSeq 3' single cell RNA sequencing. **A**, Uniform manifold approximation and projection (UMAP) of scRNA-seq profiles of circulating T cell subpopulations (left panels), TNF gene expression (middle panels) and "TNF signaling activity" inferred by progeny (right panels). Upper and lower panels correspond to CD4 and CD8 T cells, respectively. **B**, Frequencies of CD4 (left panel) and CD8 (right panel) T cells characterized as being positive for the "TNF signaling activity" shown in A (positive means scaled and centered activity above 0) at W0 and W6 in PD and CR/PR patients. Statistical analyses: Chi². **C**, Intensity of the "TNF signaling" signature in naive, central memory (CM) and effector memory (EM) T cells at W0 and W6 in patients with progressive disease [PD] (red histograms), complete response [CR] or partial response [PR] (blue histograms) (*, $p < 0.0001$; Wilcoxon test). **D**, Schematic summary of our findings.

Supplementary Methods

Flow cytometry

Fresh blood, drawn at W0, W6 and W12, was incubated with antibodies directed against markers of CD4 and CD8 T cell subpopulations for 30 minutes (Supplementary Table 1). Red blood cells were then lysed using the BD Pharm Lyse 10× buffer (BD Biosciences). Remaining immune cells were stained for 30 minutes in a PBS solution containing a fixable viability dye (Zombie NIR, BioLegend) and fixed for 10 minutes in a 2% formal saline solution. Samples were acquired using an LSR-Fortessa X-20 cytometer (BD Biosciences). Data have been analyzed using the FlowJo 10 software.

Plasma cytokine assessment

Plasmas were prepared within 2 hours after collecting patients' blood and frozen at -80°C until use. IFN γ , TNF and IL6 levels were assessed on plasma by the Evotec company (Toulouse, France) using the Meso Scale Discovery technology.

CITE-seq staining of Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

PBMC were isolated from W0 and W6 fresh blood (collected on EDTA) on Ficoll-Paque (Thermo Fisher Scientific) gradient. PBMC were frozen in liquid nitrogen until use and analyses were performed on thawed cells. PBMC were incubated for 10 minutes at 4°C with Human TruStain FcX Fc blocking reagent (Biolegend) in Cell Staining Buffer (Biolegend). Then, barcoded TotalSeq-A antibodies (Biolegend) (Supplementary Table 2) diluted in Cell Staining Buffer were added for 30 minutes at 4°C . Cells were then washed and resuspended in cooled 1X PBS before filtration using a $40\mu\text{m}$ strainer (Falcon) before CiteSeq single cell RNA sequencing.

Single-cell RNA-sequencing

Droplet-based single-cell libraries (3' gene expression and antibody-derived tag fractions) were generated using Chromium Instruments and Chromium Single Cell 3' Library & Gel Bead Kit v3 according to the manufacturer's protocol (10× Genomics and Biolegend). For each sample, the same number of cells ($n=15000$) was injected. Library size and quality were confirmed on Fragment analyzer (Agilent Technologies). KAPA quantification kit for Illumina platforms (KAPA Biosystems, Roche) was used to quantify library by qPCR. The libraries were sequenced on a NextSeq 550 (Illumina) or a NovaSeq 6000 (Illumina) in paired end sequencing 28 bp (read1) \times 91 bp (read2) and 8bp single index. Sequencing expected depth is 20000 reads/cell minimum for 3' gene expression library and 5000 reads/cell for cell surface protein library.

Bioinformatic analyses

Single cells from all patients and time points were analyzed using the Seurat R package as a single batch. After principal component analysis (PCA), cell clusters and immune subtype identification was performed using the multimodal PBMC reference dataset characterized in Hao *et al.* (1). TNF signaling activity was inferred using the progeny database (2) as described in the decoupler R package and following work from Holland *et al* (3).

Supplementary tables

Supplementary table 1. Antibodies for flow cytometry.

| Target | Clone | Dye | Company |
|------------|----------|-----------------|---------------|
| CD3 | UCHT1 | BV421 | Biolegend |
| CD3 | UCHT1 | APC | Biolegend |
| CD4 | SK3 | BUV496 | BD Bioscience |
| CD8 | RPA-T8 | BUV395 | BD Bioscience |
| CD45RA | HI-100 | Alexa fluor 488 | Biolegend |
| CCR7 | G043H7 | PE-Cy7 | Biolegend |
| CXCR3 | G025H7 | BV711 | Biolegend |
| CCR6 | G034E3 | BV605 | Biolegend |
| CCR4 | L291H4 | BV421 | Biolegend |
| PD-1 | EH12.2H7 | BV711 | Biolegend |
| Zombie NIR | na | APC-Cy7 | Biolegend |

Supplementary table 2. Antibodies for CiteSeq single cell RNA sequencing

| Target | Clone | Barcode_ID | Barcode | Reference | Company |
|--------|---------|------------|-----------------|-----------|-----------|
| CD3 | UCHT1 | A0034 | CTCATTGTAACCTCT | 300475 | Biolegend |
| CD8 | RPA-T8 | A0080 | GCTGCGCTTTCCATT | 301067 | Biolegend |
| CD4 | SK3 | A0045 | GAGGTTAGTGATGGA | 344649 | Biolegend |
| CD45RA | HI100 | A0063 | TCAATCCTTCCGCTT | 304157 | Biolegend |
| HLA-DR | L243 | A0159 | AATAGCGAGCAAGTA | 307659 | Biolegend |
| CD62L | DREG-56 | A0147 | GTCCCTGCAACTTGA | 304847 | Biolegend |

Supplementary table 3. Immune-related adverse events.

| | All patients N = 59 | | Monotherapy N = 34 | | Bitherapy N = 25 | |
|--|------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | All N (%) | Grade 3-4 N (%) | All N (%) | Grade 3-4 N (%) | All N (%) | Grade 3-4 N (%) |
| At least one immune-related AE | 27 (45.8%) | 9 (15.3%) | 13 (38.2%) | 4 (11.8%) | 14 (56.0%) | 5 (20.0%) |
| Gastrointestinal disorders | 8 (13.6%) | 2 (3.4%) | 5 (14.7%) | 2 (5.9%) | 3 (12.0%) | 0 (0.0%) |
| General disorders and administration site conditions | 8 (13.6%) | 2 (3.4%) | 4 (11.8%) | 1 (2.9%) | 4 (16.0%) | 1 (4.0%) |
| Skin and subcutaneous tissue disorders | 7 (11.9%) | 1 (1.7%) | 2 (5.9%) | 0 (0.0%) | 5 (20.0%) | 1 (4.0%) |
| Hepatobiliary disorders | 3 (5.1%) | 2 (3.4%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) | 3 (12.0%) | 2 (8.0%) |
| Musculoskeletal and connective tissue disorders | 3 (5.1%) | 0 (0.0%) | 3 (8.8%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) |
| Blood and lymphatic system disorders | 2 (3.4%) | 0 (0.0%) | 1 (2.9%) | 0 (0.0%) | 1 (4.0%) | 0 (0.0%) |
| Endocrine disorders | 2 (3.4%) | 0 (0.0%) | 2 (5.9%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) |
| Renal and urinary disorders | 2 (3.4%) | 2 (3.4%) | 2 (5.9%) | 2 (5.9%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) |
| Respiratory, thoracic and mediastinal disorders | 2 (3.4%) | 1 (1.7%) | 1 (2.9%) | 0 (0.0%) | 1 (4.0%) | 1 (4.0%) |
| Immune system disorders | 1 (1.7%) | 1 (1.7%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) | 1 (4.0%) | 1 (4.0%) |
| Metabolism and nutrition disorders | 1 (1.7%) | 0 (0.0%) | 1 (2.9%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) |

Supplementary table 4. Evolution of Plasma cytokines between W0 and W6 in patients' plasma

| | All patients (N=51) | p value | Monotherapy (N =28) | p value | Bitherapy (N=23) | p value |
|---------------------------------------|------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|---------------------|------------|
| TNF (pg/ml) | | | | | | |
| Week 0 | 0.769 | | 0.765 | | 0.801 | |
| (Range) | (0.180: 5.451) | | (0.304: 3.544) | | (0.180: 5.451) | |
| Week 6 | 1.053 | p = 0.0022 | 1.027 | p = 0.0101 | 1.179 | p = 0.0680 |
| (Range) | (0.226:11.662) | | (0.361: 6.275) | | (0.226:11.662) | |
| IL6 (pg/ml) | | | | | | |
| Week 0 | 1.243 | | 1.106 | | 1.609 | |
| (Range) | (0.000:23.836) | | (0.418: 7.445) | | (0.000:23.836) | |
| Week 6 | 1.478 | p = 0.8002 | 1.310 | p = 0.1109 | 1.989 | p = 0.2735 |
| (Range) | (0.239:21.316) | | (0.348:20.859) | | (0.239:21.316) | |
| IFNγ (pg/ml) | | | | | | |
| Week 0 | 5.769 | | 4.980 | | 6.505 | |
| (Range) | (0.314:212.359) | | (1.291:76.711) | | (0.314:212.359) | |
| Week 6 | 7.419 | p = 0.2769 | 6.620 | p = 0.1648 | 7.607 | p = 0.8078 |
| (Range) | (2.171:411.969) | | (2.171:33.574) | | (3.231:411.969) | |

Supplementary table 5. Evolution of Plasma cytokines monitoring between W0 and W12 in patients' plasma

| | All patients (N=45) | p value | Monotherapy (N =27) | p value | Bitherapy (N=18) | p value |
|---------------------------------------|------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|---------------------|------------|
| TNF (pg/ml) | | | | | | |
| Week 0 | 0.804 | | 0.769 | | 0.920 | |
| (Range) | (0.180: 5.451) | | (0.304: 2.335) | | (0.180: 5.451) | |
| Week 12 | 0.981 | p = 0.0416 | 0.830 | p = 0.0366 | 1.087 | p = 0.4997 |
| (Range) | (0.313: 4.835) | | (0.403: 4.835) | | (0.313: 2.852) | |
| IL6 (pg/ml) | | | | | | |
| Week 0 | 1.284 | | 1.117 | | 1.710 | |
| (Range) | (0.000:23.836) | | (0.418:21.963) | | (0.000:23.836) | |
| Week 12 | 1.488 | p = 0.7995 | 1.074 | p = 0.8101 | 1.868 | p = 0.5862 |
| (Range) | (0.314: 9.932) | | (0.314: 8.813) | | (0.326: 9.932) | |
| IFNγ (pg/ml) | | | | | | |
| Week 0 | 5.951 | | 5.769 | | 5.962 | |
| (Range) | (0.314:212.359) | | (1.291:76.711) | | (0.314:212.359) | |
| Week 12 | 5.745 | p = 0.7648 | 5.490 | p = 0.5806 | 6.339 | p = 0.9133 |
| (Range) | (1.910:1825.500) | | (1.931:44.191) | | (1.910:1825.500) | |

Supplementary table 6. Association between TNF concentration at W0 and immune-related adverse events in all patients analyzed (n=59).

| | Median (Range) | | p value |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| | At least one IrAE | No IrAE | |
| All patients (N) | N = 27 | N = 32 | 0.0884 |
| Plasma TNF [pg/ml] (Range) | 0.982 (0.180 - 5.451) | 0.738 (0.304 - 1.938) | |
| Monotherapy | N = 13 | N = 21 | 0.0994 |
| Plasma TNF [pg/ml] (Range) | 0.869 (0.394 - 3.544) | 0.711 (0.304 - 1.879) | |
| Bitherapy | N = 14 | N = 11 | 0.5112 |
| Plasma TNF [pg/ml] (Range) | 1.065 (0.180-5.451) | 0.765 (0.407 - 1.938) | |

Supplementary table 7. Association between TNF changes from W0 to W12 and non-progression at week 12 in patients evaluable for the primary endpoint.

| Ratio W12/W0 of plasma TNF | Non-progression at W12 | | | |
|----------------------------|------------------------|---------------|------------|-----------------------|
| | No | Yes | p value | AUC [95% CI] |
| All Patients | N = 15 | N = 29 | p = 0.4651 | 0.568 [0.390; 0.746] |
| Median | 1.22 | 1.19 | | |
| (Range) | (0.30: 8.01) | (0.13: 12.26) | | |
| Monotherapy | N = 6 | N= 21 | p = 0.6408 | 0.563 [0.343; 0.784] |
| Median | 1.17 | 1.21 | | |
| (Range) | (0.60: 1.62) | (0.50: 12.26) | | |
| Bitherapy | N = 9 | N = 8 | p = 0.1019 | 0.736 [0.496; 0.977] |
| Median | 1.36 | 0.95 | | |
| (Range) | (0.30: 8.01) | (0.13: 1.66) | | |

Supplementary table 8. Evolution of CD4 and CD8 T cell subpopulation between W0 and W6 upon ICI in patients' blood.

| | W0 | W6 | p value |
|--|----------------------|----------------------|-------------------|
| Naive CD8 (% of CD8) | | | |
| All patients (N=44) | | | |
| Median (Range) | 26.9 (6.6: 76.0) | 22.9 (6.2: 71.3) | p = 0.0038 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 23.0 (11.8: 48.2) | 22.6 (10.1: 53.2) | p = 0.4928 |
| Bitherapy (N=20) | | | |
| Median (Range) | 34.8 (6.6: 76.0) | 22.9 (6.2: 71.3) | p = 0.0045 |
| Naive CD8 (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=42) | | | |
| Median (Range) | 0.051 (0.005: 0.311) | 0.054 (0.007: 0.408) | p = 0.2526 |
| Monotherapy (N=23) | | | |
| Median (Range) | 0.047 (0.005: 0.198) | 0.055 (0.007: 0.408) | p = 0.4654 |
| Bitherapy (N=19) | | | |
| Median (Range) | 0.055 (0.009: 0.311) | 0.042 (0.007: 0.193) | p = 0.2954 |
| Effector memory CD8 (% of CD8) | | | |
| All patients (N=44) | | | |
| Median (Range) | 19.9 (2.9: 50.6) | 25.6 (3.2: 83.6) | p = 0.0005 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 22.4 (2.9: 40.5) | 23.7 (3.2: 43.0) | p = 0.0633 |
| Bitherapy (N=20) | | | |
| Median (Range) | 19.4 (8.5: 50.6) | 26.3 (10.3: 83.6) | p = 0.0032 |
| Effector memory CD8 (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=42) | | | |
| Median (Range) | 0.035 (0.001: 0.204) | 0.051 (0.005: 0.568) | p = 0.0052 |
| Monotherapy (N=23) | | | |
| Median (Range) | 0.038 (0.001: 0.204) | 0.048 (0.005: 0.568) | p = 0.9032 |
| Bitherapy (N=19) | | | |
| Median (Range) | 0.032 (0.011: 0.106) | 0.059 (0.012: 0.249) | p = 0.0005 |
| Central memory (% of CD8) | | | |
| All patients (N=44) | | | |
| Median (Range) | 5.5 (0.8: 20.2) | 4.1 (0.6: 19.3) | p = 0.0300 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 6.1 (1.0: 20.2) | 5.4 (1.2: 19.3) | p = 0.3914 |
| Bitherapy (N=20) | | | |
| Median (Range) | 4.7 (0.8: 16.0) | 3.1 (0.6: 12.2) | p = 0.0228 |
| Central memory CD8 (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=42) | | | |
| Median (Range) | 0.009 (0.000: 0.071) | 0.008 (0.001: 0.146) | p = 0.1671 |
| Monotherapy (N=23) | | | |
| Median (Range) | 0.014 (0.000: 0.054) | 0.011 (0.002: 0.146) | p = 0.2735 |
| Bitherapy (N=19) | | | |
| Median (Range) | 0.006 (0.001: 0.071) | 0.005 (0.001: 0.075) | p = 0.4445 |
| CD8 effector memory CD45RA⁺ [TEMRA] (% of CD8) | | | |
| All patients (N=44) | | | |
| Median (Range) | 42.7 (8.7: 72.0) | 40.0 (4.3: 77.0) | p = 0.8336 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 44.2 (19.3: 72.0) | 42.0 (19.8: 77.0) | p = 0.7533 |
| Bitherapy (N=20) | | | |
| Median (Range) | 41.5 (8.7: 62.8) | 38.3 (4.3: 59.2) | p = 0.9108 |
| CD8 effector memory CD45RA⁺ [TEMRA] (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=42) | | | |
| Median (Range) | 0.056 (0.010: 0.691) | 0.074 (0.007: 0.901) | p = 0.4569 |
| Monotherapy (N=23) | | | |
| Median (Range) | 0.092 (0.010: 0.691) | 0.073 (0.014: 0.901) | p = 0.9757 |
| Bitherapy (N=19) | | | |

| | | | |
|--|----------------------|----------------------|-------------------|
| Median (Range) | 0.052 (0.019: 0.332) | 0.074 (0.007: 0.286) | p = 0.1978 |
| Naive CD4 (% of CD4) | | | |
| All patients (N=44) | | | |
| Median (Range) | 38.8 (11.0: 60.1) | 31.6 (9.5: 64.0) | p = 0.0318 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 34.3 (11.0: 60.1) | 32.3 (9.5: 60.4) | p = 0.9772 |
| Bitherapy (N=20) | | | |
| Median (Range) | 48.0 (13.0: 60.0) | 30.4 (17.3: 64.0) | p = 0.0145 |
| Naive CD4 (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=42) | | | |
| Median (Range) | 0.228 (0.012: 0.889) | 0.198 (0.048: 4.384) | p = 0.2089 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 0.216 (0.012: 0.453) | 0.171 (0.048: 4.384) | p = 0.4291 |
| Bitherapy (N=19) | | | |
| Median (Range) | 0.276 (0.015: 0.889) | 0.248 (0.078: 0.611) | p = 0.1978 |
| Effector memory CD4 (% of CD4) | | | |
| All patients (N=44) | | | |
| Median (Range) | 23.2 (10.9: 55.0) | 28.7 (14.4: 51.7) | p = 0.0009 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 25.3 (16.2: 40.2) | 26.3 (14.4: 44.9) | p = 0.1300 |
| Bitherapy (N=20) | | | |
| Median (Range) | 21.9 (10.9: 55.0) | 33.5 (17.4: 51.7) | p = 0.0022 |
| Effector memory CD4 (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=42) | | | |
| Median (Range) | 0.139 (0.015: 0.557) | 0.186 (0.053: 1.776) | p = 0.0029 |
| Monotherapy (N=23) | | | |
| Median (Range) | 0.143 (0.015: 0.557) | 0.164 (0.056: 1.776) | p = 0.2015 |
| Bitherapy (N=19) | | | |
| Median (Range) | 0.128 (0.040: 0.477) | 0.205 (0.053: 0.561) | p = 0.0038 |
| Central memory CD4 (% of CD4) | | | |
| All patients (N=44) | | | |
| Median (Range) | 33.4 (16.7: 51.3) | 31.2 (14.9: 52.9) | p = 0.0178 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 36.9 (17.7: 51.3) | 34.0 (15.8: 48.9) | p = 0.0206 |
| Bitherapy (N=20) | | | |
| Median (Range) | 32.5 (16.7: 49.8) | 30.7 (14.9: 52.9) | p = 0.2958 |
| Central memory CD4 (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=42) | | | |
| Median (Range) | 0.207 (0.020: 0.702) | 0.198 (0.038: 2.256) | p = 0.9551 |
| Monotherapy (N=23) | | | |
| Median (Range) | 0.219 (0.020: 0.702) | 0.193 (0.072: 2.256) | p = 0.4470 |
| Bitherapy (N=19) | | | |
| Median (Range) | 0.201 (0.032: 0.585) | 0.203 (0.038: 0.749) | p = 0.4445 |
| CD4 effector memory CD45RA⁺ [TEMRA] (% of CD4) | | | |
| All patients (N=44) | | | |
| Median (Range) | 1.7 (0.2: 13.2) | 1.8 (0.7: 13.4) | p = 0.2293 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 1.8 (0.4: 13.2) | 2.5 (0.7: 13.4) | p = 0.0975 |
| Bitherapy (N=20) | | | |
| Median (Range) | 1.3 (0.2: 5.1) | 1.3 (0.8: 4.2) | p = 0.8228 |
| CD4 effector memory CD45RA⁺ [TEMRA] (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=42) | | | |
| Median (Range) | 0.011 (0.000: 0.204) | 0.013 (0.001: 0.178) | p = 0.6937 |
| Monotherapy (N=23) | | | |
| Median (Range) | 0.012 (0.000: 0.204) | 0.013 (0.003: 0.178) | p = 0.7380 |
| Bitherapy (N=19) | | | |
| Median (Range) | 0.010 (0.002: 0.038) | 0.011 (0.001: 0.036) | p = 0.8721 |
| T helper 1 [Th1] (% of CD4) | | | |
| All patients (N=42) | | | |

| | | | |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|
| Median (Range) | 13.6 (5.5: 34.3) | 17.6 (7.6: 42.8) | p < 0.0001 |
| Monotherapy (N=22) | | | |
| Median (Range) | 15.6 (5.5: 34.3) | 15.8 (7.6: 36.4) | p = 0.0240 |
| Bitherapy (N=20) | | | |
| Median (Range) | 12.3 (7.2: 24.8) | 20.3 (8.0: 42.8) | p = 0.0003 |
| T helper 1 [Th1] (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=39) | | | |
| Median (Range) | 0.091 (0.005: 0.564) | 0.116 (0.023: 0.935) | p = 0.0018 |
| Monotherapy (N=20) | | | |
| Median (Range) | 0.091 (0.005: 0.564) | 0.100 (0.041: 0.935) | p = 0.2627 |
| Bitherapy (N=19) | | | |
| Median (Range) | 0.083 (0.021: 0.232) | 0.131 (0.023: 0.409) | p = 0.0019 |
| T helper 2 [Th2] (% of CD4) | | | |
| All patients (N=42) | | | |
| Median (Range) | 7.9 (4.3: 17.8) | 8.1 (3.1: 22.8) | p = 0.1180 |
| Monotherapy (N=22) | | | |
| Median (Range) | 8.3 (4.3: 17.8) | 7.6 (3.1: 22.8) | p = 0.1578 |
| Bitherapy (N=20) | | | |
| Median (Range) | 7.9 (4.9: 13.9) | 8.4 (4.5: 14.5) | p = 0.2873 |
| T helper 2 [Th2] (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=39) | | | |
| Median (Range) | 0.053 (0.007: 0.131) | 0.061 (0.011: 1.064) | p = 0.2247 |
| Monotherapy (N=20) | | | |
| Median (Range) | 0.054 (0.007: 0.128) | 0.059 (0.018: 1.064) | p = 0.5755 |
| Bitherapy (N=19) | | | |
| Median (Range) | 0.053 (0.007: 0.131) | 0.061 (0.011: 0.195) | p = 0.2432 |
| T helper 17 [Th17] (% of CD4) | | | |
| All patients (N=42) | | | |
| Median (Range) | 13.9 (3.5: 29.7) | 13.0 (3.5: 29.3) | p = 0.1418 |
| Monotherapy (N=22) | | | |
| Median (Range) | 13.7 (3.5: 29.7) | 12.9 (6.8: 29.3) | p = 0.2490 |
| Bitherapy (N=20) | | | |
| Median (Range) | 14.0 (7.1: 28.2) | 13.0 (3.5: 21.5) | p = 0.2959 |
| T helper 17 [Th17] (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=39) | | | |
| Median (Range) | 0.088 (0.009: 0.276) | 0.082 (0.023: 1.261) | p = 0.8890 |
| Monotherapy (N=20) | | | |
| Median (Range) | 0.094 (0.009: 0.276) | 0.083 (0.039: 1.261) | p = 0.5755 |
| Bitherapy (N=19) | | | |
| Median (Range) | 0.088 (0.024: 0.209) | 0.080 (0.023: 0.309) | p = 0.6874 |
| T helper 1/17 [Th1/17] (% of CD4) | | | |
| All patients (N=42) | | | |
| Median (Range) | 16.0 (3.2: 31.4) | 13.1 (4.7: 27.2) | p = 0.0616 |
| Monotherapy (N=22) | | | |
| Median (Range) | 17.5 (3.2: 24.4) | 14.9 (5.4: 24.8) | p = 0.0534 |
| Bitherapy (N=20) | | | |
| Median (Range) | 11.6 (6.4: 31.4) | 11.1 (4.7: 27.2) | p = 0.3507 |
| T helper 1/17 [Th1/17] (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=39) | | | |
| Median (Range) | 0.085 (0.008: 0.447) | 0.082 (0.014: 0.461) | p = 0.8017 |
| Monotherapy (N=20) | | | |
| Median (Range) | 0.100 (0.008: 0.401) | 0.082 (0.028: 0.461) | p = 0.6542 |
| Bitherapy (N=19) | | | |
| Median (Range) | 0.072 (0.025: 0.447) | 0.082 (0.014: 0.348) | p = 0.8721 |

Supplementary table 9. Evolution of CD4 and CD8 T cell subpopulation between W0 and W12 upon ICI in patients' blood

| | W0 | W12 | p value |
|--|----------------------|----------------------|-------------------|
| Naive CD8 (% of CD8) | | | |
| All patients (N=40) | | | |
| Median (Range) | 26.9 (6.6: 76.0) | 22.4 (7.8: 70.6) | p = 0.0006 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 24.6 (11.6: 61.2) | 21.8 (8.7: 61.0) | p = 0.0633 |
| Bitherapy (N=16) | | | |
| Median (Range) | 33.9 (6.6: 76.0) | 22.9 (7.8: 70.6) | p = 0.0027 |
| Naive CD8 (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=39) | | | |
| Median (Range) | 0.048 (0.005: 0.311) | 0.049 (0.013: 0.874) | p = 0.3150 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 0.048 (0.005: 0.198) | 0.049 (0.013: 0.874) | p = 0.2301 |
| Bitherapy (N=15) | | | |
| Median (Range) | 0.055 (0.009: 0.311) | 0.053 (0.020: 0.288) | p = 0.6909 |
| Effector memory CD8 (% of CD8) | | | |
| All patients (N=40) | | | |
| Median (Range) | 19.0 (0.4: 50.6) | 26.3 (2.0: 54.8) | p = 0.0131 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 20.6 (0.4: 38.4) | 21.8 (2.0: 40.8) | p = 0.2652 |
| Bitherapy (N=16) | | | |
| Median (Range) | 18.5 (7.8: 50.6) | 29.6 (7.9: 54.8) | p = 0.0174 |
| Effector memory CD8 (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=39) | | | |
| Median (Range) | 0.035 (0.000: 0.204) | 0.050 (0.002: 0.503) | p = 0.0152 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 0.050 (0.000: 0.204) | 0.044 (0.002: 0.503) | p = 0.9317 |
| Bitherapy (N=15) | | | |
| Median (Range) | 0.032 (0.011: 0.106) | 0.069 (0.024: 0.143) | p = 0.0008 |
| Central memory (% of CD8) | | | |
| All patients (N=40) | | | |
| Median (Range) | 4.9 (0.2: 20.2) | 3.3 (0.6: 20.9) | p = 0.0042 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 5.1 (0.2: 20.2) | 3.8 (0.6: 20.9) | p = 0.2192 |
| Bitherapy (N=16) | | | |
| Median (Range) | 4.1 (0.8: 9.9) | 2.9 (0.6: 7.2) | p = 0.0045 |
| Central memory CD8 (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=39) | | | |
| Median (Range) | 0.008 (0.000: 0.071) | 0.008 (0.000: 0.084) | p = 0.2356 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 0.013 (0.000: 0.054) | 0.010 (0.000: 0.084) | p = 0.4576 |
| Bitherapy (N=15) | | | |
| Median (Range) | 0.008 (0.001: 0.071) | 0.006 (0.001: 0.035) | p = 0.3942 |
| CD8 effector memory CD45RA⁺ [TEMRA] (% of CD8) | | | |
| All patients (N=40) | | | |
| Median (Range) | 44.2 (8.7: 78.3) | 45.0 (12.0: 81.3) | p = 0.4597 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 45.4 (15.2: 78.3) | 45.8 (25.6: 81.3) | p = 0.5872 |
| Bitherapy (N=16) | | | |
| Median (Range) | 43.7 (8.7 : 53.0) | 45.0 (12.0 : 59.4) | p = 0.5694 |
| CD8 effector memory CD45RA⁺ [TEMRA] (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=39) | | | |
| Median (Range) | 0.092 (0.005: 0.691) | 0.091 (0.020: 1.003) | p = 0.3644 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 0.101 (0.005: 0.691) | 0.095 (0.022: 1.003) | p = 0.9317 |
| Bitherapy (N=15) | | | |
| Median (Range) | 0.063 (0.019: 0.332) | 0.072 (0.020: 0.261) | p = 0.1728 |

| | | | |
|--|----------------------|----------------------|-------------------|
| Naive CD4 (% of CD4) | | | |
| All patients (N=40) | | | |
| Median (Range) | 38.2 (11.0: 60.1) | 33.4 (9.7: 60.0) | p = 0.0343 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 32.5 (11.0: 60.1) | 32.5 (9.7: 60.0) | p = 0.6170 |
| Bitherapy (N=16) | | | |
| Median (Range) | 48.4 (13.0: 60.0) | 37.7 (16.5: 56.5) | p = 0.0340 |
| Naive CD4 (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=39) | | | |
| Median (Range) | 0.210 (0.012: 0.889) | 0.207 (0.044: 1.044) | p = 0.9777 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 0.172 (0.012: 0.453) | 0.182 (0.044: 1.044) | p = 0.6071 |
| Bitherapy (N=15) | | | |
| Median (Range) | 0.322 (0.015: 0.889) | 0.230 (0.072: 0.855) | p = 0.4603 |
| Effector memory CD4 (% of CD4) | | | |
| All patients (N=40) | | | |
| Median (Range) | 23.9 (10.9: 55.0) | 27.7 (10.9: 47.1) | p = 0.0505 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 26.1 (14.4: 41.2) | 26.5 (10.9: 47.1) | p = 0.9317 |
| Bitherapy (N=16) | | | |
| Median (Range) | 20.9 (10.9: 55.0) | 30.6 (16.3: 46.9) | p = 0.0174 |
| Effector memory CD4 (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=39) | | | |
| Median (Range) | 0.143 (0.015: 0.557) | 0.180 (0.046: 2.255) | p = 0.1116 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 0.148 (0.015: 0.557) | 0.150 (0.046: 2.255) | p = 0.9772 |
| Bitherapy (N=15) | | | |
| Median (Range) | 0.128 (0.044: 0.477) | 0.200 (0.089: 0.530) | p = 0.0231 |
| Central memory CD4 (% of CD4) | | | |
| All patients (N=40) | | | |
| Median (Range) | 32.0 (8.7: 51.3) | 33.5 (7.6: 55.1) | p = 0.4396 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 32.8 (8.7: 51.3) | 33.9 (7.6: 55.1) | p = 0.5677 |
| Bitherapy (N=16) | | | |
| Median (Range) | 31.0 (16.7: 49.8) | 32.4 (10.9: 48.0) | p = 0.7960 |
| Central memory CD4 (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=39) | | | |
| Median (Range) | 0.201 (0.020: 0.702) | 0.197 (0.032: 1.530) | p = 0.8780 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 0.198 (0.020: 0.702) | 0.196 (0.032: 1.530) | p = 0.7971 |
| Bitherapy (N=15) | | | |
| Median (Range) | 0.201 (0.032: 0.585) | 0.256 (0.034: 0.441) | p = 0.7333 |
| CD4 effector memory CD45RA⁺ [TEMRA] (% of CD4) | | | |
| All patients (N=40) | | | |
| Median (Range) | 1.9 (0.2: 60.6) | 2.2 (0.3: 62.4) | p = 0.1357 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 2.2 (0.6: 60.6) | 2.6 (0.6: 62.4) | p = 0.1229 |
| Bitherapy (N=16) | | | |
| Median (Range) | 1.2 (0.2: 5.1) | 1.7 (0.3: 3.9) | p = 0.6791 |
| CD4 effector memory CD45RA⁺ [TEMRA] (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=39) | | | |
| Median (Range) | 0.010 (0.000: 0.224) | 0.012 (0.002: 0.265) | p = 0.1248 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 0.013 (0.000: 0.224) | 0.015 (0.002: 0.265) | p = 0.1888 |
| Bitherapy (N=15) | | | |
| Median (Range) | 0.009 (0.002: 0.038) | 0.011 (0.003: 0.074) | p = 0.4265 |
| T helper 1 [Th1] (% of CD4) | | | |
| All patients (N=39) | | | |
| Median (Range) | 13.6 (5.5: 34.3) | 16.5 (4.3: 33.3) | p = 0.0026 |

| | | | |
|--|----------------------|----------------------|-------------------|
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 15.3 (5.5: 34.3) | 16.4 (4.3: 30.6) | p = 0.2301 |
| Bitherapy (N=15) | | | |
| Median (Range) | 12.2 (7.2: 24.0) | 18.0 (9.5: 33.3) | p = 0.0054 |
| T helper 1 [Th1] (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=38) | | | |
| Median (Range) | 0.090 (0.005: 0.564) | 0.096 (0.018: 0.780) | p = 0.0446 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 0.086 (0.005: 0.564) | 0.089 (0.018: 0.780) | p = 0.6682 |
| Bitherapy (N=14) | | | |
| Median (Range) | 0.098 (0.021: 0.232) | 0.139 (0.044: 0.419) | p = 0.0076 |
| T helper 2 [Th2] (% of CD4) | | | |
| All patients (N=39) | | | |
| Median (Range) | 7.9 (0.8: 17.8) | 8.7 (0.7: 17.5) | p = 0.0229 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 8.3 (0.8: 17.8) | 8.6 (0.7: 17.2) | p = 0.0487 |
| Bitherapy (N=15) | | | |
| Median (Range) | 7.0 (4.9: 13.9) | 9.1 (4.7: 17.5) | p = 0.1398 |
| T helper 2 [Th2] (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=38) | | | |
| Median (Range) | 0.051 (0.003: 0.131) | 0.053 (0.003: 0.677) | p = 0.1090 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 0.048 (0.003: 0.128) | 0.053 (0.003: 0.677) | p = 0.5872 |
| Bitherapy (N=14) | | | |
| Median (Range) | 0.057 (0.007: 0.131) | 0.063 (0.016: 0.189) | p = 0.0640 |
| T helper 17 [Th17] (% of CD4) | | | |
| All patients (N=39) | | | |
| Median (Range) | 14.6 (5.8: 29.7) | 14.3 (5.9: 28.4) | p = 0.5625 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 14.7 (5.8: 29.7) | 13.7 (5.9: 28.4) | p = 0.3383 |
| Bitherapy (N=15) | | | |
| Median (Range) | 14.6 (9.9: 28.2) | 14.4 (6.3: 24.0) | p = 0.9095 |
| T helper 17 [Th17] (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=38) | | | |
| Median (Range) | 0.088 (0.009: 0.276) | 0.089 (0.025: 1.191) | p = 0.6794 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 0.088 (0.009: 0.276) | 0.083 (0.025: 1.191) | p = 0.5677 |
| Bitherapy (N=14) | | | |
| Median (Range) | 0.091 (0.024: 0.209) | 0.105 (0.035: 0.307) | p = 0.2455 |
| T helper 1/17 [Th1/17] (% of CD4) | | | |
| All patients (N=39) | | | |
| Median (Range) | 15.3 (5.7: 31.4) | 13.8 (5.1: 28.0) | p = 0.1132 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 17.1 (5.7: 24.4) | 15.7 (5.1: 26.2) | p = 0.0864 |
| Bitherapy (N=15) | | | |
| Median (Range) | 11.7 (6.4: 31.4) | 12.4 (6.7: 28.0) | p = 0.4603 |
| T helper 1/17 [Th1/17] (10⁹/L) | | | |
| All patients (N=38) | | | |
| Median (Range) | 0.089 (0.008: 0.447) | 0.082 (0.022: 0.941) | p = 0.7552 |
| Monotherapy (N=24) | | | |
| Median (Range) | 0.100 (0.008: 0.401) | 0.070 (0.022: 0.941) | p = 0.3758 |
| Bitherapy (N=14) | | | |
| Median (Range) | 0.068 (0.028: 0.447) | 0.092 (0.025: 0.214) | p = 0.7776 |

Supplementary table 10. Association between changes in circulating immune cells subpopulations from W0 to W6 and objective response at W12.

| | SD/PD | CR/PR | p value |
|--|--------------------|--------------------|-------------------|
| Ratio W6/W0 of CD8 EM (% of CD8) | | | |
| All patients | N=29 | N=11 | |
| Median (Range) | 1.21 (0.53: 3.40) | 1.12 (0.88: 2.24) | p = 0.9397 |
| Monotherapy | N=16 | N=6 | |
| Median (Range) | 1.10 (0.71: 1.67) | 1.11 (0.97: 1.91) | p = 0.5070 |
| Bitherapy | N=13 | N=5 | |
| Median (Range) | 1.67 (0.53: 3.40) | 1.20 (0.88: 2.24) | p = 0.5877 |
| Ratio W6/W0 of CD8 EM (10⁹/L) | | | |
| All patients | N=28 | N=11 | |
| Median (Range) | 1.19 (0.58: 16.18) | 1.11 (0.80: 8.65) | p = 0.7788 |
| Monotherapy | N=15 | N=6 | |
| Median (Range) | 0.95 (0.58: 16.18) | 1.01 (0.80: 8.65) | p = 0.5334 |
| Bitherapy | N=13 | N=5 | |
| Median (Range) | 1.70 (0.73: 8.58) | 1.41 (1.03: 7.93) | p = 0.6573 |
| Ratio W6/W0 of CD8 CM (% of CD8) | | | |
| All patients | N=29 | N=11 | |
| Median (Range) | 0.73 (0.13: 2.34) | 1.19 (0.67: 2.65) | p = 0.0160 |
| Monotherapy | N=16 | N=6 | |
| Median (Range) | 0.80 (0.32: 2.34) | 1.02 (0.67: 1.72) | p = 0.3020 |
| Bitherapy | N=13 | N=5 | |
| Median (Range) | 0.63 (0.13: 1.76) | 1.23 (0.78: 2.65) | p = 0.0205 |
| Ratio W6/W0 of CD8 CM (10⁹/L) | | | |
| All patients | N=28 | N=11 | |
| Median (Range) | 0.88 (0.12: 10.79) | 1.05 (0.61: 9.38) | p = 0.0981 |
| Monotherapy | N=15 | N=6 | |
| Median (Range) | 0.90 (0.16: 10.79) | 0.86 (0.61: 9.38) | p = 0.6404 |
| Bitherapy | N=13 | N=5 | |
| Median (Range) | 0.83 (0.12: 1.92) | 1.20 (0.93: 4.25) | p = 0.0682 |
| Ratio W6/W0 of CD4 EM (% of CD4) | | | |
| All patients | N=29 | N=11 | |
| Median (Range) | 1.17 (0.77: 4.08) | 1.16 (0.78: 2.51) | p = 0.8677 |
| Monotherapy | N=16 | N=6 | |
| Median (Range) | 1.11 (0.77: 1.69) | 1.16 (0.85: 1.32) | p = 0.6058 |
| Bitherapy | N=13 | N=5 | |
| Median (Range) | 1.47 (0.81: 4.08) | 1.54 (0.78: 2.51) | p = 0.8054 |
| Ratio W6/W0 of CD4 EM (10⁹/L) | | | |
| All patients | N=28 | N=11 | |
| Median (Range) | 1.24 (0.34: 12.86) | 1.26 (0.67: 6.96) | p = 0.6849 |
| Monotherapy | N=15 | N=6 | |
| Median (Range) | 1.04 (0.34: 12.86) | 1.11 (0.67: 6.96) | p = 0.9379 |
| Bitherapy | N=13 | N=5 | |
| Median (Range) | 1.36 (0.66: 10.30) | 2.67 (0.83: 6.78) | p = 0.5217 |
| Ratio W6/W0 of Th1 cells (% of CD4) | | | |
| All patients | N=26 | N=12 | |
| Median (Range) | 1.13 (0.65: 3.10) | 1.48 (0.83: 2.63) | p = 0.0899 |
| Monotherapy | N=14 | N=6 | |
| Median (Range) | 1.05 (0.65: 1.29) | 1.19 (1.01: 1.58) | p = 0.0696 |
| Bitherapy | N=12 | N=6 | |
| Median (Range) | 1.38 (1.01: 3.10) | 2.24 (0.83: 2.63) | p = 0.1601 |
| Ratio W6/W0 of Th1 cells (10⁹/L) | | | |
| All patients | N=24 | N=12 | |
| Median (Range) | 1.17 (0.26: 13.12) | 1.85 (0.74: 10.82) | p = 0.1001 |
| Monotherapy | N=12 | N=6 | |
| Median (Range) | 1.10 (0.26: 13.12) | 1.19 (0.74: 10.82) | p = 0.7787 |
| Bitherapy | N=12 | N=6 | |
| Median (Range) | 1.29 (0.73: 7.83) | 2.38 (1.76: 9.79) | p = 0.0492 |

Supplementary table 11. Association between changes in circulating immune cell subpopulations from W0 to W12 and objective response at W12.

| | SD/PD | CR/PR | p value |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| Ratio W12/W0 of CD8 EM (% of CD8) | | | |
| All patients | N = 22 | N = 16 | |
| Median (Range) | 1.41 (0.74: 4.53) | 1.08 (0.53: 2.06) | p = 0.0358 |
| Monotherapy | N = 13 | N = 10 | |
| Median (Range) | 1.21 (0.80: 4.53) | 1.08 (0.64: 2.06) | p = 0.4201 |
| Bitherapy | N = 9 | N = 6 | |
| Median (Range) | 1.69 (0.74: 2.85) | 1.05 (0.53: 2.00) | p = 0.0593 |
| Ratio W12/W0 of CD8 EM (10⁹/L) | | | |
| All patients | N = 22 | N = 15 | |
| Median (Range) | 1.28 (0.60: 9.53) | 1.50 (0.50: 4.84) | p = 0.4578 |
| Monotherapy | N = 13 | N = 10 | |
| Median (Range) | 0.89 (0.60: 9.53) | 1.39 (0.50: 4.84) | p = 0.3853 |
| Bitherapy | N = 9 | N = 5 | |
| Median (Range) | 1.46 (0.76: 4.60) | 1.50 (1.18: 2.75) | p = 0.9469 |
| Ratio W12/W0 of CD8 CM (% of CD8) | | | |
| All patients | N = 22 | N = 16 | |
| Median (Range) | 0.72 (0.17: 3.50) | 0.85 (0.27: 3.29) | p = 0.4598 |
| Monotherapy | N = 13 | N = 10 | |
| Median (Range) | 0.86 (0.17: 3.50) | 0.98 (0.27: 3.29) | p = 0.5767 |
| Bitherapy | N = 9 | N = 6 | |
| Median (Range) | 0.57 (0.45: 1.53) | 0.76 (0.41: 2.05) | p = 0.4094 |
| Ratio W12/W0 of CD8 CM (10⁹/L) | | | |
| All patients | N = 22 | N = 15 | |
| Median (Range) | 0.73 (0.17: 7.11) | 1.30 (0.25: 4.18) | p = 0.1219 |
| Monotherapy | N = 13 | N = 10 | |
| Median (Range) | 0.77 (0.17: 7.11) | 1.40 (0.25: 4.18) | p = 0.2917 |
| Bitherapy | N = 9 | N = 5 | |
| Median (Range) | 0.72 (0.24: 3.29) | 1.30 (0.49: 2.73) | p = 0.2571 |
| Ratio W12/W0 of CD4 EM (% of CD4) | | | |
| All patients | N=22 | N=16 | |
| Median (Range) | 1.24 (0.60: 2.68) | 1.04 (0.71: 2.30) | p = 0.1039 |
| Monotherapy | N=13 | N=10 | |
| Median (Range) | 1.01 (0.60: 1.74) | 0.97 (0.71: 1.31) | p = 0.5767 |
| Bitherapy | N=9 | N=6 | |
| Median (Range) | 1.49 (1.00: 2.68) | 1.25 (0.76: 2.30) | p = 0.0593 |
| Ratio W12/W0 of CD4 EM (10⁹/L) | | | |
| All patients | N=22 | N=15 | |
| Median (Range) | 1.04 (0.47: 9.59) | 1.37 (0.46: 4.43) | p = 0.2276 |
| Monotherapy | N=13 | N=10 | |
| Median (Range) | 0.85 (0.47: 9.59) | 1.18 (0.46: 4.43) | p = 0.2917 |
| Bitherapy | N=9 | N=5 | |
| Median (Range) | 1.17 (0.53: 4.53) | 2.67 (0.82: 3.21) | p = 0.5485 |
| Ratio W12/W0 of Th1 cells (% of CD4) | | | |
| All patients | N = 21 | N = 16 | |
| Median (Range) | 1.20 (0.76: 2.62) | 1.16 (0.75: 2.69) | p = 0.9024 |
| Monotherapy | N = 13 | N = 10 | |
| Median (Range) | 1.10 (0.76: 1.28) | 1.11 (0.79: 1.49) | p = 0.5767 |
| Bitherapy | N = 8 | N = 6 | |
| Median (Range) | 1.52 (1.13: 2.62) | 1.57 (0.75: 2.69) | p = 1.0000 |
| Ratio W12/W0 of Th1 cells (10⁹/L) | | | |
| All patients | N = 21 | N = 15 | |
| Median (Range) | 1.05 (0.36: 7.88) | 1.81 (0.62: 6.37) | p = 0.1443 |
| Monotherapy | N = 13 | N = 10 | |
| Median (Range) | 0.81 (0.36: 7.88) | 1.20 (0.62: 6.37) | p = 0.3211 |
| Bitherapy | N = 8 | N = 5 | |
| Median (Range) | 1.32 (0.53: 4.63) | 2.22 (0.98: 3.83) | p = 0.4642 |

Supplementary table 12. Correlation analyses between the W6/W0 ratio of TNF plasma concentrations and indicated markers in bithera-therapy-treated patients.

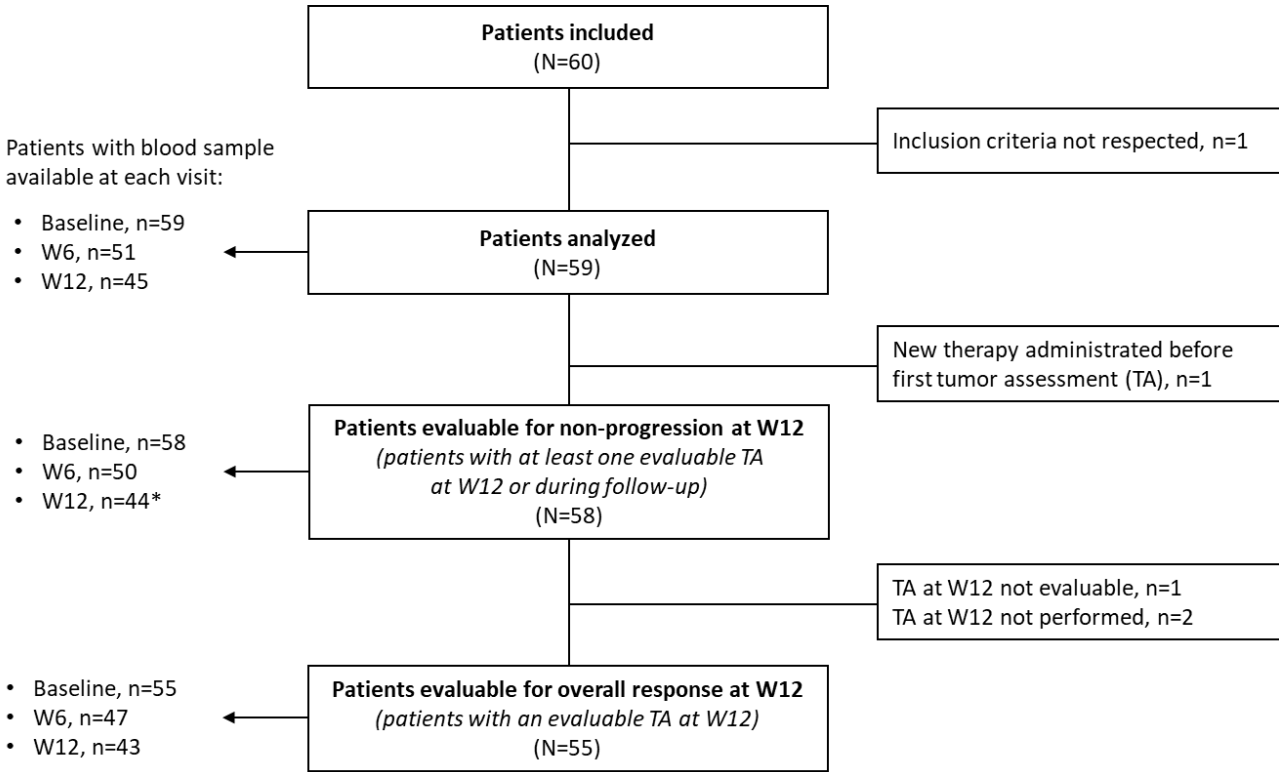
| | N | Spearman coefficient | p-value |
|--|----------|-----------------------------|----------------|
| Effector memory CD8 T cells (% of CD8) | 20 | 0.4120 | 0.0710 |
| Effector memory CD8 T cells (10 ⁹ /L) | 19 | 0.5386 | 0.0174 |
| Central memory CD8 T cells (% of CD8) | 20 | -0.2150 | 0.3626 |
| Central memory CD8 T cells (10 ⁹ /L) | 19 | 0.1193 | 0.6266 |
| Effector memory CD4 T cells (% of CD4) | 20 | -0.1549 | 0.5144 |
| Effector memory CD4 T cells (10 ⁹ /L) | 19 | 0.2421 | 0.3180 |
| Th1 cells (% of CD4) | 20 | -0.1820 | 0.4426 |
| Th1 cells (10 ⁹ /L) | 19 | 0.1421 | 0.5617 |

Supplementary table 13. Correlation analyses between the W12/W0 ratio of TNF plasma concentrations and indicated markers in bithera-therapy-treated patients

| | N | Spearman coefficient | p-value |
|--|----------|-----------------------------|----------------|
| Effector memory CD8 T cells (% of CD8) | 16 | 0.4618 | 0.0718 |
| Effector memory CD8 T cells (10 ⁹ /L) | 15 | 0.2607 | 0.3480 |
| Central memory CD8 T cells (% of CD8) | 16 | -0.1118 | 0.6803 |
| Central memory CD8 T cells (10 ⁹ /L) | 15 | -0.0679 | 0.8101 |
| Effector memory CD4 T cells (% of CD4) | 16 | -0.1853 | 0.4921 |
| Effector memory CD4 T cells (10 ⁹ /L) | 15 | -0.0071 | 0.9798 |
| Th1 cells (% of CD4) | 15 | -0.2893 | 0.2957 |
| Th1 cells (10 ⁹ /L) | 14 | -0.0110 | 0.9703 |

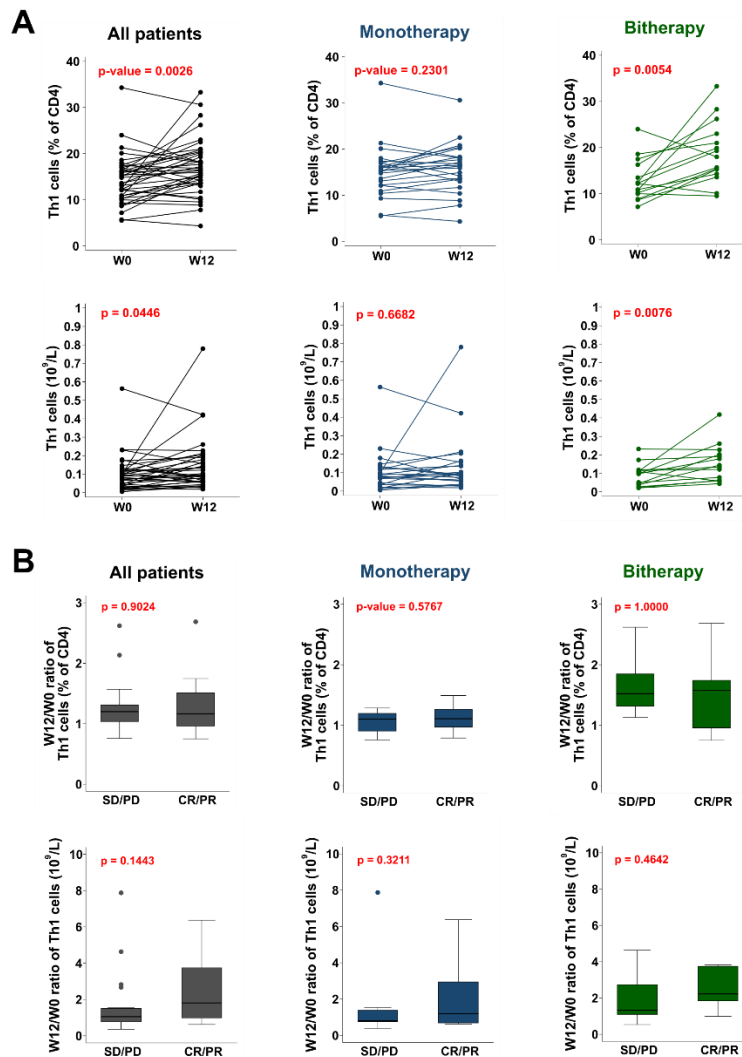
Supplementary Figures

Supplementary Fig S1. Flow chart of data analysis

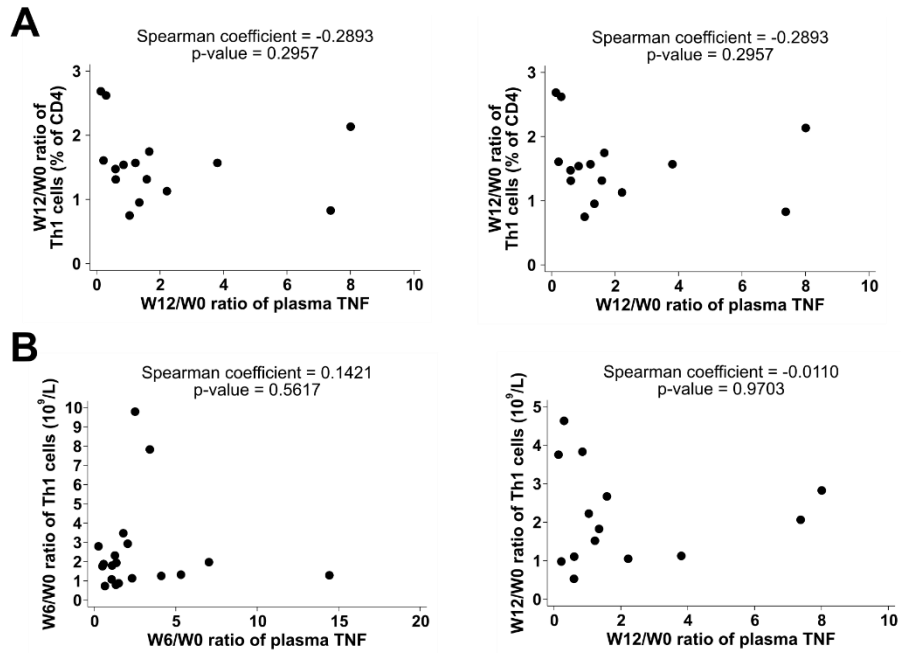


*patients evaluable for the primary endpoint (patients evaluable for non-progression at W12 and with a blood sample collected at W12).

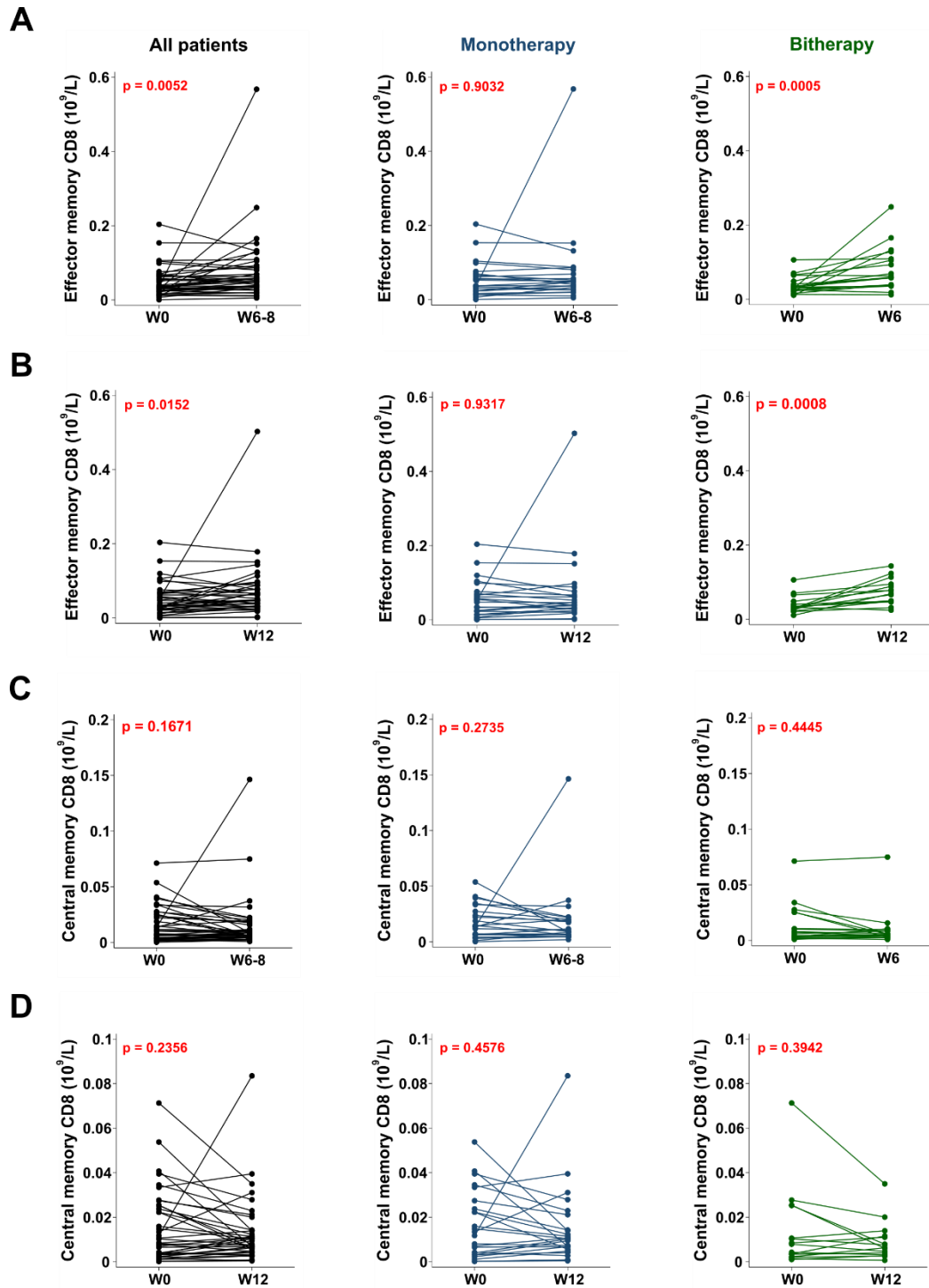
TA:



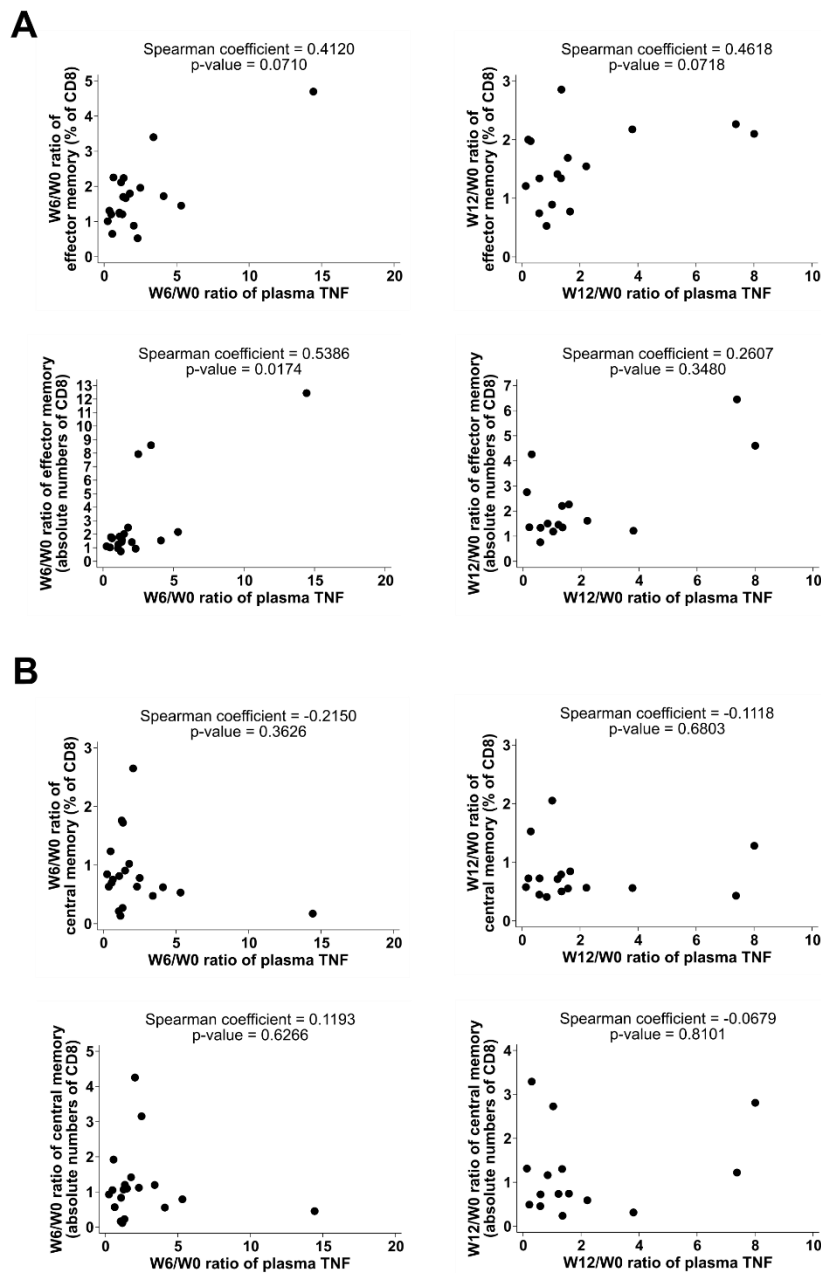
Supplementary figure 2. Evolution of Th1 cell proportions and absolute numbers between W0 and W12 and association to patients' objective response upon bitherepy. **A**, Proportions (upper panels) and absolute numbers (lower panels) of circulating T helper-1 CD4+ T cells (Th1, CXCR3+CCR6-) were evaluated by flow cytometry in the peripheral blood at baseline (W0) and week 12 (W12). Absolute numbers were extrapolated from the cell blood counts obtained at each time point. Plots for "both cohorts (All patients) and patients treated with monotherapy (nivolumab or pembrolizumab) or bitherepy (nivolumab+ipilimumab) are shown. *P*-values were calculated using Wilcoxon matched-pairs signed-rank test. **B**, W12/W0 ratios of percentages (upper panels) and absolute numbers (lower panels) of Th1 cells among CD4+ T cells according to patients' response. Patients' responses were assessed at W12. Non-responding: SD/PD; Responding: PR/CR; SD: stable disease; PD: progressive disease; CR: complete response; PR: partial response. Plots for "both cohorts (All patients) and patients treated with monotherapy (nivolumab or pembrolizumab) or bitherepy (nivolumab+ipilimumab) are shown. *P*-values were calculated using Mann-Whitney test.



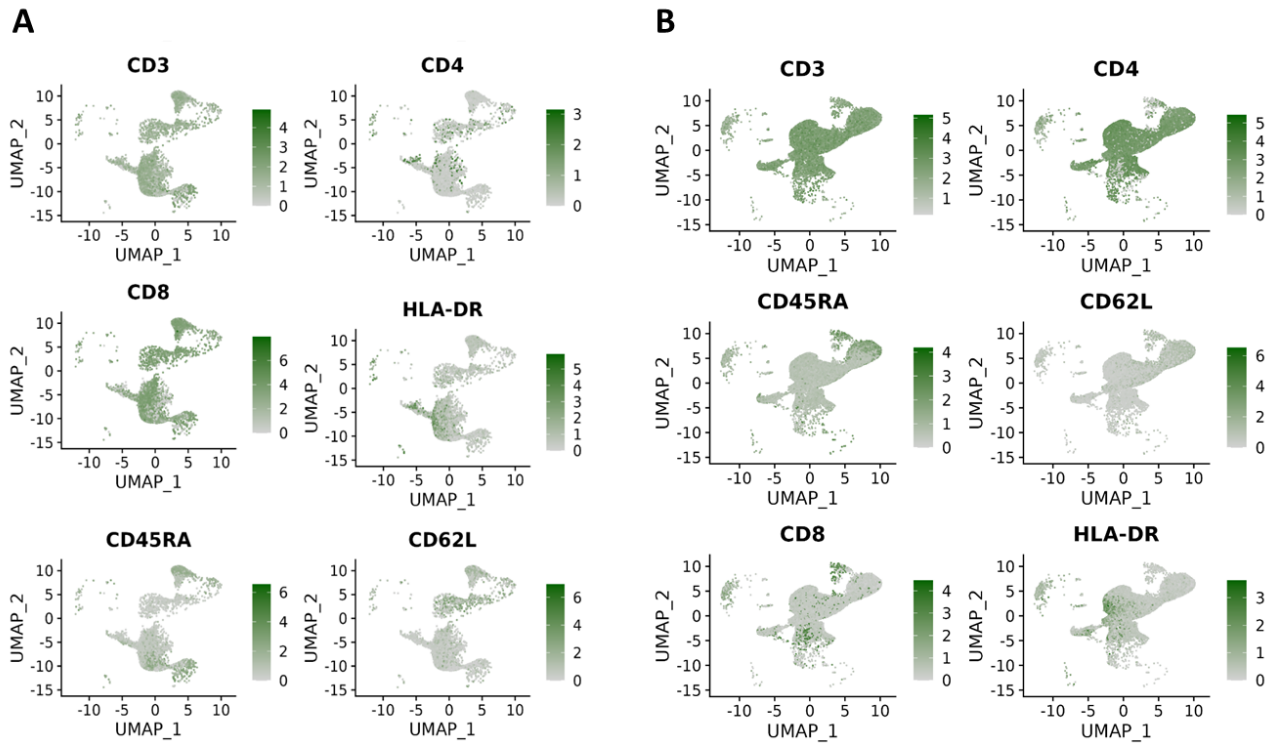
Supplementary figure 3. No correlation between the W0 to W6 or W12 evolution of TNF plasma levels and circulating Th1 cells in bitherapy-treated patients. Proportions of circulating T helper-1 CD4⁺ T cells (Th1, CXCR3⁺CCR6⁻) were assessed by flow cytometry at baseline (W0), week 6 (W6) and week 12 (W12) following the initiation of bitherapy (nivolumab + ipilimumab). Absolute numbers were extrapolated from the total blood cell counts at each time point. Plasma TNF concentrations were measured at W0, W6 and W12 by Mesoscale. **A**, Correlation between the W6/W0 (left panel) or W12/W0 (right panel) ratios of Th1 cell proportions versus TNF plasma concentrations. **B**, Correlation between the W6/W0 (left panel) or W12/W0 (right panel) ratios of Th1 cell absolute numbers versus TNF plasma concentrations. *P*-values were calculated using Spearman rank correlation test.



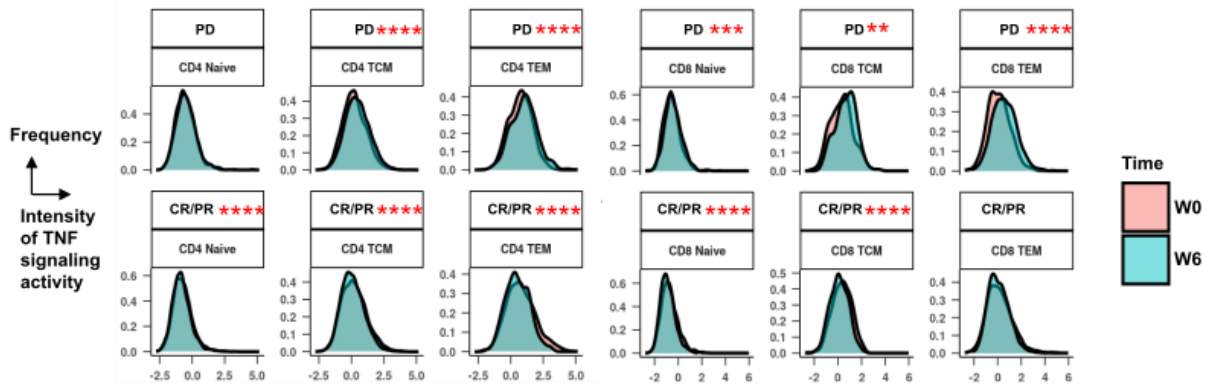
Supplementary Figure 4. Bithery is the main treatment driving an increase in effector memory but not central memory CD8 T cells absolute numbers in patients' blood. Circulating effector memory (EM, CCR7⁻CD45RA⁻) and central memory (CM, CCR7⁺CD45RA⁻) CD8⁺ T cells were assessed by flow cytometry between baseline (W0) and week 6-8 (W6-8 [W6, nivolumab and nivolumab+ipilimumab]; [W8, pembrolizumab]) or week 12 (W12) following treatment initiation. Absolute numbers of shown subpopulations were extrapolated from total blood counts obtained at each time point. **A and B**, Evolution of EM CD8 T cells absolute numbers between W0 and W6-8 (A) or W12 (B). **C and D**, Evolution of CM CD8 T cells absolute numbers between W0 and W6-8 (C) or W12 (D). Left panels: all patients; middle panel: monotherapy (nivolumab or pembrolizumab); right panel: bithery (nivolumab + ipilimumab). *P*-values were calculated using Wilcoxon matched-pairs signed-rank test.



Supplementary Fig. S5. No correlation between the W0 to W6 evolution of TNF plasma levels and circulating Th1 or CD8 CM T cells in bitheraPy-treated patients. Proportions of circulating effector memory (EM, CCR7⁺CD45RA⁻) and central memory (CM, CCR7⁺CD45RA⁻) CD8⁺ T cells were assessed by flow cytometry at baseline (W0), week 6 (W6) and week 12 (W12) following the initiation of bitheraPy treatment (nivolumab + ipilimumab). CD8 T cell absolute numbers were extrapolated from the total blood cell counts at each time point. Plasma TNF concentrations were measured at W0, W6 and W12 by Mesoscale. **A**, Correlation between the W6/W0 (left panels) or W12/W0 (right panels) ratios (upper panels) and absolute numbers (lower panels) of EM CD8 T cells and the W6/W0 (left panel) or W12/W0 (right panel) ratios of TNF plasma concentrations. **B**, Correlation between the W6/W0 (left panels) or W12/W0 (right panels) ratios (upper panels) and absolute numbers (lower panels) of CM CD8 T cells and the W6/W0 (left panel) or W12/W0 (right panel) ratios of TNF plasma. *P*-values were calculated using Spearman rank correlation test.



Supplementary Fig S6. Protein expression of depicted markers by CD8 (A) and CD4 (B) T cells analysed by CiteSeq scRNAseq.



Supplementary Fig S7. The TNF signalling pathway activity is increased in CD4 and CD8 T cells of non-responders along treatment. Intensity of the “TNF signaling” signature in naive, central memory (CM) and effector memory (EM) CD4 and CD8 T cells in patients with progressive disease [PD], complete response [CR] or partial response [PR] between W0 (red histograms) and W6 (blue histograms) (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; Wilcoxon test).

References

1. Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, Mauck WM, 3rd, Zheng S, Butler A, *et al.* Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* 2021;**184**(13):3573-87 e29 doi 10.1016/j.cell.2021.04.048.
2. Schubert M, Klinger B, Klunemann M, Sieber A, Uhlitz F, Sauer S, *et al.* Perturbation-response genes reveal signaling footprints in cancer gene expression. *Nat Commun* 2018;**9**(1):20 doi 10.1038/s41467-017-02391-6.
3. Holland CH, Tanevski J, Perales-Paton J, Gleixner J, Kumar MP, Mereu E, *et al.* Robustness and applicability of transcription factor and pathway analysis tools on single-cell RNA-seq data. *Genome Biol* 2020;**21**(1):36 doi 10.1186/s13059-020-1949-z.

Article 2 : Combining nivolumab and ipilimumab with infliximab or certolizumab in patients with advanced melanoma : first results of a phase Ib clinical trial

Article publié dans *Clinical Cancer Research* en décembre 2020

Les données supplémentaires sont disponibles [en ligne](#)

Résumé :

Les études précliniques ont démontré que l'inhibition du TNF permet d'améliorer l'efficacité des ICI. De plus, certains irAEs, dont les colites réfractaires aux corticostéroïdes, nécessitent l'arrêt des ICI et sont traités par infliximab, un anticorps anti-TNF. L'effet des anti-TNF sur la réponse aux ICI a été évalué dans plusieurs études rétrospectives qui ont des conclusions contradictoires et le sujet est toujours débattu. TICIMEL est un essai clinique de phase Ib visant à évaluer la sécurité de l'administration concomitante de nivolumab, d'ipilimumab et d'un anti-TNF : soit l'infliximab, soit le certolizumab. Cet article rapporte les résultats de la première partie de l'essai dans laquelle 14 patients ont été inclus. Nous avons aussi étudié l'effet de ces traitements sur les populations immunitaires circulantes.

Cet essai clinique démontre que la combinaison concomitante d'un anti-TNF (infliximab ou certolizumab) avec l'ipilimumab et le nivolumab est sûre pour traiter les patients atteints de mélanome avancé. Nous avons observé des signes d'activité clinique différente entre les deux régimes de traitement. La combinaison ipilimumab / nivolumab / certolizumab est associée à une toxicité plus fréquente et de grade plus élevé que la combinaison ipilimumab / nivolumab / infliximab. Cependant, le taux de réponses cliniques objectives semble meilleur avec le certolizumab. En raison du faible nombre de patients inclus, ces résultats devront être confirmés dans la deuxième partie de l'essai clinique.

Le blocage du TNF ne nuit pas à la réponse à la combinaison ipilimumab + nivolumab en périphérie. En effet, en comparant les populations immunitaires circulantes avant et pendant le traitement (semaine 6), nous avons observé une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8 et CD4 circulants ainsi que de la proportion de cellules qui prolifèrent parmi eux, pendant le traitement. Le nombre de Th1 (CD4⁺CXCR3⁺CCR6⁻), qui sont associés à un pronostic favorable, était aussi augmenté dans le sang pendant le traitement de même que les concentrations plasmatiques d'IFN- γ . Nous avons aussi noté une différenciation des lymphocytes T circulants avec une augmentation du nombre de CD4 centraux mémoires et effecteurs mémoires circulants ainsi que du nombre de CD8 effecteurs mémoires et T_{EMRA}. Enfin, nous avons observé une diminution de la proportion de cellules myéloïdes suppressives parmi les monocytes circulants pendant le traitement.

Cet article démontre donc qu'utiliser l'infliximab ou le certolizumab pour bloquer le TNF de façon concomitante avec le traitement par ipilimumab et nivolumab est faisable et sûr chez les patients atteints de mélanome avancé, et que cela ne nuit pas à la réponse immunitaire périphérique.

Combining Nivolumab and Ipilimumab with Infliximab or Certolizumab in Patients with Advanced Melanoma: First Results of a Phase Ib Clinical Trial



Anne Montfort^{1,2}, Thomas Filleron^{3,4}, Mathieu Virazels^{1,2}, Carine Dufau^{1,2,5}, Jean Milhès^{1,2}, Cécile Pagès^{4,6}, Pascale Olivier⁷, Maha Ayyoub^{1,4,5}, Muriel Mounier^{3,4}, Amélie Lusque^{3,4}, Stéphanie Brayer^{1,2,6}, Jean-Pierre Delord^{1,4,5}, Nathalie Andrieu-Abadie^{1,2}, Thierry Levade^{1,2,5,8}, Céline Colacios^{1,2,5}, Bruno Ségui^{1,2,5}, and Nicolas Meyer^{1,2,4,5,6}

ABSTRACT

Purpose: TNF blockers can be used to manage gastrointestinal inflammatory side effects following nivolumab and/or ipilimumab treatment in patients with advanced melanoma. Our preclinical data showed that anti-TNF could promote the efficacy of immune checkpoint inhibitors.

Patients and Methods: TICIMEL (NTC03293784) is an open-label, two-arm phase Ib clinical trial. Fourteen patients with advanced and/or metastatic melanoma (stage IIIc/IV) were enrolled. Patients were treated with nivolumab (1 mg/kg) and ipilimumab (3 mg/kg) combined to infliximab (5 mg/kg, $N = 6$) or certolizumab (400/200 mg, $N = 8$). The primary endpoint was safety and the secondary endpoint was antitumor activity. Adverse events (AEs) were graded according to the NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events and response was assessed following RECIST 1.1.

Results: Only one dose-limiting toxicity was observed in the infliximab cohort. The two different combinations were found to be safe. We observed lower treatment-related AEs with infliximab as compared with certolizumab. In the certolizumab cohort, one patient was not evaluable for response. In this cohort, four of eight patients exhibited hepatobiliary disorders and seven of seven evaluable patients achieved objective response including four complete responses (CRs) and three partial responses (PRs). In the infliximab cohort, we observed one CR, two PRs, and three progressive diseases. Signs of activation and maturation of systemic T-cell responses were seen in patients from both cohorts.

Conclusions: Our results show that both combinations are safe in human and provide clinical and biological activities. The high response rate in the certolizumab-treated patient cohort deserves further investigations.

Introduction

Immune checkpoint inhibitors (ICIs) such as anti-CTLA-4 (ipilimumab) and anti-PD-1 (nivolumab), given as single agents or in combination, improve progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in patients with unresectable locally advanced and/or

metastatic melanoma (1–4). The median PFS with the combination of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 is 11.5 months while the 5-year PFS rate is 36% and the 5-year OS rate is 52% (2). Although this treatment has achieved unprecedented therapeutic effects, depending on the treatment regimen, almost 40%–60% of patients are nonprimary responders and 20% of responders relapse within 3 years following treatment initiation. This highlights the need to improve therapeutic efficacy in patients with unresectable locally advanced and/or metastatic melanoma.

ICIs have a specific tolerability profile, as illustrated by the very complex adverse event (AE) pattern of the anti-PD-1/anti-CTLA-4 combined therapy. Indeed, 96% of patients in the CheckMate 067 study and treated with ipilimumab (3 mg/kg) plus nivolumab (1 mg/kg) experienced at least one AE. Among those, 59% developed treatment-related grade 3–4 AEs (2). A large majority of AEs are of immune nature and mimic autoimmune and/or autoinflammatory disorders. Management of AEs is now codified and requires corticosteroids and immune suppressors including anti-TNF blocking antibodies (5).

TNF is produced by cancer and/or stromal cells and has been extensively described to favor the establishment of a proinflammatory microenvironment thus promoting immune regulatory responses, enhancing cancer cell proliferation, tumor angiogenesis, and metastasis (6, 7). We have previously shown in preclinical studies that TNF deficiency/blockade promotes tumor regressions and prevents anti-PD-1-induced tumor-infiltrating T-lymphocyte death (8–10). Another study also showed that treating mice with TNF inhibitors concomitantly with anti-CTLA-4 and anti-PD-1 not only improves ICI efficacy, but also reduces colitis and hepatitis in melanoma and colon cancer models (11).

¹INSERM UMR 1037, Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Toulouse, France. ²Equipe Labellisée Fondation ARC pour la recherche sur le cancer, Toulouse, France. ³Methodology, biostatistics and clinical operations, Institut Claudius Regaud, IUCT-O, Toulouse, France. ⁴Institut Universitaire du Cancer (IUCT-O), Toulouse, France. ⁵Université Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse, France. ⁶Service d'Oncodermatologie, IUCT-O, CHU de Toulouse, Toulouse, France. ⁷Service de Pharmacologie médicale et clinique, Centre Régional de Pharmacovigilance, de Pharmacoépidémiologie et d'information sur le médicament du CHU de Toulouse, Toulouse, France. ⁸Laboratoire de Biochimie, Institut Fédératif de Biologie, CHU Purpan, Toulouse, France.

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

B. Ségui and N. Meyer contributed equally to this article.

Corresponding Authors: Bruno Ségui, Cancer Research Center of Toulouse, 2 avenue Hubert Curien, CS 53717, Toulouse Cedex 1 31037, France. Phone: 33 5-8274-1621; Fax: 335-8274-1685; E-mail: bruno.segui@inserm.fr; and Nicolas Meyer, Skin Cancer Unit, Institut Universitaire du Cancer and CHU, 1 rue Irène Joliot-Curie, 31059 Toulouse Cedex 09, France. Phone: 33 5-3115-6034; Fax: 33 5-3115-6033; E-mail: meyer.n@chu-toulouse.fr

Clin Cancer Res 2021;27:1037–47

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3449

©2020 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Immune checkpoint inhibitors (ICIs) are currently administered as a first-line treatment in patients with advanced melanoma. Anti-TNF α blocking antibodies are used for the management of colitis in the context of ICI-based therapy. Whereas the consequences of anti-TNF on antitumor immune responses have not been evaluated, the impact on clinical outcome in retrospective studies is a matter of debate. In a phase Ib clinical trial, we assessed the safety of combining nivolumab and ipilimumab to anti-TNF in patients with melanoma. Anti-TNF, certolizumab or infliximab, were administered in two different cohorts. Both triple combinations were safe with the occurrence of manageable immune-related adverse events and associated with increased systemic Th1-related immune responses. The certolizumab cohort displayed more adverse events and better response rates than the infliximab cohort. Our study lays the ground for further trials aiming at assessing the clinical efficacy of the combination.

In patients with melanoma, the use of infliximab for the management of ICI-induced colitis and its impact on therapeutic responses is a matter of debate (12–15). Three studies suggest that, while efficiently resolving ICI-induced colitis, infliximab does not seem to impede response to treatment (12, 13, 15). However, the retrospective analysis of a large cohort of patients with unresectable locally advanced melanoma and treated with ICIs suggests that management of AEs using a combination of infliximab and corticosteroid is associated with shorter OS as compared with corticosteroids alone (14).

We conducted a phase Ib clinical trial to evaluate for the first time the safety of combining anti-CTLA-4 (ipilimumab) and anti-PD-1 (nivolumab) to anti-TNF (infliximab or certolizumab) for the treatment of patients with unresectable locally advanced and/or metastatic melanoma. We here report the results collected on 14 patients enrolled during the first part of this study on safety, tolerability, efficacy, and pharmacodynamics of both triple combinations.

Patients and Methods

Study design and participants

TICIMEL is an open-label, nonrandomized, phase Ib clinical trial to assess the safety, tolerability, and antitumor activity of anti-TNF (certolizumab or infliximab) in combination with ipilimumab and nivolumab in patients with unresectable locally advanced and/or metastatic melanoma. The study, conducted at the Institut Universitaire du Cancer de Toulouse - Oncopole (IUCT-O; Toulouse, France), was composed of a safety phase with two parallel cohorts (ipilimumab/nivolumab/certolizumab and ipilimumab/nivolumab/infliximab) and an expansion phase. We report here the results collected during the first part of the study.

Eligible patients had histologically proven stage IIIc–IV unresectable locally advanced and/or metastatic melanoma with documented BRAFV600 status; were ages > 18 years and had an Eastern Oncology Group Performance status (ECOG) of 0 or 1. Key exclusion criteria were uveal melanoma and active intracranial disease. Additional inclusion and exclusion criteria are summarized in the TICIMEL protocol p22. All patients provided written, informed consent before study entry. The trial protocol is available online and was reviewed and approved by the French committee for the protection of persons

and the French drug agency (Agence Nationale de Sécurité du Médicament; date of approval August 4, 2017 EUDRACT 2016-005139-34). All study procedures were carried out in accordance to the International Council for Harmonization tripartite guideline on good clinical practice (Helsinki declaration) and approved by the French committee for the protection of persons (Comité de protection des personnes Nord Ouest III). An independent data monitoring committee (IDMC) monitored and evaluated data from the study. This study is registered under ClinicalTrials.gov, number NCT03293784.

Procedures

Patients and treatments

After giving their signed and informed consent, patients were alternatively assigned to one of two parallel cohorts: ipilimumab+nivolumab+certolizumab (certolizumab cohort) or ipilimumab+nivolumab+infliximab (infliximab cohort). All patients were naive of any previous line of treatment (including adjuvant therapy with anti-PD-1 or with BRAFV600+MEK inhibitor; adjuvant therapy with IFN was allowed). In each cohort, new enrolments were allowed once a given patient had completed a 4-week observation period spanning over the first cycle of treatment. Treatment schedule was published previously (16). Briefly, all patients received 1 mg/kg of nivolumab every 3 weeks plus 3 mg/kg of ipilimumab every 3 weeks for four doses, followed by 3 mg/kg of nivolumab every 2 weeks for cycle 5 and beyond. Patients enrolled in the certolizumab cohort, received 400 mg subcutaneous certolizumab every 3 weeks for three doses; then 200 mg every 2 weeks for cycle 4 and beyond. Patients assigned to the infliximab cohort received 5 mg/kg of infliximab every 3 weeks for three doses, followed by 5 mg/kg of infliximab every 8 weeks.

Tumor responses were assessed at baseline and every 12 weeks for 2 years or until disease progression, whatever occurred first, by following the RECIST 1.1 using CT scan or MRI (17). AEs were graded according to the NCI Common Terminology Criteria for AE version V4.03 and assigned as related or unrelated to study treatment by the investigator. Complete methods are available in the study protocol.

Ancillary analyses

Flow cytometry on fresh blood: A total of 200 μ L of fresh blood (collected on EDTA at week 0 and week 6) were incubated with antibodies directed against markers of T-cell maturation as well as markers allowing for the identification of Th-related subpopulations for 30 minutes (see Supplementary Table S12). Red blood cells were then lysed using the BD Pharm Lyse $10\times$ buffer (BD Biosciences). Remaining immune cells were stained for 30 minutes in a PBS solution containing a fixable viability dye (Zombie NIR, BioLegend) and fixed for 10 minutes in a 2% formal saline solution. Samples were acquired using an LSR-Fortessa X-20 cytometer (BD Biosciences). Data have been analyzed using the FlowJo 10 software. For one patient from the infliximab cohort, staining for the T-cell maturation panel had to be made on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) for the W6 time point.

Flow cytometry on PBMCs: Analyses have been performed on frozen PBMCs prepared from fresh blood of patients enrolled in this clinical trial and obtained at week 0 and week 6 following treatment initiation. Both time points (W0 and W6) for each patient were assessed during the same experiment. Cells were stained for 30 minutes at 4°C with viability dye and antibodies directed against membrane markers for T-cell subpopulations and activation or monocyte subpopulations (see Supplementary Table S12). For Ki67 staining of T-cell subpopulations, cells were fixed and permeabilized using the “FoxP3 fixation/

permeabilization buffer" (eBioscience, Thermo Fisher Scientific) for 30 minutes at 4°C. Cells were then washed twice in 1× permeabilization buffer (eBioscience, Thermo Fisher Scientific) and incubated for 30 minutes at 4°C with antibodies directed against human Ki67. For the analysis of monocytes, following antibody staining, cells were washed and fixed for 10 minutes in 2% formal saline solution before acquisition. Samples were acquired using an LSR-Fortessa X-20 cytometer (BD Biosciences). Data have been analysed using the FlowJo 10 software.

Plasma cytokine assessment: Plasmas were prepared within 1 hour following collection of patients' blood and frozen at -80°C. IFN γ , TNF, IL2, and IL6 levels were assessed on undiluted plasma by Evotec using the Mesoscale technology according to manufacturer's recommendations.

Ex vivo assessment of cytokine production: This assay has been performed on frozen PBMCs prepared from fresh blood of patients enrolled in this clinical trial and obtained at week 0 and week 6 following treatment initiation. CD4 and CD8 T cells were sequentially purified from PBMCs using CD4 and CD8 microbeads allowing for positive selection as well as MS separation columns from Miltenyi Biotec. Purification was performed according to manufacturer's recommendations. CD4 and CD8 T cells were then allowed for recovery overnight in RPMI (Gibco) culture medium containing 10% de complemented A/B serum (Institut de Biotechnologies Jacques Boy, Reims, France), 1 mmol/L sodium pyruvate (Sigma-Aldrich), 100 U penicillin, 100 μ g/mL streptomycin (Sigma-Aldrich), 100 U/mL human recombinant IL2, 10 μ mol/L HEPES solution (Gibco), and 1× nonessential amino acid (MEM, Gibco). The next morning cells were restimulated with 1× "Cell stimulation cocktail" (eBioscience) for 4 hours at 37°C. After the first hour of incubation 1× of "protein transport inhibitor cocktail" (eBioscience) was added to the culture medium for the remaining 3 hours. Appropriate controls with cells incubated in the presence of the "Protein transport inhibitor" solution alone, were included to each experiment. Both time points (W0 and W6) for each patient were assessed during the same experiment. Cells were then stained for 30 minutes at 4°C with a viability dye and antibodies directed against membrane markers for T-cell subpopulations and activation (see Supplementary Table S12). Cells were fixed and permeabilised using the "FoxP3 fixation/permeabilisation buffer" (eBioscience, Thermo Fisher Scientific) for 30 minutes at 4°C. Cells were then washed twice in 1× permeabilization buffer (eBioscience, Thermo Fisher Scientific) and incubated for 30 minutes at 4°C with antibodies directed against human IFN γ and TNF diluted in 1× permeabilization buffer (see Supplementary Table S12). Samples were acquired using an LSR-Fortessa X-20 cytometer (BD Biosciences). Data have been analyzed using the FlowJo 10 software.

Outcomes

The primary endpoint was the occurrence during the first 12 weeks of dose-limiting toxicities (DLTs; study protocol p32). The initial DLT evaluable population was defined by patients who received at least three doses of nivolumab and ipilimumab and at least two doses of anti-TNF. On the basis of recommendations from the IDMC and in agreement with previous studies (18–20), the required number of doses for DLT evaluation was amended to at least two doses of nivolumab, ipilimumab, and anti-TNF (as formally approved on March 2, 2019).

Secondary endpoints were antitumor activities, including the proportion of patients achieving an objective response (a complete response or partial response, according to RECIST version 1.1) and PFS.

Statistical analyses

During the safety phase, a similar methodology was used to evaluate safety of the association of nivolumab and ipilimumab and each anti-TNF. For a given anti-TNF, an initial cohort of three patients was planned to receive the association. If one DLT or less was observed, an additional cohort of three patients was allowed. The given association was considered as safe if one patient or less among six presented with a DLT.

Analyses were done in the following populations: (i) the safety set, which included all patients who received at least one dose of infliximab or certolizumab; with the exception of DLT, which were analyzed in the DLT analysis set; (ii) the activity evaluable set, which included all patients in the safety analysis set who had measurable disease at baseline and had at least one postbaseline tumor assessment.

Descriptive statistics were used to summarize demographics, baseline characteristics, AEs, safety parameters, and response data, including the primary and secondary outcomes. Paired continuous data were compared using the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test. All statistical tests were two sided and $P < 0.05$ were considered significant. All statistical analyses were done with STATA software version 16.

Role of the funding source

Claudius Regaud Institute (ICR) and Cancer Research Center of Toulouse (CRCT) designed the TICIMEL clinical trial. ICR and CRCT wrote the TICIMEL protocol, which has been reviewed and approved by BMS. BMS has funded the clinical trial and part of the ancillary study. Cancéropôle Grand Sud-Ouest (GSO), IUCT-O, and Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) have funded part of the ancillary study. Fondation Toulouse Cancer Santé (FTCS) has funded the salary support of M. Virazels and S. Brayer. Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) has funded the salary support of J. Milhès. Collection, analysis, and interpretation of data have been jointly assessed by ICR and CRCT. Decision to submit the paper for publication has been jointly taken by ICR, CRCT, and the co-senior authors. The corresponding authors confirm that they had full access to all the data in the study and share the final responsibility for the decision to submit for publication.

Protocol

The full protocol of this trial is available.

Data sharing

The anonymized derived data from this study that underlie the results reported in this article will be made available beginning 12 months and ending 5 years after this article's publication, to any investigators who sign a data access agreement and provide a methodologically sound proposal.

Results

Between January 2018 and September 2019, 14 patients with metastatic melanoma were enrolled, eight in the certolizumab cohort and six in the infliximab cohort. Patients' demographics and baseline characteristics are provided in **Table 1**. The median duration follow-up was 13.3 months [95% confidence interval (CI), 2.9–19.9].

Patients and treatments

At the cut-off date (December 6, 2019), one patient from the infliximab cohort was still receiving the study treatment. In this latter cohort, treatment discontinuations were related to disease progression [$N = 3$ (50%)] and toxicity [$N = 2$ (33.3%)]. In the certolizumab cohort, one patient (12.5%) was taken off treatment due to disease

Table 1. Patients demographic and baseline characteristics.

| | Certolizumab N (%) | Infliximab N (%) |
|---|-----------------------|---------------------|
| Sex (N = 14) | | |
| Male | 5 (62.5) | 5 (83.3) |
| Female | 3 (37.5) | 1 (16.7) |
| Age at inclusion (N = 14) | | |
| Median | 49.5 | 61 |
| Range | (33:73) | (50:75) |
| ECOG Performance status (N = 14) | | |
| ECOG 0 | 7 (87.5) | 4 (66.7) |
| ECOG 1 | 1 (12.5) | 2 (33.3) |
| LDH (U/L) (N = 14) | | |
| Normal | 2 (25) | 3 (50) |
| ANCS | 6 (75) | 3 (50) |
| AJCC stage at screening (N = 14) | | |
| Stage IIIc | 2 (25) | 2 (33) |
| Stage IV | 6 (75) | 4 (66.7) |
| Number of metastatic sites (if stage IV at screening) (N = 10) | | |
| 1 site | 1 (16.7) | 0 (0) |
| 2 sites | 2 (33.3) | 2 (50) |
| 3 sites | 2 (33.3) | 2 (50) |
| 5 sites | 1 (16.7) | 0 (0) |
| BRAF V600 (N = 14) | | |
| Mutated | 5 (62.5) | 1 (16.7) |
| NRAS (N = 13) | | |
| Mutated | 1 (14.3) | 1 (16.7) |
| Missing | 1 | 0 |
| Prior adjuvant therapy (N = 14) | | |
| No | 8 (100) | 5 (83.3) |
| Yes ^a | 0 (0) | 1 (16.7) |

Abbreviations: AJCC, American Joint Committee on Cancer; ANCS, abnormal not clinically significant; LDH, lactate dehydrogenase.

^aInfliximab cohort: One patient received IFN α 10 years prior to inclusion.

progression; however, the main cause for therapy discontinuation was the occurrence of AEs [N = 6 (75%)].

In the certolizumab cohort, the median duration of treatment was 33 days (range, 21–113), with patients receiving a median number of 2.5 cycles of treatment [nivolumab (range, 2–6), ipilimumab (range, 2–4), certolizumab (range, 2–5)]. In the infliximab cohort, the median duration of treatment was 64 days (range, 45–155) with patients receiving a median number of four cycles of nivolumab [range (3–10+); + ongoing treatment] and ipilimumab [range (3–4+)] as well as three cycles of infliximab [range (3–5+); Supplementary Table S1].

Safety assessment

In the certolizumab cohort, one patient, who developed a clinically threatening course of melanoma, received BRAF and MEK inhibitors before the end of the DLT evaluation period. This patient was considered not to be evaluable for DLT and antitumor activity. No DLT was observed in seven other patients enrolled the certolizumab cohort. In the infliximab cohort, only one patient developed a DLT defined as an alteration of the left ventricular ejection fraction during the course of a lung infection.

Treatment-related AEs of any grade occurred in 13 (92.9%) of 14 patients, representing seven (87.5%) and six (100%) patients from the certolizumab and infliximab cohorts, respectively. The median number of treatment-related AEs per patient was 11 (range, 9–18) and three (range, 2–14) in the certolizumab and infliximab cohorts, respectively. Moreover, nine (64.3%) patients experienced at least one grade 3–4 treatment-related AE [certolizumab cohort N = 6 (75%), infliximab cohort N = 3 (50%)], mainly hepatobiliary [N = 4 (28.6%)] and gastrointestinal disorders [N = 4 (28.6%)] (Table 2). Of note, two patients from the certolizumab cohort (hepatic cytolysis and macrophage activation syndrome) and one patient from the infliximab cohort (hepatic cytolysis) experienced grade 4 AEs, with the two hepatic cytolysis considered as related to treatment (Supplementary Tables S2 and S3). Moreover, nine (64.3%) patients experienced serious AEs related to treatment. Both these phenomena were observed more frequently upon certolizumab as compared with infliximab treatment (Table 2; Supplementary Table S2). Regardless of their grade and severity, the main treatment-related toxicities observed in

Table 2. Treatment-related AEs.

| | Total N = 14 | | Certolizumab cohort N = 8 | | Infliximab cohort N = 6 | |
|--|-----------------|--------------------|------------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|
| | All N (%) | Grade 3–4 N (%) | All N (%) | Grade 3–4 N (%) | All N (%) | Grade 3–4 N (%) |
| At least one treatment-related AE | 13 (92.9) | 9 (64.3) | 7 (87.5) | 6 (75) | 6 (100) | 3 (50) |
| General disorders and administration site conditions | 10 (71.4) | 0 (0) | 7 (87.5) | 0 (0) | 3 (50) | 0 (0) |
| Gastrointestinal disorders | 9 (64.3) | 4 (28.6) | 4 (50) | 3 (37.5) | 5 (83.3) | 1 (16.7) |
| Skin and subcutaneous tissue disorders | 9 (64.3) | 1 (7.1) | 6 (75) | 1 (12.5) | 3 (50) | 0 (0) |
| Hepatobiliary disorders | 6 (42.9) | 4 (28.6) | 4 (50) | 3 (37.5) | 2 (33) | 1 (16.7) |
| ALAT | 2 (14.3) | 1 (7.1) | 2 (25) | 1 (12.5) | 0 (0) | 0 (0) |
| ASAT | 2 (14.3) | 2 (14.3) | 1 (12.5) | 1 (12.5) | 1 (16.7) | 1 (16.7) |
| Endocrine disorders | 4 (28.6) | 0 (0) | 3 (37.5) | 0 (0) | 1 (16.7) | 0 (0) |
| Nervous system disorders | 4 (28.6) | 0 (0) | 3 (37.5) | 0 (0) | 1 (16.7) | 0 (0) |
| Metabolism and nutrition disorders | 3 (21.4) | 1 (7.1) | 3 (37.5) | 1 (12.5) | 0 (0) | 0 (0) |
| Respiratory, thoracic, and mediastinal disorders | 3 (21.4) | 0 (0) | 2 (25) | 0 (0) | 1 (16.7) | 0 (0) |
| Musculoskeletal and connective tissue disorders | 2 (14.3) | 0 (0) | 2 (25) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Vascular disorders | 2 (14.3) | 0 (0) | 1 (12.5) | 0 (0) | 1 (16.7) | 0 (0) |
| Blood and lymphatic system disorders | 1 (7.1) | 0 (0) | 1 (12.5) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Cardiac disorders | 1 (7.1) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (16.7) | 0 (0) |
| Psychiatric disorders | 1 (7.1) | 0 (0) | 1 (12.5) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |

Abbreviations: ALAT, alanine aminotransferases; ASAT, aspartate aminotransferases.

both cohorts included general disorders [fatigue $N = 5$ (35.7%), injection site reaction $N = 5$ (35.7%)], skin and cutaneous disorders [pruritus $N = 6$ (42.9%), maculo-papular rash $N = 5$ (35.7%)] as well as AEs affecting the gastrointestinal system [diarrhea $N = 6$ (42.9%), nausea $N = 4$ (28.6%), colitis $N = 2$ (14.3%; Supplementary Table S2). A high proportion of patients [$N = 4$ (50%)] in the certolizumab cohort experienced AEs affecting the hepatobiliary system ($N = 10$ events, nine events related to treatment; Table 2; Supplementary Tables S2 and S3). Overall, the number of patients displaying at least one treatment-related AE was lower in the infliximab cohort than in the certolizumab cohort with the exception of gastrointestinal disorders (Fig. 1). No death was reported during this first study period.

Efficacy assessment

Figure 2A–C illustrate the pattern and duration of responses in each cohort. In the certolizumab cohort, six patients achieved an objective response (OR) according to RECIST (complete response: $N = 3$, partial response: $N = 3$) and one additional patient not evaluable according to RECIST exhibited a complete response. Four patients were still responders after 1 year of follow-up. One patient, who depicted an OR at week 12 progressed at week 36 with development of active intracranial disease. In the infliximab cohort, three of six (50%) patients exhibited an OR according to RECIST, including one patient still responder after 1 year of follow-up. Three patients displayed a PD at week 12 (Fig. 2A–D; Supplementary Tables S4 and S5).

Assessment of systemic T-cell responses

We then assessed how certolizumab and infliximab affect systemic immune responses in patients. Half of the patients received systemic

corticosteroids after week 6, we hence performed our analyses on patients' fresh blood, PBMCs, and plasma at baseline (W0) and at week 6 (W6) posttreatment induction. Six of seven and three of six patients from the certolizumab and infliximab cohorts, respectively, displayed an increase in total lymphocyte numbers at W6 (defined as an increase above 20% from baseline; Fig. 3A; Supplementary Table S6). Whereas five (71.4%) patients from the certolizumab cohort displayed an increase in both $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell numbers, this phenomenon was observed in 2 (33.3%) patients from the infliximab cohort (Fig. 3B and C). When combining both cohorts, we observed a significant increase in the numbers of total circulating lymphocytes as well as $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells at W6 as compared with baseline (Fig. 3A–C). When assessing for maturation of T-cell responses, we observed that all (100%) and four (66.7%) patients from the certolizumab and infliximab cohorts, respectively, displayed an increase in central memory (CM) $CD4^+$ T-lymphocyte numbers at W6. All patients from both cohorts displayed an increase in effector memory (EM) $CD4^+$ T-lymphocyte numbers at W6 (Supplementary Fig. S1). In terms of $CD8^+$ T cells, five (71.4%) and two (33.3%) patients from the certolizumab and infliximab cohorts, respectively, displayed an increase in CM $CD8^+$ T cells. Similarly, five (71.4%) and four (66.7%) patients from the certolizumab and infliximab cohorts, respectively, displayed an increase in EM $CD8^+$ T cells. When combining both cohorts, patients had increased numbers of $CD4^+$ ($P = 0.0015$) and $CD8^+$ ($P = 0.0037$) EM T cells as well as $CD4^+$ ($P = 0.0071$) but not $CD8^+$ ($P = 0.2489$) CM T cells. Moreover, 5 (71.4%) and 2 (33.3%) patients from the certolizumab and infliximab cohorts, respectively, displayed an increase in $CD4^+$ terminally differentiated $CD45RA^+$ (TEMRA) T cells at W6. Six (85.7%) and four (66.7%) patients from the

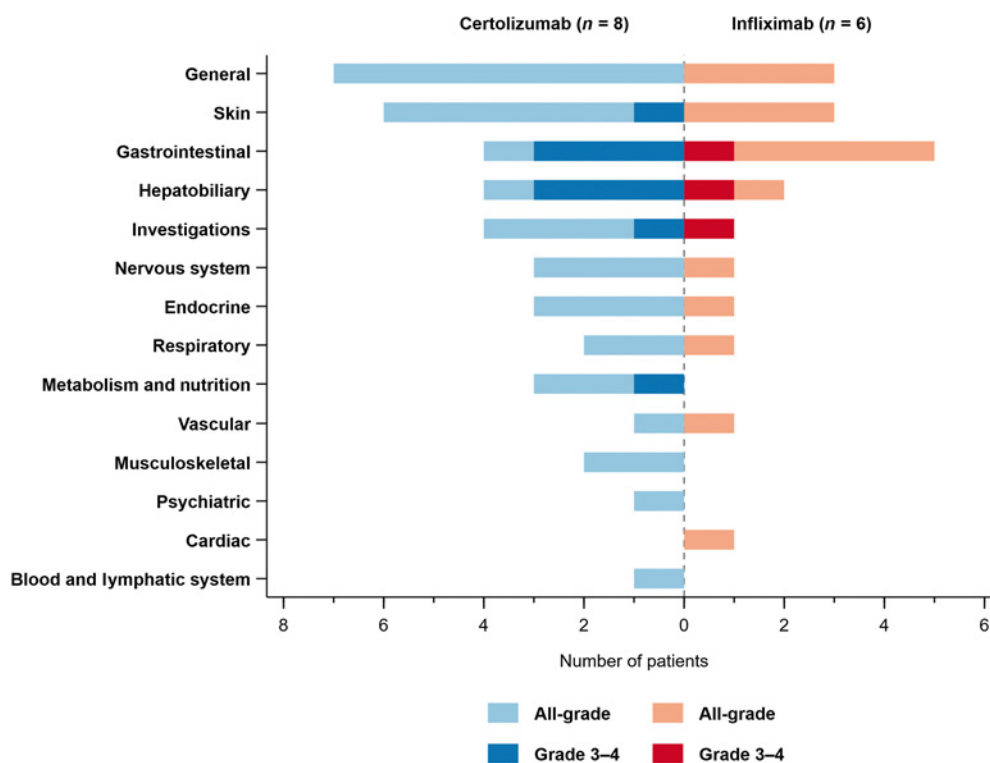


Figure 1. Treatment-related AEs. Number of patients exhibiting treatment-related AEs are represented by system organ in patients with advanced melanoma treated with nivolumab and ipilimumab in combination with certolizumab or infliximab.

Downloaded from <http://aacrjournals.org/clincancerres/article-pdf/27/4/1037/2066851/1037.pdf> by INSERM user on 08 August 2023

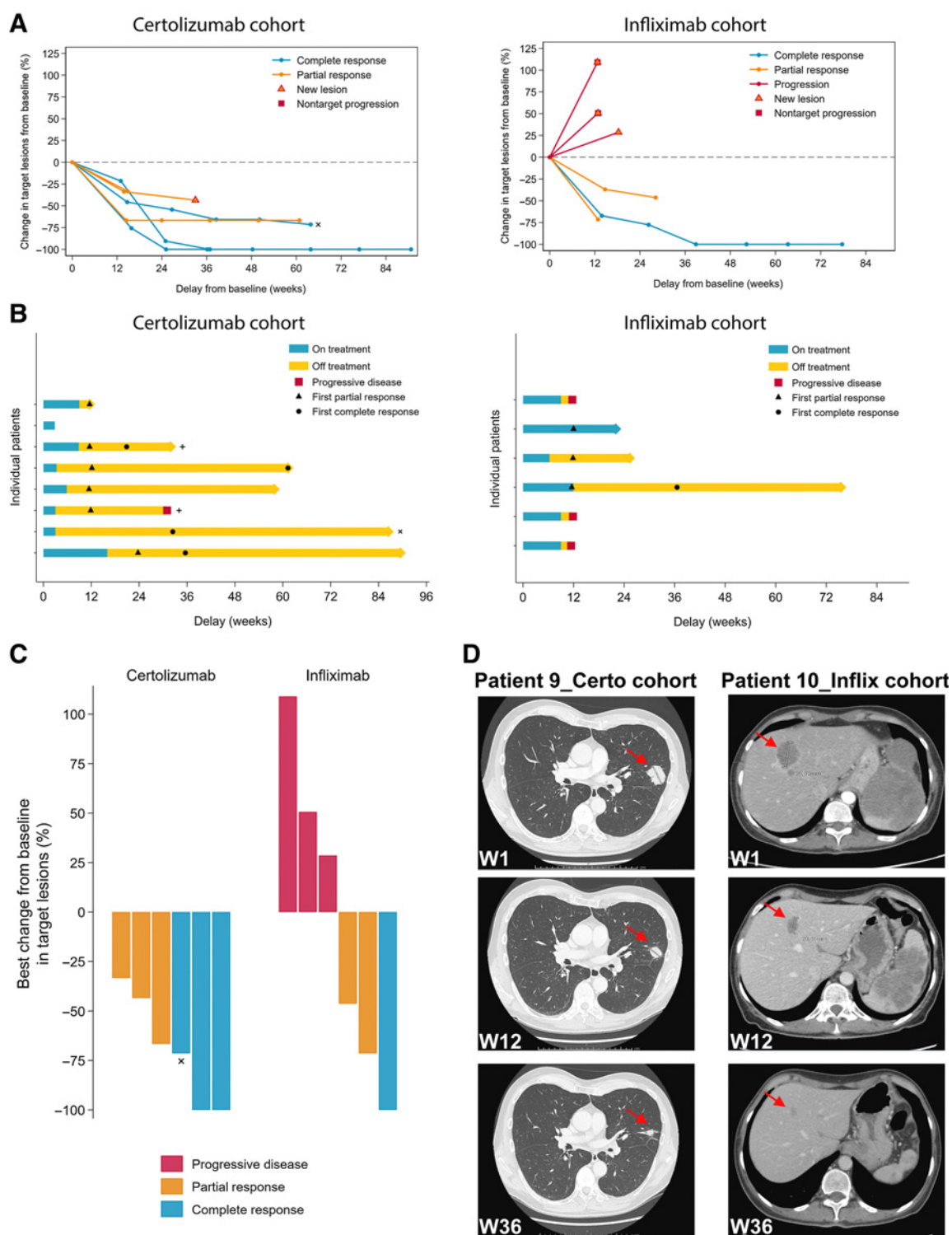


Figure 2. Clear signs of efficacy in patients treated with nivolumab, ipilimumab, and TNF blockers. **A**, Evolution of tumor burden in patients from the certolizumab (left) and infliximab (right) cohorts over time. One patient in complete response from the certolizumab cohort, who was not evaluable as per RECIST at the first two tumor assessments, is not included in this graph. **x**: complete response despite two persistent lymph node lesions (<10 mm). **B**, Evolution of the response in patients from both cohorts over time. **+**: patients still on nivolumab after discontinuation of study treatment; **x**: patient evaluable as per RECIST only at the third assessment. **C**, Best response in all patients. **x**: patient considered in complete response despite two persistent lymph nodes (<10 mm). **D**, CT scan images showing examples of target tumor regression in a patient from the certolizumab cohort with a lung metastasis (patient 9, left) as well as in a patient from the infliximab cohort with a liver metastasis (patient 10, right).

Downloaded from <http://aacrjournals.org/clinccancerres/article-pdf/27/4/1037/2066851/1037.pdf> by INSERM user on 08 August 2023

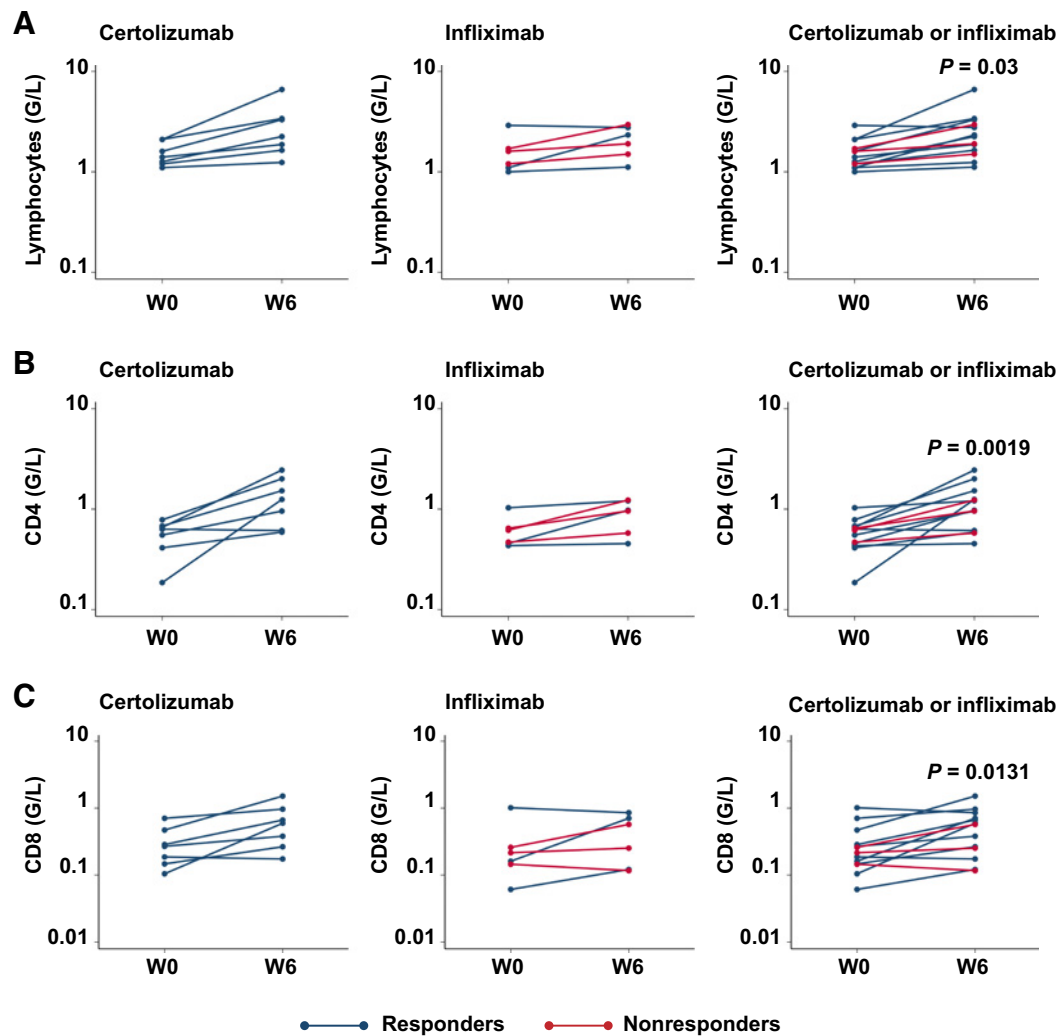


Figure 3.

Increased T-cell numbers in the blood of patients with advanced melanoma treated with nivolumab and ipilimumab in combination with certolizumab or infliximab. **A–C**, Total numbers of lymphocytes, CD4 T cells and CD8 T cells were assessed at baseline (W0) and 6 weeks (W6) following initiation of the treatment protocol. The total number of lymphocytes was assessed by blood count (**A**) and the levels of CD4 (**B**) and CD8 (**C**) T cells in patients' blood were assessed by flow cytometry. Numbers of CD4 and CD8 T cells were extrapolated from the total number of lymphocytes per patient at each time point. Because of the low number of patients, statistical analyses were only performed on data pooled from both cohorts. Highlighted clinical response was evaluated at W12.

certolizumab and infliximab cohorts, respectively, displayed an increase in CD8⁺ TEMRA at W6. Finally, higher numbers of circulating CD8⁺ TEMRA were detected at W6 as compared with W0 when combining results from both cohorts ($P = 0.0071$; Supplementary Figs. S1 and S2).

In addition to the remodeling of systemic T-cell subpopulations, we observed an increase in the proportion and number of proliferating Ki67⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the blood of patients treated with certolizumab and infliximab (Supplementary Tables S7 and S8). These were mainly related to a significant increase in the proportion of proliferating EM T cells and, to a lesser extent, CM T cells when combining both cohorts (Supplementary Tables S7 and S8; Supplementary Figs. S3 and S4).

We next monitored variations in levels of Th1-related cells in the blood of patients from both cohorts. Treatment with ICI therapy combined to either anti-TNF significantly increased both the proportion

and numbers ($P = 0.0022$) of systemic Th1-related cells in all patients (Fig. 4A and B; Supplementary Table S9). We also observed a significant increase in numbers but not percentages of Th1/Th17-, Th2-, and Th17-related cells between W0 and W6 in both cohorts (Supplementary Table S9; Supplementary Figs. S5 and S6). To confirm that ICI therapy combined to anti-TNF promoted Th1 systemic responses in patients we assessed the *ex vivo* production of IFN γ and TNF by CD4⁺ T cells following phorbol 12-myristate 13-acetate/ionomycin stimulation. Most patients from both cohorts [$N = 10$ (76.9%); six (85.7%) patients from the certolizumab cohort and four (66.7%) patients from the infliximab cohort] exhibited increased systemic numbers of PD1⁺IFN γ ⁺TNF⁺ CD4 T cells at W6 ($P = 0.0015$; Fig. 4C and D). Conversely, numbers of circulating PD1⁺IFN γ ⁺TNF⁺ CD8⁺ T cells increased in 4 patients from each cohort (Fig. 4C and D).

Finally, IFN γ and TNF plasma concentrations were monitored. IFN γ levels significantly increased in both cohorts ($P = 0.0024$), 11

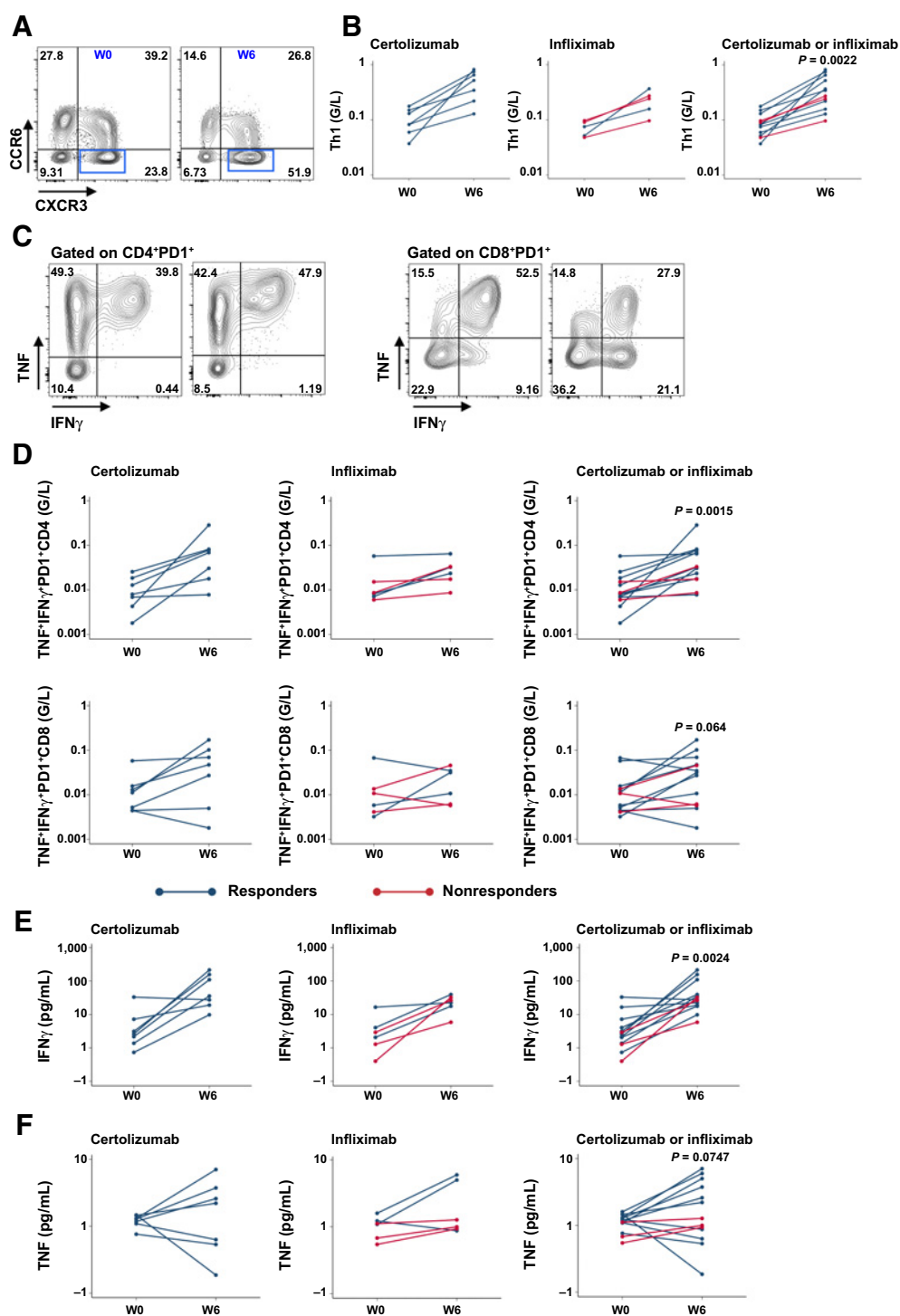


Figure 4.

Increased numbers of Th1-related cells in the blood of patients treated with nivolumab and ipilimumab combined to certolizumab or infliximab. **A** and **B**, The presence of Th1-related cells ($CD4^+CXCR3^+CCR6^-$) was assessed on whole blood from patients at baseline (W0) and 6 weeks (W6) following treatment initiation. Representative example of flow cytometry staining (**A**) and graphs showing the numbers of circulating Th1 cells at W0 and W6 in both cohorts (**B**). Numbers of Th1 cells were extrapolated from the total number of circulating $CD4^+$ T cells at each time point. **C** and **D**, The production of $IFN\gamma$ and TNF by T cells was assessed following polyclonal *ex vivo* restimulation of purified CD4 and CD8 T cells from PBMCs at W0 and W6 by flow cytometry. Representative flow cytometry images (**C**) and summary graphs (**D**) are depicted. $IFN\gamma$ (**E**) and TNF (**F**) cytokine levels assessed in the plasma of patients at W0 and W6 by mesoscale. Because of the low number of patients, statistical analyses were only performed on data pooled from both cohorts. Highlighted clinical response was evaluated at W12.

(84.6%) patients showing an increase of 2-fold or more at W6, including six (46.2%) patients with an increase of 10-fold or more. In sharp contrast, TNF levels increased slightly, five (38.5%) patients showed an increase of 2-fold or more (Fig. 4E and F). We also observed increased plasma levels of IL2 when combining both patient groups ($P = 0.0071$; Supplementary Table S10). No difference in IL6 levels was observed in both cohorts following the two first treatment cycles (Supplementary Table S10).

Analysis of monocyte subpopulations

Certolizumab as well as infliximab-treated patients displayed no significant variation in the proportion and number of both classical ($CD14^+CD16^-$) and nonclassical ($CD14^{low}CD16^+$) circulating monocytes between W0 and W6 (Supplementary Table S11). However, five (71.4%) and six (100%) patients from the certolizumab and infliximab cohorts, respectively, showed decreased proportions of HLA-DR^{low} $CD14^+CD16^-$ monocytes, previously defined as circulating monocytic myeloid-derived suppressor cells (monocytic MDSC). When combining patients from both cohorts, this decrease was found significant as was the increase in the proportion and number of HLA-DR^{high} $CD14^+CD16^-$ monocytes (Supplementary Table S11; Supplementary Figs. S7 and S8).

Discussion

For the first time and despite the low number of patients enrolled in each cohort, we provide evidence for the safety and potential benefits of simultaneously combining ipilimumab and nivolumab to anti-TNF in patients with advanced immune checkpoint blockade-naïve melanoma. Indeed, only one patient from the infliximab cohort exhibited a DLT. In the latest update of the CheckMate 067 study, the combination of nivolumab (1 mg/kg) and ipilimumab (3 mg/kg; Nivo1/Ipi3) to treat patients with metastatic melanoma was reported to induce treatment-related grade 3–4 AEs in 59% of patients (2). With 50% of the infliximab-treated patients developing grade 3–4 treatment-related AEs, our data so far indicate that the tritherapy associating nivolumab and ipilimumab to infliximab is at least as safe as the Nivo1/Ipi3 therapy. With 75% of patients from the certolizumab cohort developing grade 3–4 treatment-related AEs, our results suggest that this combination might display a higher toxicity profile. Importantly, all treatment-related AEs were easily manageable.

Of interest is the high incidence of treatment-related hepatobiliary disorders in patients treated with certolizumab (50%). As a comparison, 33% of patients treated with Nivo1/Ipi3 were previously reported to develop hepatotoxicity (2). Similarly, 33% of patients from the infliximab cohort developed hepatobiliary disorders. Chronic infusion of anti-TNF to patients affected with autoimmune diseases has been associated, in rare cases, with liver toxicity (21, 22). However, these phenomena were mainly observed upon infliximab treatment and are now suggested to also rely on the patient's own genetics. Another potential factor facilitating the occurrence of hepatotoxicity might be the high levels of plasmatic IFN γ found at W6 in patients, especially in the certolizumab cohort. Indeed, IFN γ is known to promote apoptosis of hepatocytes during inflammatory conditions (23). This observation reinforces the hypothesis related to the existence of synergistic signals triggered by the three molecules. Whether and how combining certolizumab to Nivo1/Ipi3 favors the development of such AEs warrants further studies.

Infliximab is currently used for the management of persistent forms of immunotherapy-induced gastrointestinal disorders in patients with cancer (15). This drug can be administered concomitantly with

corticosteroids following ICI interruption. Although anti-TNF are well known anti-inflammatory molecules, four retrospective studies suggested that anti-TNF do not negatively impact patients' survival upon ICI therapy (12, 13, 15, 24). However, a retrospective study associated infliximab to a decreased OS of patients treated with ICIs (14). Although data should be interpreted with caution due to the low number of patients enrolled in the first part of TICIMEL, combining Nivo1/Ipi3 to either certolizumab or infliximab did not impair the response to ICIs. Interestingly, certolizumab seems to provide more clinical and biological evidence of synergistic pharmacodynamic activity than infliximab. Indeed, all evaluable patients from the certolizumab cohort displayed an OR, whereas three of six patients from the infliximab cohort did not respond. So far, four (57%) and one (16.7%) patients from the certolizumab and the infliximab cohorts, respectively, achieved sustained CR. This indicates that TNF is unlikely a critical effector cytotoxic cytokine toward melanoma cells upon ICI therapy.

Interestingly, certolizumab and infliximab combined with ICIs increased the proportion of HLA-DR^{high} $CD14^+CD16^-$ monocytes in the blood of patients, a cell population previously positively associated with response to anti-PD-1 in patients with melanoma (25). Conversely, we observed a decrease in the proportion of HLA-DR^{low} $CD14^+CD16^-$ monocytes previously describe as monocytic MDSCs (26). In addition to decrease the proportion of one immunosuppressive cell population, both tritherapies increased the percentage and numbers of systemic Ki67⁺ proliferating CD4 and CD8 T cells, with the majority of proliferating T cells exhibiting an EM or CM phenotype. Moreover, we observed an increase in peripheral blood Th1-related cells as well as increased numbers of PD-1⁺ TNF⁺ IFN γ ⁺ CD4⁺ T cells, both of which likely promote antitumor immune responses and favor the occurrence of immune-related AEs (23, 27, 28). Strikingly, all patients from both cohorts exhibited a Th1 orientation at W6. We also detected increased numbers of Th2, Th17, and Th1/Th17 cells in patients' blood. However, the proportions of these cells among total T cells did not significantly increase as opposed to what was seen with Th1 cells. These observations, together with the significant increase in plasmatic IFN γ levels following both tritherapies, suggest a reorientation of the systemic immune response toward Th1 responses. Considering that long-term TNF blockade increases Th1 cell levels in the blood of patients affected with autoimmune diseases (29–31), it is tempting to speculate that anti-TNF favor Th1-dependent immune responses, which could be potentiated by ipilimumab and nivolumab combination. Accordingly, our pre-clinical studies demonstrated that TNF deficiency (i) enhanced IFN γ production from leukocytes of tumor-draining lymph nodes upon restimulation by irradiated melanoma cells (8) and (ii) elicited IFN γ expression in murine melanoma tumors, a phenomenon further increased upon anti-PD-1 therapy (10).

Further analyses of the circulating T cells indicate that most patients displayed an increase in EM T cells at W6. Interestingly, the proportion of patients exhibiting an increase of CM T cells and TEMRA was higher in the certolizumab cohort. Thus, both anti-TNF do not identically impact antimelanoma immune responses. Whereas certolizumab and infliximab are potent TNF blockers, the differences we observed on the clinical and biological data may reflect various differences between both molecules. First, certolizumab and infliximab bind to similar but not identical epitopes, which may differentially modulate reverse signalling pathways triggered by membrane TNF engagement. Second, whereas certolizumab is a humanized pegylated Fab', infliximab is a chimeric IgG1, the Fc fragment of which likely modulates immune responses. Finally, while infliximab is

administered intravenously, certolizumab is injected subcutaneously, which may differently impact immune responses (32).

Considering the results obtained in the first part of TICIMEL, our observations suggest that both tri-therapies are safe under our therapeutic regimens and that certolizumab may increase the rate of responders. To further investigate the above-mentioned hypotheses, the second part of our clinical trial will enrol 12 additional patients in the certolizumab cohort and six more patients in the infliximab cohort.

Authors' Disclosures

A. Montfort reports grants from Bristol Myers Squibb, Cancéropôle Grand Sud Ouest, Institut Universitaire du cancer (IUCT-O), Association pour la recherche sur le cancer (ARC), Fondation Toulouse Cancer Santé, and Fondation pour la Recherche médicale during the conduct of the study; grants from Fondation de France and Ligue Régionale contre le cancer (Midi-Pyrénées) outside the submitted work. M. Virazels reports grants from Bristol-Myers Squibb, Cancéropôle Grand Sud-Ouest (GSO), Institut Universitaire du Cancer de Toulouse (IUCT-O), Association pour la Recherche sur le Cancer, Fondation Toulouse Cancer Santé, and Fondation pour la Recherche Médicale during the conduct of the study. C. Dufau reports grants from Bristol-Myers Squibb, Canceropôle Grand Sud-Ouest, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, and Association pour la Recherche sur le Cancer during the conduct of the study. C. Pages reports grants from BMS during the conduct of the study; personal fees from BMS, MSD, and Pierre Fabre outside the submitted work. M. Ayyoub reports grants from Roche/Genentech (imCORE), personal fees from AstraZeneca and Bristol-Myers Squibb outside the submitted work. S. Brayer reports personal fees from Fondation Toulouse Cancer Santé during the conduct of the study. J.-P. Delord reports grants from BMS during the conduct of the study; grants from Genentech, MSD, and AstraZeneca outside the submitted work. N. Andrieu-Abadie reports a patent for US10144772B2 issued, WO2015173259A1 pending, EP3142685B1 issued, ES2748380T3 issued, EP3407911A1 pending, JP2019503384A pending, US20190038763A1 pending, and WO2017129790A1 pending. C. Colacios reports a patent for US10144772B2 issued, WO2015173259A1 issued, EP3142685B1 issued, ES2748380T3 issued, EP3407911A1 pending, JP2019503384A pending, US20190038763A1 pending, and WO2017129790A1 pending. B. Ségui reports grants and personal fees from Bristol-Myers Squibb; grants from Canceropôle Grand Sud-Ouest (GSO), Institut Universitaire du Cancer de Toulouse (IUCT-O), Association pour la Recherche sur le Cancer; personal fees from Fondation Toulouse Cancer Santé and Fondation pour la Recherche Médicale during the conduct of the study; grants and personal fees from Fondation de France and INmune Bio outside the submitted work; in addition, B. Ségui has a patent for US10144772B2 issued, WO2015173259A1 pending, EP3142685B1 issued, ES2748380T3 issued, EP3407911A1 pending, JP2019503384A pending, US20190038763A1 pending, and WO2017129790A1 pending; and published two original papers indicating the putative benefit of TNF blockade in mouse melanoma models: the first paper showed that anti-TNF and host TNF deficiency enhance the CD8 T cell-dependent immune response (Bertrand F, Rochotte J, Colacios C, Montfort A, Tilkin-Mariame AF, Touriol C, et al. Blocking tumor necrosis factor alpha enhances CD8 T-cell-dependent immunity in experimental

melanoma. *Cancer Res* 2015;75:2619–28) and the second paper showed that anti-TNF and host TNF deficiency enhance the efficacy of anti-PD-1 therapy (Bertrand F, Montfort A, Marcheteau E, Imbert C, Gilhodes J, Filleron T, et al. TNFalpha blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. *Nat Commun* 2017;8:2256) and both papers constitute the scientific rationale of the TICIMEL phase Ib clinical trial in patients with advanced melanoma. N. Meyer reports grants from BMS during the conduct of the study; personal fees from BMS, Roche, Novartis, Merck GmBh, and Sun Pharma; grants and personal fees from MSD, Pierre Fabre outside the submitted work; in addition, N. Meyer has a patent for EP3407911A1 pending, JP2019503384A pending, US20190038763A1 pending, and WO2017129790A1 pending. No disclosures were reported by the other authors.

Authors' Contributions

A. Montfort: Formal analysis, investigation, visualization, methodology, writing-original draft, writing-review and editing. T. Filleron: Formal analysis, validation, visualization, methodology, writing-review and editing. M. Virazels: Investigation. C. Dufau: Investigation. J. Milhès: Investigation. C. Pages: Resources. P. Olivier: Formal analysis, validation, writing-review and editing. M. Ayyoub: Validation, methodology, writing-review and editing. M. Mounier: Validation, project administration. A. Lusque: Formal analysis, validation, methodology, writing-review and editing. S. Brayer: Investigation. J.-P. Delord: Conceptualization, writing-review and editing. N. Andrieu-Abadie: Validation, writing-review and editing. T. Levade: Validation, writing-review and editing. C. Colacios: Validation, writing-review and editing. B. Ségui: Conceptualization, supervision, funding acquisition, validation, visualization, writing-original draft, project administration. N. Meyer: Conceptualization, resources, supervision, funding acquisition, validation, investigation, project administration, writing-review and editing.

Acknowledgments

We thank the patients who participated in this study; the clinical research staff, including all subinvestigators, nurses, clinical research associates, data managers, and secretaries. We thank Bristol-Myers Squibb (BMS) for funding the clinical trial and part of the ancillary study. We thank Fondation ARC pour la recherche sur le cancer, Cancéropôle Grand Sud-Ouest (GSO), and Institut Universitaire du cancer Toulouse-Oncopole (IUCT-O) for funding part of the ancillary study. We thank Fondation Toulouse Cancer Santé (FTCS) and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) for covering the salary supports of M. Virazels, S. Brayer and J. Milhès. We thank the IDMC for critical analyses of the results and recommendations. We thank the Délégation à la recherche clinique et à l'innovation (DRCI) du CHU de Toulouse and the technology cluster of the CRCT. We thank the Institut Claudius Regaud members who contributed to the study setting and management.

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

Received September 2, 2020; revised October 27, 2020; accepted November 30, 2020; published first December 3, 2020.

References

- Hodi FS, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Cowey CL, et al. Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2018;19:1480–92.
- Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, et al. Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2019;381:1535–46.
- Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob JJ, Cowey CL, et al. Overall survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2017;377:1345–56.
- Hodi FS, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann KF, McDermott DF, et al. Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016;17:1558–68.
- Spain L, Diem S, Larkin J. Management of toxicities of immune checkpoint inhibitors. *Cancer Treat Rev* 2016;44:51–60.
- Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 2009;9:361–71.
- Montfort A, Colacios C, Levade T, Andrieu-Abadie N, Meyer N, Segui B. The TNF paradox in cancer progression and immunotherapy. *Front Immunol* 2019;10:1818.
- Bertrand F, Rochotte J, Colacios C, Montfort A, Tilkin-Mariame AF, Touriol C, et al. Blocking tumor necrosis factor alpha enhances CD8 T-cell-dependent immunity in experimental melanoma. *Cancer Res* 2015;75:2619–28.
- Bertrand F, Colacios C, Segui B. TNF-R1, an immune checkpoint in melanoma? *Genes Cancer* 2015;6:369–70.
- Bertrand F, Montfort A, Marcheteau E, Imbert C, Gilhodes J, Filleron T, et al. TNFalpha blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. *Nat Commun* 2017;8:2256.
- Perez-Ruiz E, Minute L, Otano I, Alvarez M, Ochoa MC, Belsue V, et al. Prophylactic TNF blockade uncouples efficacy and toxicity in dual CTLA-4 and PD-1 immunotherapy. *Nature* 2019;569:428–32.

12. Lesage C, Longvert C, Prey S, Maanaoui S, Dreno B, Machel L, et al. Incidence and clinical impact of anti-TNF α treatment of severe immune checkpoint inhibitor-induced colitis in advanced melanoma: the mecolit survey. *J Immunother* 2019;42:175–9.
13. Badran YR, Cohen JV, Brastianos PK, Parikh AR, Hong TS, Dougan M. Concurrent therapy with immune checkpoint inhibitors and TNF α blockade in patients with gastrointestinal immune-related adverse events. *J Immunother Cancer* 2019;7:226.
14. Verheijden RJ, May AM, Blank CU, Aarts MJB, van den Berkmortel F, van den Eertwegh AJM, et al. Association of anti-TNF with decreased survival in steroid refractory ipilimumab and anti-PD1-treated patients in the Dutch Melanoma Treatment Registry. *Clin Cancer Res* 2020;26:2268–74.
15. Johnson DH, Zobniw CM, Trinh VA, Ma J, Bassett RL Jr, Abdel-Wahab N, et al. Infliximab associated with faster symptom resolution compared with corticosteroids alone for the management of immune-related enterocolitis. *J Immunother Cancer* 2018;6:103.
16. Montfort A, Dufau C, Colacios C, Andrieu-Abadie N, Levade T, Filleron T, et al. Anti-TNF, a magic bullet in cancer immunotherapy? *J Immunother Cancer* 2019;7:303.
17. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45:228–47.
18. Sznol M, Ferrucci PF, Hogg D, Atkins MB, Wolter P, Guidoboni M, et al. Pooled analysis safety profile of nivolumab and ipilimumab combination therapy in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol* 2017;35:3815–22.
19. Shoushtari AN, Friedman CF, Navid-Azarbaijani P, Postow MA, Callahan MK, Momtaz P, et al. Measuring toxic effects and time to treatment failure for nivolumab plus ipilimumab in melanoma. *JAMA Oncol* 2018;4:98–101.
20. Carlino MS, Long GV. Ipilimumab combined with nivolumab: a standard of care for the treatment of advanced melanoma? *Clin Cancer Res* 2016;22:3992–8.
21. French JB, Bonacini M, Ghabril M, Foureau D, Bonkovsky HL. Hepato-toxicity associated with the use of anti-TNF-alpha agents. *Drug Saf* 2016; 39:199–208.
22. Vollmer O, Felten R, Mertz P, Lebrun-Vignes B, Salem JE, Arnaud L. Characterization of auto-immune hepatitis associated with the use of anti-TNF α agents: an analysis of 389 cases in VigiBase. *Autoimmun Rev* 2020;19:102460.
23. Horras CJ, Lamb CL, Mitchell KA. Regulation of hepatocyte fate by interferon- γ . *Cytokine Growth Factor Rev* 2011;22:35–43.
24. Favara DM, Spain L, Au L, Clark J, Daniels E, Diem S, et al. Five-year review of corticosteroid duration and complications in the management of immune checkpoint inhibitor-related diarrhoea and colitis in advanced melanoma. *ESMO Open* 2020;5:e000585.
25. Krieg C, Nowicka M, Guglietta S, Schindler S, Hartmann FJ, Weber LM, et al. High-dimensional single-cell analysis predicts response to anti-PD-1 immunotherapy. *Nat Med* 2018;24:144–53.
26. Mengos AE, Gastineau DA, Gustafson MP. The CD14(+)/HLA-DR(lo/neg) monocyte: an immunosuppressive phenotype that restrains responses to cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2019;10:1147.
27. Wei SC, Levine JH, Cogdill AP, Zhao Y, Anang NAS, Andrews MC, et al. Distinct cellular mechanisms underlie anti-CTLA-4 and anti-PD-1 checkpoint blockade. *Cell* 2017;170:1120–33.
28. Imam T, Park S, Kaplan MH, Olson MR. Effector T helper cell subsets in inflammatory bowel diseases. *Front Immunol* 2018;9:1212.
29. Dulic S, Vasarhelyi Z, Sava F, Berta L, Szalay B, Toldi G, et al. T-cell subsets in rheumatoid arthritis patients on long-term anti-TNF or IL-6 receptor blocker therapy. *Mediators Inflamm* 2017;2017:6894374.
30. Dulic S, Vasarhelyi Z, Bajnok A, Szalay B, Toldi G, Kovacs L, et al. The impact of anti-TNF therapy on CD4+ and CD8+ cell subsets in ankylosing spondylitis. *Pathobiology* 2018;85:201–10.
31. Talotta R, Berzi A, Atzeni F, Batticciotto A, Clerici M, Sarzi-Puttini P, et al. Paradoxical expansion of Th1 and Th17 lymphocytes in rheumatoid arthritis following infliximab treatment: a possible explanation for a lack of clinical response. *J Clin Immunol* 2015;35:550–7.
32. Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H, Ueda N. Molecular mechanisms of action of anti-TNF-alpha agents - Comparison among therapeutic TNF-alpha antagonists. *Cytokine* 2018;101:56–63.

Impact des anti-TNF sur la réponse aux immunothérapies dans le mélanome murin

Contexte

En parallèle de mon travail translationnel sur les essais cliniques TICIMEL et MELANF α , j'ai utilisé des modèles murins de mélanome pour mimer les traitements administrés aux patients et ainsi comparer leurs effets sur l'immunité antitumorale chez la souris. J'ai principalement utilisé le modèle de mélanome transplantable B16-OVA : des cellules B16F10 modifiées pour exprimer l'ovalbumine (OVA) et j'ai traité les souris selon un protocole visant à se rapprocher au mieux des régimes de traitement utilisés en clinique.

Ces expériences font suite aux travaux de mon équipe qui démontrèrent que l'inhibition du TNF améliore l'efficacité des anti-PD-1 dans le modèle de mélanome B16K1 (B16F10 surexprimant le CHM-I) et dans des modèles de cancer du sein (4T1) et du poumon (LLC)^{459,461}. L'équipe d'Ignacio Melero a ensuite confirmé qu'inhiber le TNF améliorerait l'efficacité de la combinaison anti-PD-1 + anti-CTLA-4 dans des modèles de cancer du côlon (MC38) et de mélanome (B16-OVA), tout en diminuant la toxicité associée à ce traitement dans un modèle de colite induite par le DSS³⁰⁵. Durant ma thèse, j'ai comparé les effets de la bithérapie (anti-PD-1 + anti-CTLA-4) et ceux de la trithérapie (anti-PD-1 + anti-CTLA-4 + anti-TNF) sur les réponses immunitaires dans la tumeur et le ganglion drainant, en m'intéressant particulièrement aux lymphocytes T.

Matériel & Méthodes

Culture cellulaire

Les cellules **B16-OVA** nous ont été gracieusement fournies par le Pr François Ghiringhelli. Elles ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gibco) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (PAN Biotech). Les cellules **1014** nous ont été gracieusement fournies par le Dr Lionel Larue. Elles ont été cultivées dans du milieu Ham's F12 (Sigma) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules **Yumm1.7** nous ont été gracieusement fournies par le Dr Marcus Bosenberg. Elles ont été cultivées dans du milieu Opti-MEM (Gibco) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal. Toutes les lignées cellulaires ont été décongelées, amplifiées et testées pour les contaminations par mycoplasmes avant chaque expérience *in vivo*.

Souris

Les souris utilisées pour ce travail étaient des femelles C57BL/6j provenant de chez Janvier Labs et âgées de 7 à 9 semaines au début de chaque expérience. Elles ont été hébergées et manipulées dans des conditions SPF et euthanasiées par dislocation cervicale sous anesthésie par isoflurane. Elles ont été épilées sur le flanc droit à l'aide d'une tondeuse pour rongeur la veille de chaque expérience. Elles ont été injectées avec 3×10^5 cellules B16-OVA ou Yumm1.7 ou 10^6 cellules 1014 en intradermique dans le flanc droit sous anesthésie par isoflurane. La taille des tumeurs a été mesurée trois fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse et le volume tumoral a été estimé par formule suivante : $V = 0,52 * L * l^2$

Traitements

Une fois les tumeurs palpables, les groupes de souris ont été homogénéisés en fonction de la moyenne du volume tumoral et les souris ont été traitées par l'injection d'anticorps bloquants (Tableau 6) dilués dans du PBS (Eurobio Scientific). Les souris contrôles ont été injectées avec du PBS.

| Cible | Clone | Référence | Fournisseur | Dose |
|---------------|---------|-----------|-------------|---|
| PD-1 | RMP1-14 | BE0146 | Bio X Cell | 200 µg |
| CTLA-4 | 9H10 | BP0131 | Bio X Cell | 200 µg pour la première injection puis 100 µg |
| TNF | XT3.11 | BE0058 | Bio X Cell | 200 µg |

Tableau 6 : Anticorps thérapeutiques utilisés chez la souris

Analyse des populations circulantes

Les prélèvements de sang ont été effectués par le personnel de la zootechnie expérimentale du CREFRE. 60 µL de sang ont été incubés avec des anticorps fluorescents (Tableau 7) pendant 30 min à température ambiante. Les globules rouges ont été lysés avec le tampon *Pharm Lyse* (BD). Les cellules mortes ont ensuite été marquées avec du *Live/Dead aqua* (Thermo Fisher). Le kit *Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set* (Thermo Fisher) a été utilisé pour marquer les cibles intracellulaires. Les cellules ont ensuite été rincées puis fixées et analysées le lendemain sur un LSR Fortessa X-20 (BD).

Analyse de l'infiltrat immunitaire et du ganglion drainant la tumeur

Les souris ont été euthanasiées puis la tumeur et le ganglion drainant la tumeur ont été prélevés puis conservés dans la glace. Les tumeurs ont été pesées puis découpées à l'aide de ciseaux directement dans un tube de dissociation *C Tube* (Miltenyi). Elles ont ensuite été dissociées en utilisant le *Tumor Dissociation Kit mouse* (Miltenyi) et le programme 37C_m_TDK_1 sur un *gentleMACS Octo Dissociator* (Miltenyi). Les ganglions ont été dissociés sur un filtre 40 µm à l'aide du piston d'une seringue. Les cellules ont été rincées, filtrées puis comptées avant d'être incubées avec des anticorps fluorescents (Tableau 7) pendant 30 min dans de la glace. Le kit *Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set* (Thermo Fisher) a été utilisé pour marquer les cibles intracellulaires. Des pentamères H-2Kb SIINFEKL fluorescents (ProImmune) ont été utilisés pour marquer les lymphocytes T CD8 spécifiques de l'ovalbumine. Les cellules ont ensuite été rincées puis fixées et analysées le lendemain sur un LSR Fortessa X-20 (BD).

Séquencage d'ARN des tumeurs

Les souris ont été euthanasiées puis les tumeurs ont été prélevées puis conservées dans la glace. Elles ont été pesées puis transférées dans un tube de dissociation *Lysing Matrix D, 2mL* (MP Biomedicals) contenant 1 mL de tampon RLT (Qiagen) + 1% de β-mercaptoéthanol puis dissociées sur un *Precellys Evolution* (Bertin Technologies). L'ARN a été extrait de l'homogénat tumoral grâce au *RNeasy Midi Kit* (Qiagen). La qualité des ARN a été contrôlée puis ils ont été séquencés par le Pôle Technologique du CRCT.

Analyses statistiques

Les données de cytométrie ont été analysées avec le logiciel FlowJo 10. Les analyses statistiques ont été réalisées avec GraphPad Prism 9. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM. Pour chaque comparaison un test de normalité a été effectué (D'Agostino). Pour les comparaisons de deux groupes, un test de Student ou de Mann-Witney a été réalisé en fonction de la distribution des données. Pour les comparaisons de trois groupes, une Anova à un facteur ou un test de Kruskal Wallis a été effectué en fonction de la distribution des données. Une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme significative. * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; **** p<0,0001

| Cible | Fluorochrome | Clone | Fabricant |
|--------------------------|--------------|----------|---------------|
| CD45 | BUV395 | 30-F11 | BD |
| CD3 | BV711 | 17A2 | Biolegend |
| TCR- β | BV711 | H57-597 | BD |
| CD4 | BUV496 | GK1.5 | BD |
| CD8a | BV605 | 53-6.7 | Biolegend |
| FoxP3 | eF450 | FJK-16s | Invitrogen |
| FoxP3 | APC | FJK-16s | Invitrogen |
| Ki67 | FITC | B56 | BD |
| CD39 | AF700 | 24DMS1 | Invitrogen |
| CTLA-4 | APC | UC10-4B9 | eBioscience |
| CD120b | PE | TR75-89 | BD |
| GITR | BV510 | DTA-1 | BD |
| Pentamere H-2Kb SIINFEKL | PE | na | Prolimmune |
| PD-1 | FITC | J43 | Invitrogen |
| PD-1 | BV510 | J43 | BD |
| TIM-3 | PE-Cy7 | RMT3-23 | Invitrogen |
| Slamf6 (Ly-108) | BV421 | 13G3 | BD |
| Live/Dead aqua | na | na | Thermo Fisher |
| Zombie NIR | na | na | Biolegend |

Tableau 7 : Réactifs fluorescents utilisés pour les analyses de cytométrie en flux

1. L'inhibition du TNF améliore l'efficacité de la combinaison anti-PD-1 et anti-CTLA-4

J'ai greffé des souris C57BL/6j femelles avec 3×10^5 cellules B16-OVA par injection intradermique dans le flanc droit. Une fois la tumeur palpable, j'ai homogénéisé les groupes selon la moyenne du volume tumoral et j'ai traité les souris avec quatre injections d'anti-PD-1 + anti-CTLA-4 ± anti-TNF, ou de PBS pour les souris contrôles, suivies par trois injections d'anti-PD-1 ± anti-TNF sans anti-CTLA-4 (Fig. 31 a) ; ceci afin de mimer le protocole de traitement des patients inclus dans TICIMEL⁴⁶² et dans la cohorte bithérapie (ipilimumab+nivolumab) de MELANF α . J'ai ensuite mesuré les tumeurs trois fois par semaine et suivi la survie des souris dans le temps.

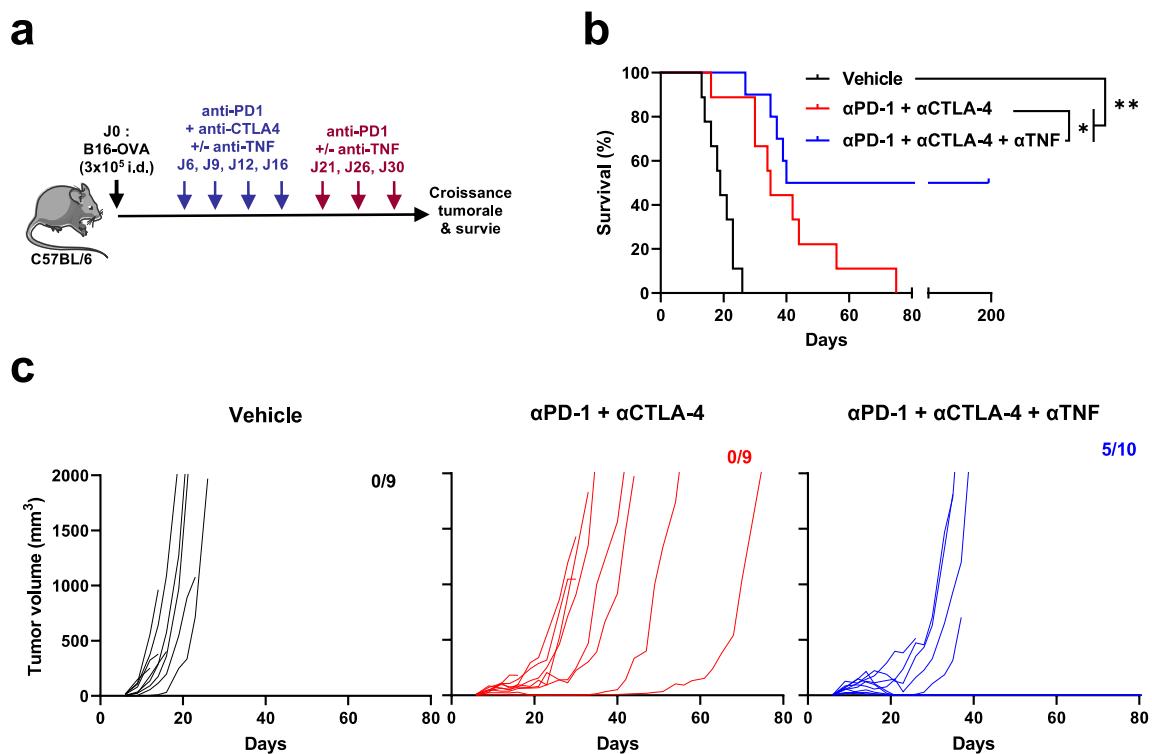


Figure 31 : L'inhibition du TNF améliore l'efficacité de la combinaison anti-PD-1 et anti-CTLA-4 dans un modèle de mélanome murin

(a) Protocole expérimental : 3×10^5 cellules B16-OVA sont greffées en intradermique dans le flanc de souris C57BL/6. Traitement avec 4 injections intrapéritonéales d'anticorps anti-PD-1 (α PD-1) + anti-CTLA-4 (α CTLA-4) +/- anti-TNF (α TNF) ou contrôles (Vehicle : PBS) aux jours 6, 9, 12 et 16 ainsi que 3 injections α PD-1 +/- α TNF aux jours 21, 26 et 30 (n=9-10 par groupe). (b) La survie des souris a été suivie pendant 200 jours. (c) Courbes de croissance tumorale individuelle pour chaque groupe. Les fractions représentent le nombre de souris en réponse complète à l'issue de l'expérience sur le nombre de souris dans le groupe. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Log-rank test.

Les tumeurs ont rapidement progressé chez les souris contrôles et toutes ont atteint le point limite autorisé par le comité d'éthique en expérimentation animale (2000 mm³) en une vingtaine de jours (Fig. 31 b-c). Les souris traitées par bithérapie ont toutes répondu au traitement et la croissance tumorale a été ralentie mais toutes les tumeurs ont fini par échapper (Fig. 31 b-c). Les souris traitées par trithérapie ont elles aussi toutes répondu au traitement initialement et la moitié des tumeurs ont fini par échapper. Cependant, l'autre moitié des tumeurs a complètement régressé et n'a pas résisté au traitement (Fig. 31 b-c). 50% des souris traitées par trithérapie ont donc survécu pendant plus de 200 jours, ce qui confirme le bénéfice apporté par l'inhibition du TNF sur l'efficacité des ICI dans ce modèle et nos conditions expérimentales.

Pendant ce protocole de traitement, j'ai comparé l'effet de la bithérapie et de la trithérapie sur les proportions et le phénotype des lymphocytes T circulants. Du sang a donc été prélevé au niveau de la veine jugulaire de chaque souris avant (jour 5), pendant (jour 13) et à la fin du traitement (jour 33) afin d'étudier les populations circulantes par cytométrie en flux. À noter que les souris du groupe contrôle n'ont pas survécu jusqu'au jour 33 (Fig. 32 a).

Les proportions de CD8, CD4 conventionnels (CD4_{conv}, CD4⁺FoxP3⁻) et de T_{reg} (CD4⁺FoxP3⁺), parmi les lymphocytes T, sont restées relativement stables pendant le traitement. Chez les souris traitées par bithérapie et trithérapie, la proportion de CD8 a sensiblement diminué entre le jour 13 et le jour 33 tandis que la proportion de CD4_{conv} a augmenté (Fig. 32 b-c). La proportion de T_{reg} a aussi légèrement diminué entre le jour 13 et le jour 33 chez les souris traitées par bithérapie (Fig. 32 d). Parmi ces populations, j'ai évalué l'expression de Ki67 qui reflète la prolifération cellulaire. Avant traitement, la proportion de CD8 et de CD4_{conv} proliférant était faible tandis que la majorité des T_{reg} exprimaient Ki67. Les traitements par bithérapie ou trithérapie induisent une augmentation transitoire de la prolifération des CD8 et des CD4_{conv} circulants mais pas des T_{reg}. Cependant aucune différence n'était observable entre la bithérapie et la trithérapie, selon ces paramètres. J'ai aussi étudié PD-1, CTLA-4, CD39 et T-bet lors de cette expérience mais leur expression était quasi-nulle ou inchangée parmi les populations circulantes (non montré).

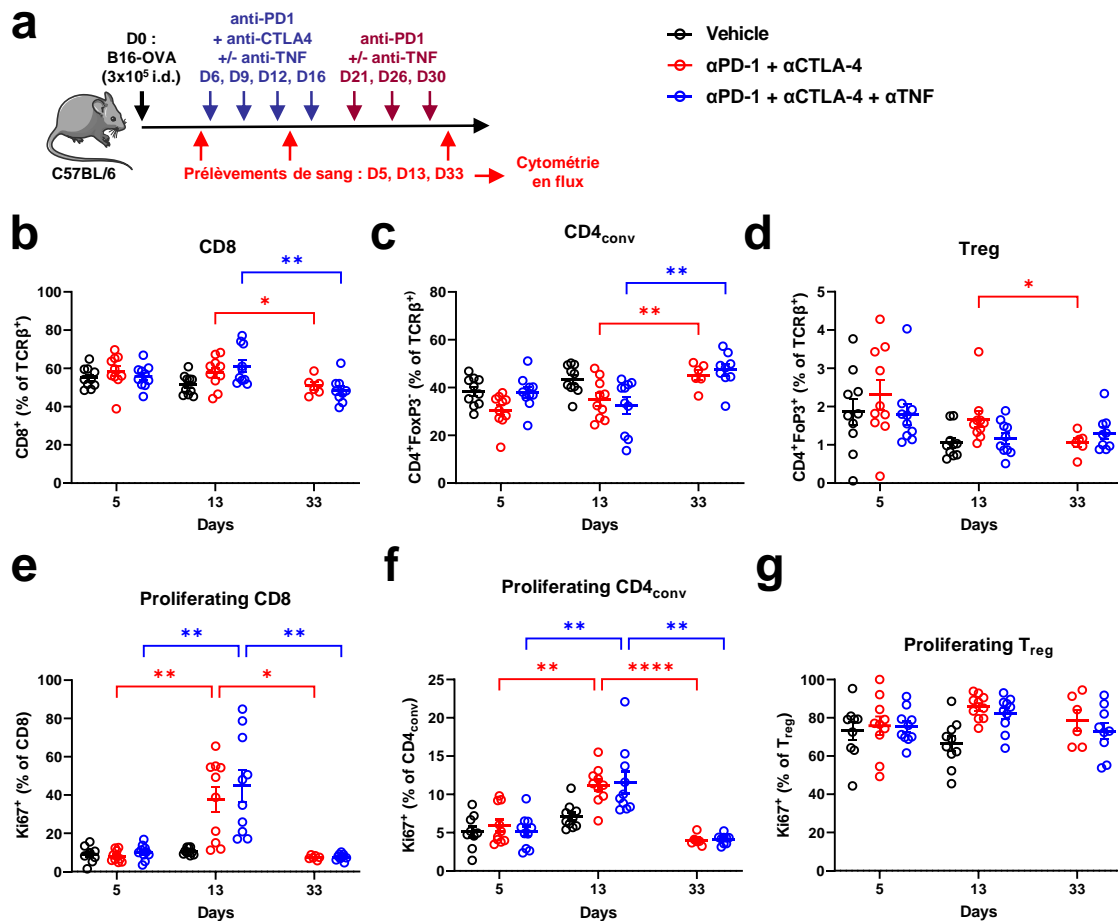


Figure 32: L'inhibition du TNF n'influe pas sur les proportions de lymphocytes circulants et leur prolifération chez les souris traitées par anti-PD-1 et anti-CTLA-4

(a) Protocole expérimental : 3×10^5 cellules B16-OVA sont greffées en intradermique dans le flanc de souris C57BL/6. Traitement avec 4 injections intrapéritonéales d'anticorps anti-PD-1 (α PD-1) + anti-CTLA-4 (α CTLA-4) +/- anti-TNF (α TNF) ou contrôles (Vehicle) aux jours 6, 9, 12 et 16 ainsi que 3 injections α PD-1 +/- α TNF aux jours 21, 26 et 30 ($n=9-10$ par groupe). La veille du premier traitement (jour 5), pendant le traitement (jour 13) et après le dernier traitement (jour 33), du sang de chaque souris a été prélevé au niveau de la veine jugulaire et les lymphocytes CD8, CD4 conventionnels ($CD4^+FoxP3^-$) et les T_{reg} ($CD4^+FoxP3^+$) ont été analysés par cytométrie en flux. (a-b) Proportions de CD8 circulants (a) et parmi eux de CD8 proliférant ($Ki67^+$) (b), avant (jour 5), pendant (jour 13) et après traitement (jour 33). (c-d) Proportions de CD4 conventionnels circulants (c) et parmi eux de CD4 conventionnels proliférant ($Ki67^+$) (d), avant (jour 5), pendant (jour 13) et après traitement (jour 33). (e-f) Proportions de T_{reg} circulants (e) et parmi eux de T_{reg} proliférant ($Ki67^+$) (f), avant (jour 5), pendant (jour 13) et après traitement (jour 33). Les souris du groupe contrôle n'ont pas survécu jusqu'au jour 33. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; Mixed-effects analysis.

J'ai ensuite étudié la mémoire immunologique des souris survivantes à cette première expérience envers les tumeurs B16-OVA. Après plus de 200 jours, j'ai de nouveau injecté 3×10^5 cellules B16-OVA dans le flanc droit des souris survivantes sans nouveau traitement. J'ai aussi injecté cinq souris naïves contrôles avec le même nombre de cellules (Fig. 33 a).

Comme attendu, les tumeurs des souris contrôles ont progressé très rapidement et j'ai sacrifié toutes les souris avant le jour 20 (Fig. 33 b-c). Parmi les cinq souris qui avaient survécu à la première expérience, deux ont développé une tumeur de façon retardée et lente en comparaison aux souris contrôles (Fig. 33 c). Trois souris n'ont pas du tout développé de tumeur

pendant les 180 jours qui ont suivi (Fig. 33 b-c). Cette expérience montre donc qu'après avoir survécu à une première injection de tumeurs B16-OVA, les souris traitées par anti-PD-1 + anti-CTLA-4 + anti-TNF ont développé une mémoire immunologique envers ces tumeurs.

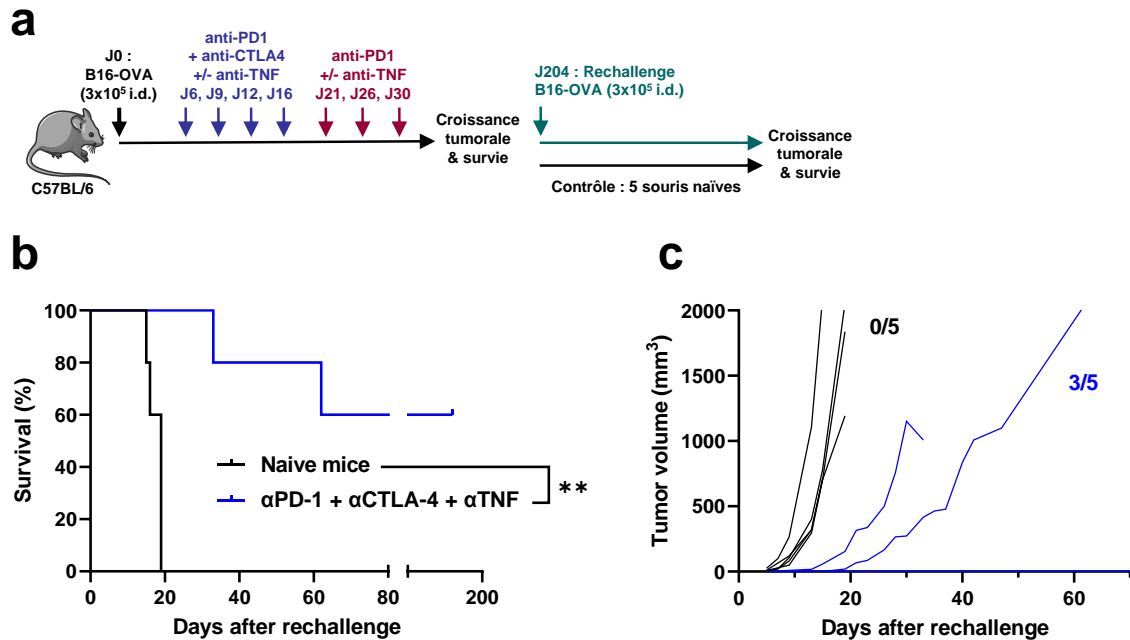


Figure 33 : La trithérapie confère une mémoire immunologique à long terme

(a) Protocole expérimental : après plus de 200 jours, les souris survivantes (n=5) à une première injection de cellules tumorales, sont de nouveau greffées avec la même quantité de cellules B16-OVA. Cinq souris naïves sont greffées dans les mêmes conditions comme groupe contrôle. Dans cette expérience de rechallenge, les souris ne sont pas de nouveau traitées. (b) Courbes de survie des souris survivantes de la première expérience et de souris naïves après rechallenge. (c) Courbes de croissance tumorale individuelle pour chaque groupe après rechallenge. Les fractions représentent le nombre de souris ayant rejeté la tumeur à l'issue de l'expérience sur le nombre de souris dans le groupe. ** p<0,01 ; Log-rank test.

2. La trithérapie diminue la proportion de T_{reg} et augmente le ratio $CD8 / T_{reg}$ dans la tumeur

Pour étudier les mécanismes impliqués dans l'amélioration de la réponse avec la trithérapie, j'ai évalué l'effet des traitements sur les réponses immunitaires intratumorales et dans le ganglion drainant la tumeur, aux jours 12, 17 et 19 (J12, J17, J19) après l'inoculation des B16-Ova (Fig. 34 a). Sans traitement, les souris ont une survie très courte et cela m'a empêché d'avoir un groupe contrôle aux jours 17 et 19 de manière reproductible. Je me suis donc concentré sur la comparaison entre la bithérapie et la trithérapie pour ces temps.

Parmi les lymphocytes T, j'ai observé que la bithérapie induit une infiltration plus importante des CD8 tout en diminuant l'infiltration des T_{reg} (Fig. 34 b-c). La proportion de

CD4_{conv} semble légèrement diminuée (Fig. 34 d). La trithérapie n'apporte pas d'effet supplémentaire sur les proportions de CD8 et CD4_{conv} (Fig. 34 b-c). Elle est néanmoins associée à une diminution de la proportion de T_{reg} dans la tumeur au jour 19, mais pas avant (Fig. 34 d). Le ratio entre les lymphocytes T CD8 et les T_{reg} dans la tumeur, qui reflète une réponse antitumorale efficace¹³⁹⁻¹⁴¹, est plus important avec la trithérapie comparée aux souris contrôles à J12, sans que je puisse mettre en évidence une augmentation significative comparée avec la bithérapie. A J19, par contre, ce ratio est plus que doublé avec la trithérapie comparée à la bithérapie (Fig. 34 e). Malheureusement, le panel d'anticorps que j'ai utilisé au jour 17 ne permet pas de calculer ce ratio. Pour évaluer si la trithérapie a un effet sur le phénotype fonctionnel des T_{reg}, j'ai étudié l'expression de plusieurs marqueurs associés à leur capacité immunosuppressive : GITR, CTLA-4, CD120b et CD39¹³⁶. Bien que l'expression de chaque marqueur pris individuellement est similaire avec la bithérapie et la trithérapie (non montré), la proportion de T_{reg} exprimant simultanément GITR, CTLA-4, CD120b et CD39 est plus faible avec la trithérapie à J17 (Fig. 34 f). Ceci pourrait refléter une diminution de la proportion des cellules les plus immunosuppressives parmi les T_{reg} infiltrant la tumeur chez les souris traitées avec la trithérapie.

Lors de ces mêmes expériences, j'ai analysé les ganglions drainant la tumeur par cytométrie en flux pour évaluer l'impact des traitements sur l'immunité périphérique. La bithérapie comme la trithérapie induisent la prolifération des CD8 et des T_{reg} dans le ganglion drainant au jour 12 (Fig. 35 a). La trithérapie induit une augmentation significative de la proportion de CD4_{conv} proliférant, ce qui n'est pas le cas de la bithérapie (Fig. 35 a). Cependant, seule la proportion de T_{reg} augmente en réponse à la bithérapie et la trithérapie (Fig. 35 b) tandis que les proportions de CD8 et CD4_{conv} restent stables au jour 12, ce qui illustre probablement la sortie des lymphocytes nouvellement activés du ganglion et leur recirculation. La modulation des populations lymphocytaires dans le ganglion drainant la tumeur n'explique donc pas la différence d'efficacité observée entre la bithérapie et la trithérapie.

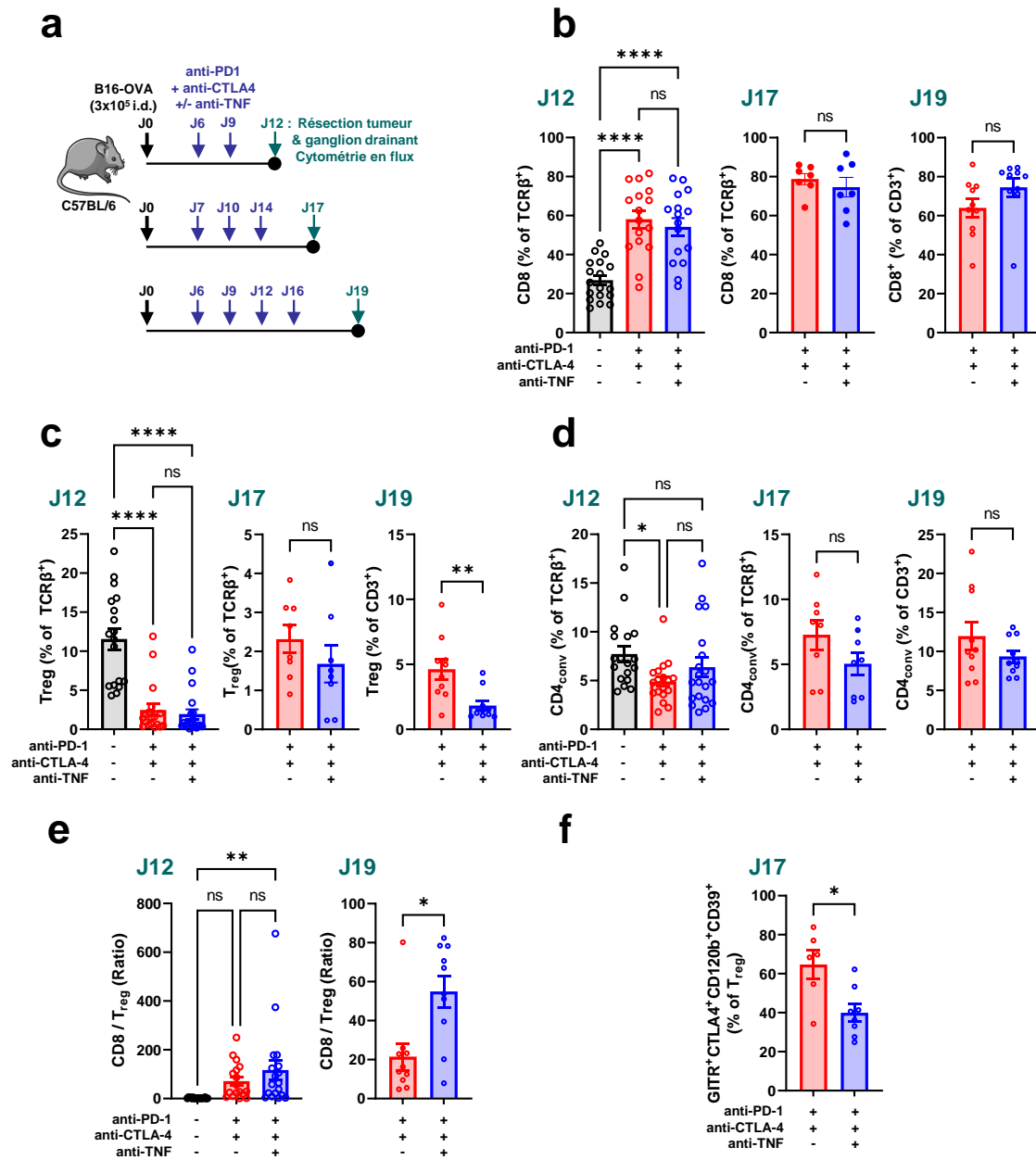


Figure 34 : L'inhibition du TNF diminue la proportion de T_{reg} infiltrant la tumeur mais ne remodèle pas les proportions de lymphocytes T CD8 et CD4 conventionnels

(a) Protocole expérimental : 3×10^5 cellules B16-OVA sont greffées en intradermique dans le flanc de souris C57BL/6. Traitement avec 2, 3 ou 4 injections intrapéritonéales d'anticorps anti-PD-1 (α PD-1) + anti-CTLA-4 (α CTLA-4) +/- anti-TNF (α TNF) ou contrôles (Vehicle) avant que les tumeurs ne soient prélevées après sacrifices des souris au jour 12 (J12, $n=16-18$, deux expériences indépendantes), au jour 17 (J17, $n=7-8$) ou au jour 19 (J19, $n=10$). Les lymphocytes T CD8, CD4 conventionnels ($CD4_{conv}$, $CD4^+FoxP3^-$) et les T_{reg} ($CD4^+FoxP3^+$) infiltrant ont été analysés par cytométrie en flux. Les proportions de CD8 (b), T_{reg} (c) et de $CD4_{conv}$ (d) ont été évaluées parmi les lymphocytes T à J12, J17 et J19. (e) Le rapport entre les proportions de CD8 et de T_{reg} a été calculé à J12 et J19. (f) La proportion de T_{reg} exprimant les marqueurs d'immunosuppression GITR, CTLA-4, CD120b et CD39 a été évaluée à J17. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. J12, One-way Anova ou Kruskal Wallis en fonction de la normalité de la distribution des données (D'agostino). J17 et J19, test de Student ou Mann-Whitney en fonction de la normalité de la distribution des données (D'agostino ou Shapiro).

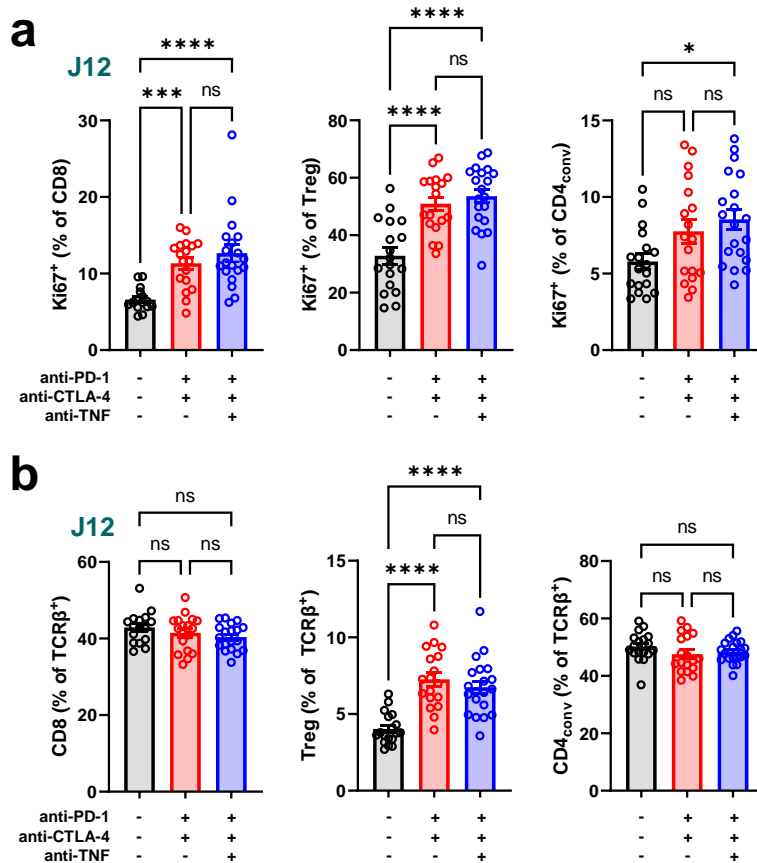


Figure 35 : La bithérapie et la trithérapie induisent la prolifération des lymphocytes T dans le ganglion drainant la tumeur

3x10⁶ cellules B16-OVA sont greffées en intradermique dans le flanc de souris C57BL/6. Traitement avec 2 injections intrapéritonéales d'anticorps anti-PD-1 (αPD-1) + anti-CTLA-4 (αCTLA-4) +/- anti-TNF (αTNF) ou contrôles (Vehicle) avant que les lymphocytes infiltrant la tumeur ne soient analysés au jour 12. **(a et b)** Les proportions de lymphocytes T CD8, CD4 conventionnels (CD4_{conv}, CD4⁺FoxP3⁻) et de T_{reg} (CD4⁺FoxP3⁺) **(b)** ainsi que leur prolifération (Ki67⁺) **(a)** ont été évaluées par cytométrie en flux. * p<0,05 ; *** p<0,001 ; **** p<0.0001. n=16-18, deux expériences indépendantes. One-way Anova ou Kruskal Wallis en fonction de la normalité de la distribution des données (D'agostino).

3. La trithérapie semble favoriser l'expansion des précurseurs épuisés dans le ganglion drainant la tumeur

Les CD8 spécifiques d'antigènes tumoraux sont essentiels pour contrôler la tumeur puisque l'activité cytotoxique des CD8 dépend de la reconnaissance de leur antigène cible présenté sur le CMH-I⁸¹. L'utilisation du modèle de mélanome B16-OVA permet d'étudier la réponse spécifique des lymphocytes T pour l'antigène modèle qu'est l'OVA. J'ai donc essayé de marquer les CD8 spécifiques de l'OVA à l'aide de pentamère de complexes CMH-I:peptide fluorescents et analysables par cytométrie en flux. Au jour 17, la proportion de CD8 spécifiques de l'OVA (pentamère⁺) était faible parmi les CD8 infiltrant la tumeur et je n'ai pas détecté de

différence significative dans la proportion de CD8 spécifiques entre les souris traitées avec la bithérapie et la trithérapie (Fig. 36 a). Des études récentes rapportent que parmi les CD8 infiltrant la tumeur, l'expression de CD39 caractérise les cellules spécifiques d'antigènes tumoraux^{463,464}. J'ai donc évalué l'expression de CD39 à la surface des CD8 au jour 17 et constaté que la majorité des CD8 retrouvés dans la tumeur expriment CD39 chez les souris traitées par bithérapie ou trithérapie (Fig. 36 b). L'inhibition du TNF ne semble donc pas avoir d'impact sur la proportion de CD8 spécifiques qui infiltrent la tumeur.

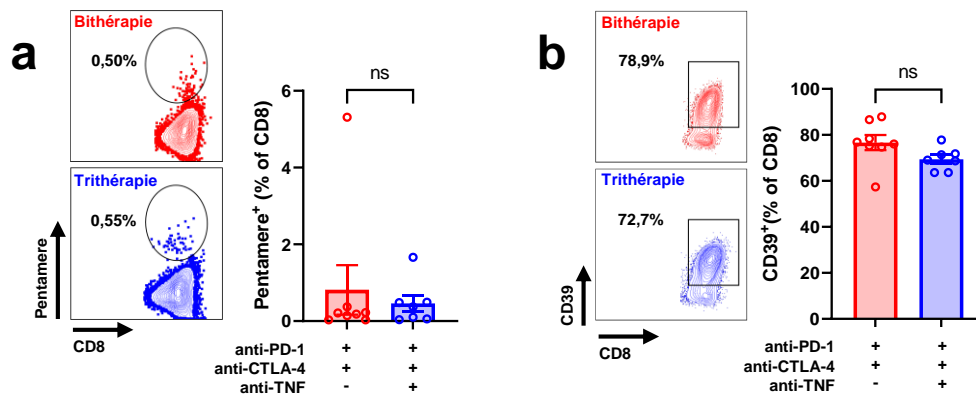


Figure 36 : La trithérapie ne semble pas influencer sur la proportion de CD8 spécifiques dans la tumeur

3x10⁵ cellules B16-OVA sont greffées en intradermique dans le flanc de souris C57BL/6. Traitement avec 3 injections intrapéritonéales d'anticorps anti-PD-1 (αPD-1) + anti-CTLA-4 (αCTLA-4) +/- anti-TNF (αTNF) avant que les tumeurs ne soient réséquées au jour 17. Les proportions de lymphocytes CD8 spécifiques de l'ovalbumine (a) et exprimant CD39 (b) ont été analysés par cytométrie en flux. n=7-8, test de Mann-Whitney.

L'échec de l'immunité antitumorale est en grande partie due à l'épuisement des lymphocytes spécifiques d'antigènes tumoraux qui est caractérisé par la perte de fonction effectrice et l'expression de récepteurs inhibiteurs comme PD-1 et TIM-3^{106,109}. J'ai donc étudié l'expression de PD-1 et TIM-3 à la surface des CD8 et des CD4_{conv}. La bithérapie et la trithérapie induisent l'augmentation de la proportion de CD8 PD-1⁺TIM-3⁺ infiltrant la tumeur, de façon comparable (Fig. 37 a), mais il existe une grande variabilité dans le pourcentage de ces cellules dans chaque groupe. En revanche, il y a une augmentation significative de la proportion de CD4_{conv} exprimant PD-1 et TIM-3 dans la tumeur dans le groupe trithérapie par rapport au groupe bithérapie (Fig. 37 b).

Les études récentes suggèrent que les ICI, et en particulier les anti-PD-1, ne revigorent pas les lymphocytes complètement épuisés, mais qu'ils agissent plutôt sur une sous-population de lymphocytes « précurseurs épuisés » présents dans la tumeur^{109,465} et dans le ganglion drainant^{466,467}. Ces cellules sont capables de se renouveler et elles sont caractérisées par

l'expression intermédiaire de PD-1, l'expression de TCF-1 et l'absence d'expression de TIM-3^{109,467}. La difficulté à obtenir un marquage de TCF-1 exploitable sur les lymphocytes infiltrant la tumeur m'a poussé à remplacer ce marqueur par Slamf6, qui est co-exprimé avec TCF-1 dans la grande majorité des CD8 précurseurs épuisés^{109,331}. Au jour 17, je n'ai pas détecté de différence dans la proportion de CD8 « précurseurs épuisés » (Slamf6⁺PD-1⁺TIM-3⁻) dans la tumeur des souris traitées par bithérapie et trithérapie. Par contre, la proportion de CD4⁺ Slamf6⁺PD-1⁺TIM-3⁻ était légèrement, mais significativement, augmentée dans la tumeur des souris traitées avec la trithérapie comparée à la bithérapie (Fig. 37 c-d). Dans le ganglion drainant la tumeur, la quasi-totalité des lymphocytes T expriment Slamf6 mais certains ont une intensité de fluorescence plus importante, j'ai donc étudié cette population « Slamf6^{high} ». Au jour 17, la proportion de cellules Slamf6^{high}PD-1⁺TIM-3⁻ était faible mais significativement plus importante parmi les CD8 et les CD4 chez les souris traitées par trithérapie, comparée à celles traitées par bithérapie (Fig. 37 e-f). L'inhibition du TNF pourrait donc induire l'expansion des « précurseurs épuisés » dans le ganglion drainant la tumeur. Le phénomène pourrait être impliqué dans l'amélioration de la réponse antitumorale constatée avec la trithérapie.

4. La trithérapie est associée à des signatures d'expression génique d'activation de la réponse immunitaire

Pour explorer de façon plus large et non biaisée les mécanismes qui pourraient expliquer la différence d'efficacité entre la bithérapie et la trithérapie, nous avons réalisé le séquençage en « *bulk* » des ARN extraits de tumeurs réséquées au jour 17 après inoculation de B16-OVA chez des souris traitées par bithérapie ou trithérapie (Fig. 38 a). L'analyse en composante principale (PCA, « *Principal component analysis* ») sépare relativement bien la bithérapie et la trithérapie selon la première composante principale, qui représente 78% de la variance (Fig. 38 b).

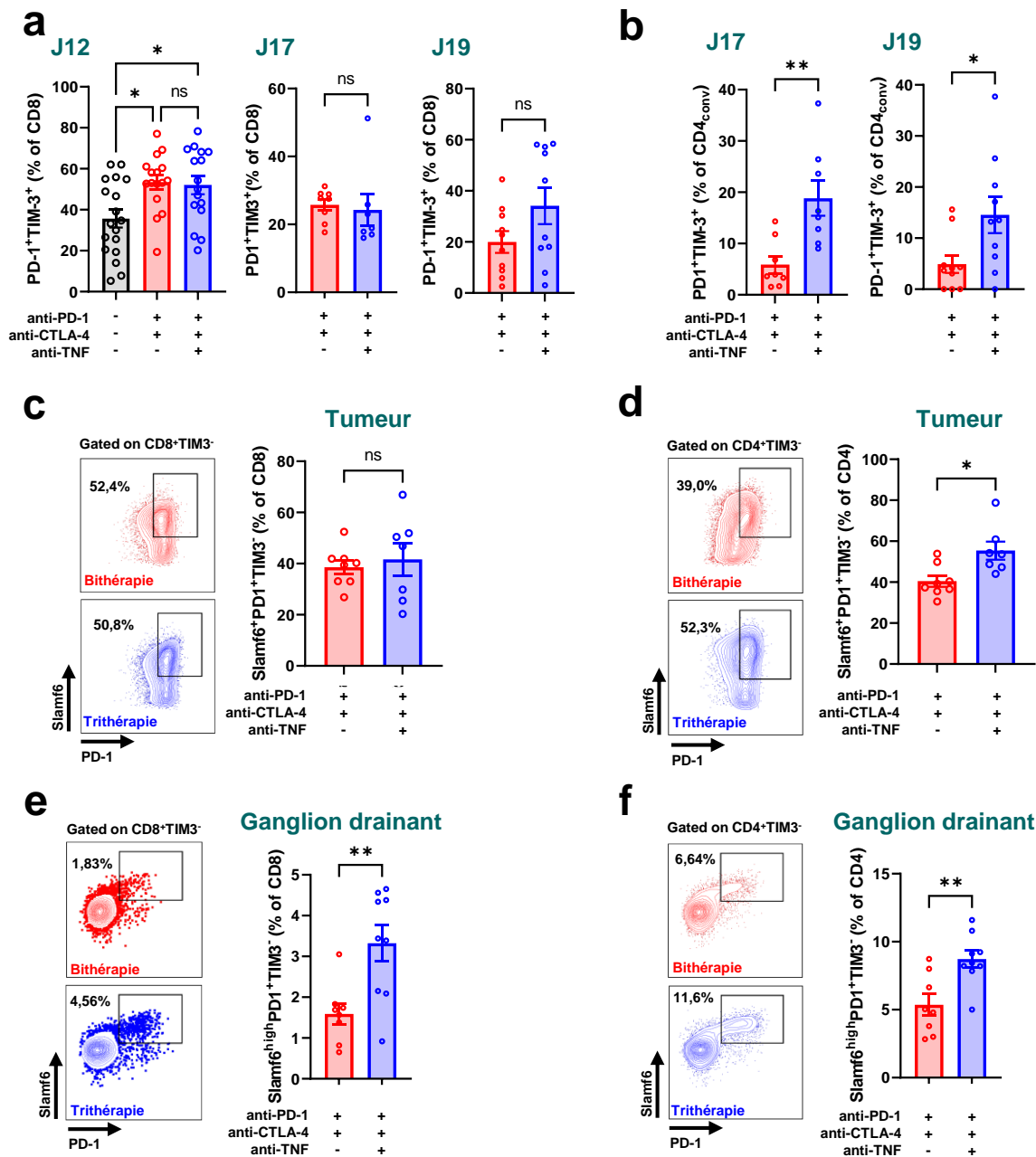
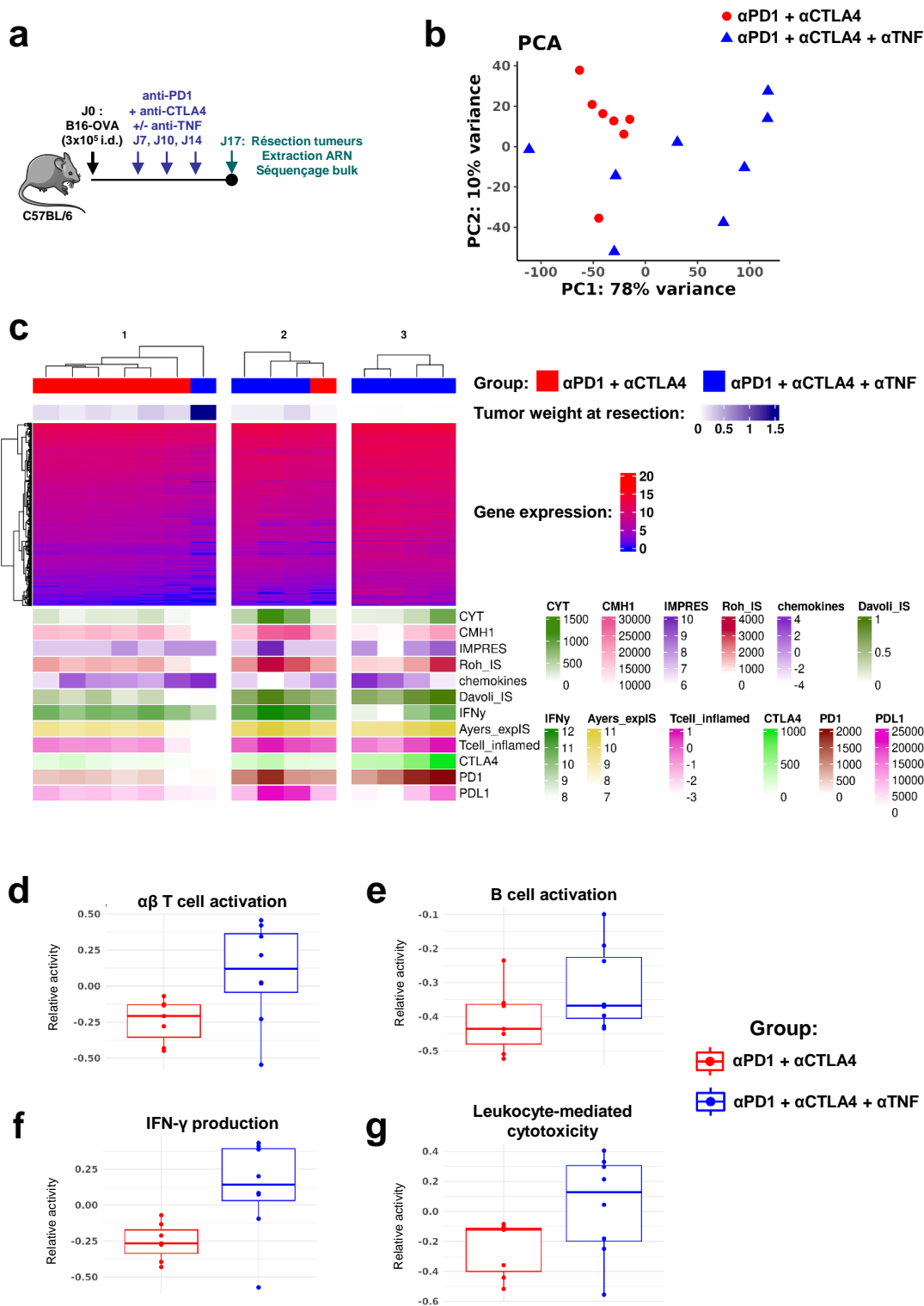


Figure 37 : La trithérapie semble augmenter la proportion de précurseurs épuisés dans le ganglion drainant la tumeur

3×10^5 cellules B16-OVA sont greffées en intradermique dans le flanc de souris C57BL/6. Traitement avec 2, 3 ou 4 injections intrapéritonéales d'anticorps anti-PD-1 (α PD-1) + anti-CTLA-4 (α CTLA-4) +/- anti-TNF (α TNF) ou contrôles (Vehicle) avant que les tumeurs ne soient réséquées au jour 12 (J12, n=16-18, deux expériences indépendantes), au jour 17 (J17, n=7-8) ou au jour 19 (J19, n=10). Les proportions de lymphocytes T CD8 (**a**) et CD4 conventionnels (CD4_{conv}, CD4⁺FoxP3⁻) (**b**) exprimant PD-1 et TIM-3 dans la tumeur ont été analysées par cytométrie en flux. Au jour 17, les proportions de lymphocytes T CD8 (**c et e**) et de CD4_{conv} (**d et f**) exprimant Slamf6 et PD-1 mais pas TIM-3 ont été évaluées dans la tumeur (**c et d**) et dans le ganglion drainant la tumeur (**e et f**). * p < 0,05 ; ** p < 0,01. J12, One-way Anova ou Kruskal Wallis en fonction de la normalité de la distribution des données (D'agostino). J17 et J19, test de Student ou Mann-Whitney en fonction de la normalité de la distribution des données (D'agostino ou Shapiro).

Le partitionnement en k-moyennes des échantillons selon les gènes différentiellement exprimés classe les tumeurs en trois « *clusters* » (Fig. 38 c). Le premier contient six tumeurs du groupe bithérapie et une tumeur du groupe trithérapie qui n'a pas du tout répondu au traitement, comme en témoigne le poids de la tumeur au moment de la résection. Le deuxième *cluster* est composé de trois tumeurs du groupe trithérapie et d'une du groupe bithérapie. Le troisième et dernier *cluster* contient uniquement quatre tumeurs du groupe trithérapie. Nous avons aussi analysé l'expression de 12 signatures d'expression génique associées à la réponse immunitaire. Les résultats montrent que ces signatures sont exprimées de façon plus importante dans les échantillons des *clusters* 2 et 3 (qui contiennent quasi-exclusivement des tumeurs du groupe trithérapie) que dans le *cluster* 1 (qui contient quasi-exclusivement des tumeurs du groupe bithérapie).

Enfin, nous avons réalisé une analyse GSVA⁴⁶⁸ (*Gene Set Variation Analysis*) afin d'identifier plus précisément les mécanismes immunologiques impliqués dans la différence d'efficacité entre la bithérapie et la trithérapie. Parmi les ensembles de gènes les plus différentiellement exprimés, nous avons détecté les signes d'une meilleure activation des lymphocytes T $\alpha\beta$ (Fig. 38 d) ainsi que des lymphocytes B (Fig. 38 e), d'une production plus importante d'IFN- γ (Fig. 38 f) et d'une cytotoxicité médiée par les leucocytes plus active (Fig. 38 g) dans les tumeurs du groupe trithérapie.



5. Comparaison de l'efficacité de la bithérapie et de la trithérapie dans les modèles de mélanome 1014 et Yumm1.7

Enfin, j'ai souhaité élargir mes résultats à d'autres modèles de mélanome. J'ai sélectionné deux modèles porteurs de mutations caractéristiques des mélanomes humains et j'ai essayé de reproduire au mieux le protocole de traitement que j'ai utilisé avec le modèle B16-OVA (Fig. 39 a et d). La lignée cellulaire 1014 est issue d'un mélanome spontané qui se développe chez la souris Tyr::NRASQ^{61K}. Ces souris possèdent le gène humain muté *NRAS*^{Q61K} qui est constitutivement actif, sous le contrôle du promoteur de la tyrosinase^{469,470}. La lignée Yumm1.7 possède la mutation *Braf*^{V600E} et est invalidée pour *Pten* et *Cdkn2a*⁴⁶⁰.

Le modèle 1014 s'est révélé très résistant aux immunothérapies et les souris n'ont que peu ou pas répondu à la bithérapie, et la trithérapie n'a pas permis de lever la résistance (Fig. 39 b-c). Les souris inoculées avec les cellules Yumm1.7 répondent à la bithérapie mais la trithérapie n'apporte pas de bénéfice thérapeutique. Dans le but d'essayer de comprendre pourquoi les anti-TNF n'augmentent pas l'efficacité thérapeutique des ICI dans le modèle Yumm1.7, des analyses de RNA Seq sur le bulk tumoral sont en cours en suivant le même protocole que pour les B16-Ova décrit dans la Fig. 35.

Conclusion de mes travaux chez la souris

Mes travaux confirment que le blocage du TNF améliore l'efficacité de la combinaison anti-PD-1 + anti-CTLA-4 dans le modèle B16-OVA chez la souris. En effet, la tumeur a complètement régressé chez 50% des souris traitées avec la trithérapie et les souris n'ont pas rechuté pendant plus de 200 jours. Ces souris ont développé une mémoire immunologique contre les tumeurs B16-OVA puisque 3/5 n'ont pas développé de tumeur lors d'un rechallenge sans nouveau traitement. Ce bénéfice de survie par rapport à la bithérapie est associé à une diminution de la proportion de T_{reg} et à une augmentation du ratio CD8/T_{reg} dans la tumeur, 19 jours après l'inoculation. Dans le ganglion drainant la tumeur, j'ai observé que la trithérapie induit l'augmentation de la proportion de lymphocytes T CD8 et CD4 exprimant Slamf6 et PD-1 par rapport à la bithérapie. Ces cellules pourraient correspondre aux lymphocytes précurseurs épuisés dont la prolifération a un impact majeur sur l'efficacité des anti-PD-1. Je ne suis pas parvenu à confirmer ces résultats avec les modèles de mélanome 1014 (pas de réponse aux ICI) et Yumm1.7 (pas d'amélioration avec les anti-TNF) mais la comparaison des données de séquençage d'ARN en *bulk* des tumeurs B16-OVA et Yumm1.7 devrait nous permettre de

comprendre les mécanismes responsables de la résistance à la trithérapie dans ce modèle. J'ai aussi généré des données de séquençage sur cellules uniques sur des leucocytes triés de tumeurs B16-OVA chez des souris traitées par bithérapie et trithérapie. L'analyse de ces résultats nous permettra d'affiner la description de l'impact des anti-TNF sur les populations immunitaires infiltrant la tumeur.

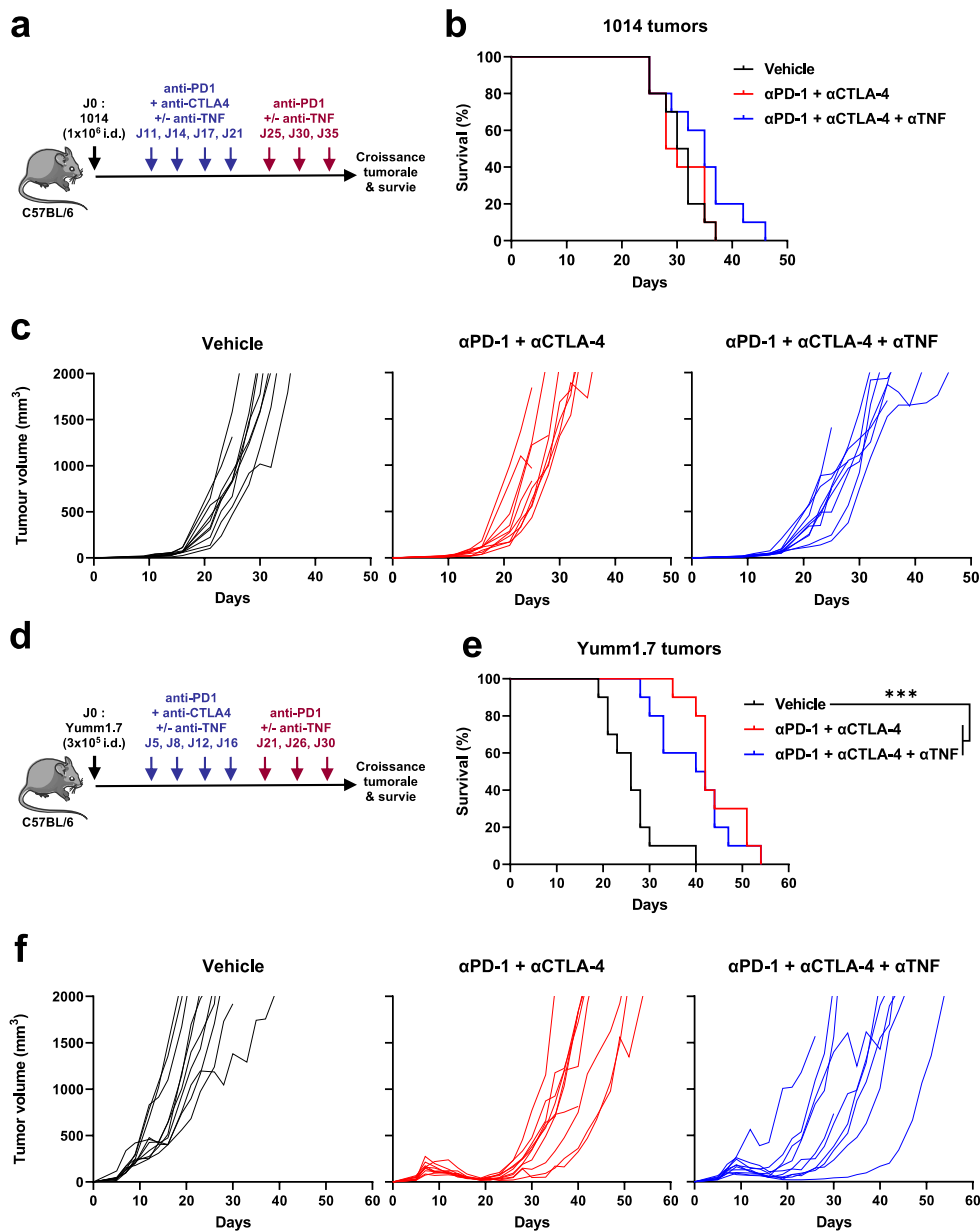


Figure 39 : Croissance tumorale et survie de souris traitées par anti-PD-1, anti-CTLA-4 avec ou sans anti-TNF avec les modèles de mélanome 1014 et Yumm1.7

(a et d) Protocoles expérimentaux : 1×10^6 cellules 1014 (a) ou 3×10^5 cellules Yumm1.7 (d) sont greffées en intradermique dans le flanc de souris C57BL/6. Traitement avec 4 injections intrapéritonéales d'anticorps anti-PD-1 (α PD-1) + anti-CTLA-4 (α CTLA-4) +/- anti-TNF (α TNF) ou contrôles (Vehicle) suivies de 3 injections α PD-1 +/- α TNF aux jours (n=10 par groupe). (b) Courbes de survie des souris inoculées avec les cellules 1014. (c) Courbes de croissance tumorale individuelle pour chaque groupe de souris inoculées avec les cellules 1014. (e) Courbes de survie des souris inoculées avec les cellules Yumm1.7. (f) Courbes de croissance tumorale individuelle pour chaque groupe de souris inoculées avec les cellules Yumm1.7. Log-rank test.

DISCUSSION

Les ICI ont apporté un bénéfice inédit pour le traitement des patients atteints de mélanome métastatique^{182,217,471}. Leur efficacité est rapide et durable chez les patients qui répondent mais malheureusement cela ne concerne qu'une minorité de patients. En effet, plus de 60% ne répondent pas initialement ou rechutent dans les cinq ans²⁴⁸. De plus, les biomarqueurs disponibles ne permettent pas de prédire la réponse des patients de façon satisfaisante¹⁸. Il faut donc étudier les mécanismes de résistance pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux biomarqueurs afin d'améliorer la prise en charge des patients.

Mon équipe a préalablement montré que le TNF est délétère à la réponse immunitaire antitumorale et que son inhibition permet d'améliorer l'efficacité des anti-PD-1 chez la souris^{459,461}. Perez-Ruiz *et al.* ont confirmé qu'inhiber le TNF améliore aussi la réponse à la combinaison anti-PD-1 + anti-CTLA-4, tout en diminuant la toxicité associée. En se basant sur ses travaux précliniques, mon équipe a initié deux essais cliniques visant à évaluer (i) la capacité du TNF plasmatique à prédire la réponse des patients aux ICI et (ii) la sécurité de l'inhibition du TNF en combinaison avec le nivolumab (anti-PD-1) et l'ipilimumab (anti-CTLA-4).

Mon travail de thèse s'est articulé autour de 3 axes principaux visant à évaluer :

- 1) Le TNF comme biomarqueur de réponse aux ICI dans l'essai clinique MELANF α
- 2) L'impact du blocage du TNF sur la réponse aux ICI dans l'essai clinique TICIMEL
- 3) L'impact du blocage du TNF sur la réponse aux ICI dans des modèles pré-cliniques de mélanome

1. Le TNF comme biomarqueur de réponse aux inhibiteurs de point de contrôle immunitaire

La plupart des patients ne répondent pas aux ICI et la diversité des traitements disponibles (anti-PD-1 seul ou en combinaison avec anti-CTLA-4 ou anti-LAG-3) complique le choix du traitement pour chaque patient. Les biomarqueurs de réponse aux ICI actuellement disponibles sont le TMB et l'expression de PD-L1 dans la tumeur^{472,473}. Mais ceux-ci ne sont pas satisfaisants car, bien qu'ils soient corrélés à la réponse, ils ne prédisent pas de façon fiable la

réponse des patients. Ainsi, certains patients ayant un TMB et/ou une expression de PD-L1 faible sont tout de même capables de répondre au traitement quand d'autres expriment fortement ces biomarqueurs mais ne répondent pas^{179,474}. Ceci pourrait être expliqué par l'échantillonnage des tumeurs biopsiées dans lesquelles sont évaluées les biomarqueurs. En effet, chez un même patient il y a une forte hétérogénéité au sein d'une même tumeur mais aussi entre les différentes tumeurs⁴⁷⁵. De même, l'infiltration des cellules immunitaires est hétérogène entre les différentes tumeurs d'un même patient. Les biopsies au poinçon ou au trocart pratiquées à des fins diagnostiques ont donc peu de probabilité de refléter l'hétérogénéité intratumorale mais aussi et surtout l'hétérogénéité intertumorale⁴⁷⁶ (Fig. 40). Ce biais de prélèvement peut expliquer la dissociation entre l'expression d'un biomarqueur prédictif et la réponse du patient⁴⁷⁵. De plus, certains patients sont difficilement biopsiables pour des raisons intrinsèques à la tumeur ou liées à l'état général du patient.

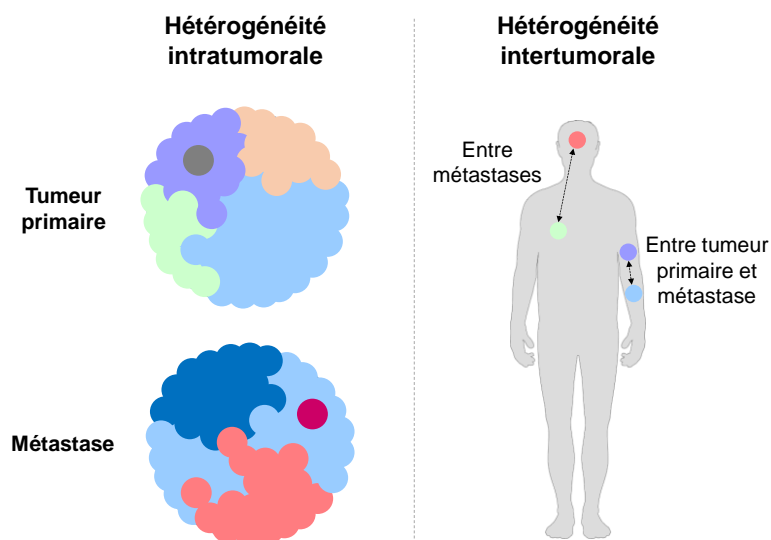


Figure 40: Niveaux d'hétérogénéité tumorale

Chez un même patient, il y a une hétérogénéité intratumorale due à la multitude de sous-clones de cellules tumorales, ici représentés par des couleurs différentes et une hétérogénéité intertumorale puisque les différentes métastases évoluent indépendamment les unes des autres et de la tumeur primaire sous l'influence d'un microenvironnement différent. Adapté de Grzywa *et al.*⁴⁷⁶

De ce constat est né le concept de biopsie liquide qui vise à détecter dans le sang périphérique les cellules tumorales circulantes, l'ADN tumoral circulant ou les vésicules extracellulaires issus de cellules tumorales⁴⁷⁷. Ces tests visent à analyser le génome tumoral pour détecter des mutations sensibilisant à certaines thérapies ciblées mais aussi à suivre l'évolution génomique de la tumeur dans le temps de façon peu invasive. Des prélèvements de sang à intervalles réguliers peuvent aussi permettre d'apprécier les variations de métabolites et

de protéines circulantes induites par le traitement et, à ce titre, les cytokines plasmatiques sont de bonnes candidates pour refléter l'activation de l'immunité systémique. Le TNF en particulier, est impliqué dans la progression tumorale et la résistance aux immunothérapies^{305,461} et il est sécrété principalement par les cellules immunitaires mais aussi par les cellules cancéreuses^{308,309}.

Dans notre étude MELANFα chez des patients atteints de mélanome avancé, l'analyse par courbe ROC (*Receiver Operating Characteristic*) montre que l'évolution des concentrations plasmatiques du TNF sous ICI, ne permet pas de discriminer les patients selon leur réponse. En analysant la cohorte de patients traités par la bithérapie (nivolumab + ipilimumab), nous obtenons cependant une aire sous la courbe de 0,736 sans que ce résultat ne soit statistiquement significatif ($p=0.1019$), ce qui est probablement dû au faible effectif dans ce sous-groupe (seulement 17 patients car nous n'avons pas pu mesurer les taux de TNF à W0 et W12 pour 7 patients). Cependant, 12 semaines après le début du traitement, les taux de TNF sont plus importants dans le plasma des patients non répondeurs que dans celui des répondeurs. Encore une fois, cette différence est plus marquée chez les patients traités par bithérapie sans que la différence ne soit significative ($p=0,0562$). Nous n'avons par contre pas détecté de changements dans les concentrations d'IFN- γ et d'IL-6 avant et pendant le traitement. De plus, les taux de ces deux cytokines au cours de la thérapie ne diffèrent pas entre répondeurs et non répondeurs. Dans la littérature, des taux élevés de protéines pro-inflammatoires incluant l'IL-6 (IL-6, CCL2, CCL3, CCL4 et VEGFA), avant l'induction de la thérapie anti-CTLA-4 \pm anti-PD-1 ou de thérapie ciblée (inhibiteurs de MEK et/ou de BRAF) chez 48 patients atteints de mélanome cutané de stade IV, sont associés à une PFS plus courte. Dans cette même étude, l'augmentation de ces mêmes marqueurs plasmatiques après l'initiation de la thérapie est associée à une PFS plus longue⁴⁷⁸. Différentes études chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules montrent que l'IL-6 constitue un biomarqueur prédictif de résistance aux immunothérapies. Ainsi, une diminution des taux d'IL-6 et de CRP (*C Reactive Protein*) plasmatique après administration des anti-PD-1 est observée chez les répondeurs dans une cohorte de 47 patients⁴⁷⁹. Tandis que l'augmentation d'IL-6 plasmatique est associée à un mauvais pronostic dans une autre cohorte de 60 patients traités aux anti-PD-1, l'augmentation d'IFN γ est associée à une meilleure PFS⁴⁸⁰. Plus récemment, une autre étude illustre que des taux plasmatiques élevés avant le début du traitement chez 45 patients prédisent la résistance aux anti-PD-1⁴⁸¹. D'autres cytokines plasmatiques que celles que nous avons dosées dans la

cohorte MELANF α pourraient permettre de mieux prédire la réponse clinique des patients. Ainsi, l'équipe d'Antoine Italiano a réalisé une étude de protéomique non biaisée sur le plasma de patients atteints de cancer avancé (principalement cancer du poumon non à petites cellules et cancer de la vessie), traités par anti-PD-1 ou anti-PD-L1. Cette étude, qui repose sur une cohorte test de 95 patients et une cohorte de validation de 292 patients, montre que des taux plasmatiques élevés de LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) avant induction du traitement sont prédictifs de la résistance⁴⁸². Il est à noter que les concentrations plasmatiques de LIF sont positivement corrélées avec celles de l'IL-6 et de CCL2 et que les taux élevés plasmatiques basaux d'IL-6, de CXCL8 (IL-8) et de CXCL1 sont aussi prédictifs de la résistance⁴⁸².

Contrairement à la monothérapie anti-PD-1, la bithérapie module le nombre et les proportions des sous-populations de lymphocytes T circulants. Parmi eux, les Th1 et les CD8 CM dont l'augmentation entre W0 et W6 est plus importante chez les patients répondeurs, tandis que l'augmentation des CD8 EM est étonnamment plus importante chez les patients non répondeurs. Seule l'évolution du nombre de CD8 effecteurs mémoires circulants était corrélée avec l'évolution des concentrations de TNF plasmatiques, ce qui est cohérent avec la quasi absence d'expression du *TNF* par les lymphocytes circulants évaluée par scRNA Seq. Néanmoins, la signature de réponse au TNF est plus exprimée chez les non répondeurs dans les CD4 naïfs et CD4 EM et dans les CD8 naïfs, CD8 CM et CD8 EM, sans que l'expression de cette signature ne soit corrélée avec les variations de TNF dans le plasma.

L'absence de biopsie tumorale ne nous a pas permis d'évaluer si les concentrations plasmatiques de TNF sont corrélées avec l'expression du TNF dans la tumeur. Mais une étude rétrospective sur une cohorte de patients atteints de mélanome avancé montre que l'expression du *TNF* dans la tumeur pendant le traitement par anti-PD-1 est plus importante chez les patients répondeurs que chez les non-répondeurs⁴⁸³. Cependant cette étude ne permet pas d'évaluer l'évolution de l'expression du *TNF* pour chaque patient. Une étude prospective analysant le transcriptome de biopsies appariées avant et après traitement par anti-PD-1 montre que l'expression du *TNF* augmente sous traitement quelle que soit la réponse du patient⁴⁸⁴. L'augmentation de l'expression du *TNF* dans la tumeur est accompagnée d'une augmentation de l'expression de l'*IFNG*, du *GZMA* et de la *PRF1*, codant respectivement pour l'IFN- γ , le granzyme A et la perforine, quelle que soit la réponse du patient. Ces données sont cohérentes avec le fait que le TNF est principalement produit par les cellules immunitaires³¹⁵. Ces études rapportent par contre que l'induction de signatures de réponse à l'IFN- γ et au TNF dans la

tumeur sont associées à la réponse des patients^{483,484}, ce qui s'explique par l'induction de la présentation antigénique par les cellules de mélanome en réponse à l'IFN- γ . Cette étude de séquençage en *bulk* ne permet cependant pas d'apprécier l'effet du TNF ou de sa signalisation sur les cellules immunitaires infiltrant la tumeur.

Bien que les concentrations de TNF soit plus élevées chez les patients non répondeurs à la semaine 12, notre étude ne permet pas d'affirmer que le TNF puisse être un biomarqueur prédictif de la réponse aux ICI. Ces résultats sont néanmoins cohérents avec une prépublication rapportant les résultats d'une analyse protéomique d'échantillons de plasma de 174 patients atteints de mélanome métastatique et traités par anti-PD-1⁴⁸⁵. Dans cette étude, la comparaison des concentrations de cytokines chez les répondeurs et les non répondeurs avant, 6 semaines et 6 mois après le début du traitement montre que les concentrations de TNF avant traitement ne sont pas associées à la réponse. Par contre, à la semaine 6, les concentrations de TNF sont plus élevées chez les patients non répondeurs et cela semble rester vrai à 6 mois. L'analyse de séquençage d'ARN sur cellules uniques de biopsies tumorales provenant de 32 patients dans la même étude montre que le TNF n'est pas impliqué dans la signature identifiée comme étant associée à la non réponse. Le TNF ne permettrait donc pas de prédire la réponse des patients avant le traitement mais une concentration élevée plasmatique de TNF pourrait être associée à la non réponse pendant le traitement. Ce résultat pourrait être intéressant pour suivre l'évolution de la maladie plus régulièrement et sans besoin de technique d'imagerie afin de détecter la non réponse au plus tôt et de possiblement réorienter le patient vers un traitement plus adapté.

Le faible effectif dans chaque cohorte de MELANF α a probablement nuit à la puissance statistique de notre analyse mais nos résultats soulignent bien la différence dans les effets induits par la monothérapie et la bithérapie et la nécessité d'étudier les effets de chaque régime de traitement indépendamment, sans généraliser aux autres. Nous nous heurtons aussi à la difficulté d'identifier un paramètre qui pourrait, seul, prédire la réponse de façon fiable. Il en est de même pour le TMB, l'expression de PD-L1, de l'IFN- γ , l'infiltration par les lymphocytes ou la présence de TLS dans la tumeur qui, évalués indépendamment, ne permettent pas de prédire la réponse des patients de façon satisfaisante¹⁷⁹. Cependant la combinaison de biomarqueurs pourrait être plus efficace, en témoigne la combinaison du TMB avec la signature « *T cell-inflamed gene-expression profile* » qui prédit la réponse des patients de façon plus efficace que les deux individuellement⁴⁸⁶. Il pourrait ainsi être intéressant d'évaluer les capacités prédictives d'un panel de cytokines plasmatiques puisqu'elles sont finement régulées

et interconnectées tout en ayant des effets différents sur la réponse immunitaire. Le TNF induit par exemple l'expression et la sécrétion d'autres cytokines inflammatoires, dont l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8³⁰⁷ qui ont aussi des effets protumoraux^{306,354,487}.

2. Le TNF comme cible thérapeutique en combinaison avec les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire

Les ICI ont un profil de toxicité spécifique associé à l'apparition de irAEs qui se rapprochent de maladies autoimmunes^{246,249}. Quand ils sont réfractaires aux corticostéroïdes, ces effets indésirables peuvent être traités par l'anti-TNF infliximab après arrêt des ICI. L'infliximab est efficace pour soulager les colites induites par ICI⁴⁸⁸ mais son effet sur leur efficacité est inconnu. Plusieurs études rétrospectives aboutissent à des conclusions contradictoires⁴⁸⁹⁻⁴⁹¹ et le débat est houleux⁴⁹². Chez la souris, l'inhibition du TNF permet d'améliorer l'efficacité des anti-PD-1 et de la combinaison anti-PD-1 + anti-CTLA-4 pour traiter le mélanome^{305,461}, tout en diminuant la toxicité associée à la combinaison. L'essai clinique de phase Ib TICIMEL avait donc pour objectif d'évaluer la sécurité de la combinaison concomitante d'anti-TNF (infliximab ou certolizumab) avec le nivolumab et l'ipilimumab. Cette étude montre que cette combinaison est sûre avec les deux anti-TNF. De plus, nous avons observé une activation de l'immunité périphérique similaire dans les deux cohortes, et notamment une augmentation du nombre de lymphocytes Th1 circulants et de la concentration d'IFN- γ plasmatique, qui montrent que l'inhibition du TNF ne nuit pas à la mise en place d'une réponse immunitaire périphérique aux ICI.

Afin d'évaluer la réponse T CD8 spécifique des antigènes tumoraux, des analyses ont été réalisées à l'aide de dextramères HLA-A2 fluorescents et porteurs de peptides MART1 en collaboration avec l'équipe du Pr. M. Ayyoub (CRCT). Ainsi, 6 semaines après le début du traitement, 5 patients sur 7 de la cohorte TICIMEL ont des augmentations des CD8 circulants spécifiques de MART1. De plus, ces CD8 spécifiques sont majoritairement CD45RA- et CCR7+, suggérant un phénotype de CD8 CM. Nous avons réalisé le même type d'analyse chez les patients de la cohorte bithérapie de MELANF α . Six semaines après le début du traitement, 2 patients sur 6 ont des augmentations des CD8 spécifiques de MART1 circulants, avec une

proportion équivalente de CD8 CM et EM (résultats non montrés). Ces résultats, qui nécessitent d'être renforcés en augmentant le nombre de patients, suggèrent que les anti-TNF pourraient orienter le phénotype des CD8 circulants vers un phénotype de CD8 CM, ce qui pourrait avoir un effet favorable sur la réponse des patients. En effet, des expériences de transfert adoptif chez la souris, montrent que, parmi les CD8 spécifiques des cellules tumorales, les CD8 CM ont un potentiel thérapeutique plus important que des CD8 EM pour rejeter les tumeurs B16⁴⁹³. Cette différence d'activité antitumorale pourrait s'expliquer par la capacité plus importante des CD8 CM à gagner les organes lymphoïdes secondaires qui jouent un rôle important dans la réponse immunitaire antitumorale.

En comparant les deux cohortes de patients de TICIMEL, nous avons détecté des signaux d'activité clinique différents. Le certolizumab semble induire plus d'effets indésirables, notamment au niveau gastro-intestinal et hépatobiliaire, mais est associé à une meilleure réponse clinique que l'infliximab en combinaison avec le nivolumab et l'ipilimumab. Ces résultats sont à relativiser en raison du faible nombre de patients et ils devront être confirmés dans une cohorte plus importante mais il ne serait pas étonnant d'observer des différences d'activité biologiques avec ces deux anti-TNF au vu de leur structure. L'infliximab est un anticorps monoclonal chimérique humain/murin de type IgG1⁴⁹⁴ tandis que le certolizumab est un fragment Fab' d'anticorps humanisé recombinant conjugué à du polyéthylène glycol⁴⁹⁵. L'infliximab est donc bivalent et possède une région Fc fonctionnelle quand le certolizumab est monovalent et dépourvu de Fc (Fig. 41).

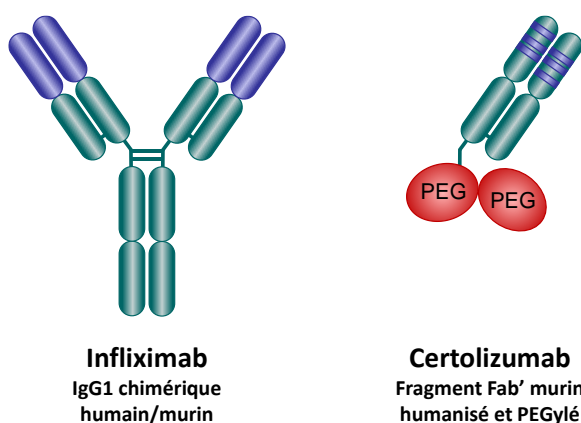


Figure 41 : Représentation schématique de l'infliximab et du certolizumab

Les régions humaines sont représentées en vert, les régions murines en violet et le polyéthylène glycol (PEG) en rouge.
Adapté de Melmed *et al.*⁴⁹⁶

Les deux reconnaissent et neutralisent la forme soluble et la forme membranaire du TNF mais la présence d'une région Fc fonctionnelle sur l'infliximab implique qu'il est capable d'induire l'ADCC et la CDC en se fixant à la surface les cellules productrices de TNF,

contrairement au certolizumab⁴⁹⁷. Le fait que l'infliximab soit bivalent lui permet d'induire l'agrégation des molécules de tmTNF à la surface des cellules sur lesquelles il se fixe, ce qui induit la signalisation inverse du TNF de façon plus efficace et aboutit à l'apoptose de la cellule⁴⁹⁸. Dans des expériences de réaction lymphocytaire mixte, l'infliximab inhibe la prolifération des lymphocytes T, contrairement au certolizumab⁴⁹⁹. Cependant, le certolizumab inhibe cette prolifération quand il est lié à une IgG, ce qui indique la nécessité de la région Fc pour induire cet effet. Dans cette même étude, la région Fc de l'infliximab induit un phénotype immunosuppresseur des macrophages qui expriment CD206 et sécrètent de l'IL-10⁴⁹⁹. Cependant, *in vitro*, l'infliximab n'a pas d'effet délétère sur l'activation de lymphocytes T isolés de tumeurs et sur leur capacité à détruire des cellules tumorales de lignée autologue⁵⁰⁰. L'infliximab et le certolizumab possèdent une demi-vie de même ordre de grandeur *in vivo*, respectivement de 8 à 10 jours et de 14 jours⁵⁰¹. Cependant, le certolizumab se distribue plus efficacement vers les sites inflammatoires dans un modèle d'arthrite induite par le collagène chez la souris⁵⁰². Bien que ces deux inhibiteurs puissent tous les deux générer une réponse ADA (*anti-drug antibodies*) neutralisante, c'est-à-dire des anticorps dirigés contre le médicament, l'infliximab est plus immunogène que le certolizumab, ce qui pourrait entraîner une perte d'efficacité et/ou l'apparition d'effets indésirables⁵⁰³. Il sera par conséquent important de doser la présence d'ADA dans le plasma des patients TICIMEL et d'évaluer la corrélation entre leur concentration et les réponses cliniques (réponse clinique objective et effets indésirables).

Ces différences d'effets entre l'infliximab et le certolizumab ont été étudiées *in vitro* ou chez la souris et il est difficile de savoir s'ils sont pertinents chez les patients inclus dans TICIMEL. Cependant, l'efficacité de l'infliximab dans les maladies inflammatoires semble due à sa capacité à induire l'apoptose des lymphocytes T pathogéniques, que ce soit par ADCC ou signalisation inverse⁵⁰¹. Ceci pourrait expliquer la moindre toxicité observée dans la cohorte recevant l'infliximab. Le certolizumab se distribuant mieux vers les sites inflammatoires, il se pourrait qu'il se concentre dans la tumeur, ce qui pourrait améliorer son efficacité. Au cours de ma thèse, j'ai tenté de comparer l'effet de ces deux anticorps en combinaison avec le nivolumab et l'ipilimumab chez des souris humanisées avec des PBMC dans un modèle similaire à celui utilisé par Perez-Ruiz *et al.*³⁰⁵. Cependant, la GVHD induite par les PBMC était trop importante et trop rapide pour pouvoir étudier l'effet des anti-TNF. Elle était aussi aggravée par les immunothérapies. Nous avons récemment obtenu un modèle de souris modifiée pour exprimer un module de signalisation TNF humain par « *knock-in* » sur un fond génétique C57BL/6. Ces

souris expriment le TNF et le TNFR2 humain (hTNF \times hTNFR2) à la place de leurs homologues murins, tandis que le TNFR1 murin reconnaît le TNF humain⁵⁰⁴. Ces souris humanisées pour le TNF, nous permettront de comparer les effets de l'infliximab et du certolizumab en combinaison avec les anti-PD-1 et anti-CTLA-4 sur l'immunité antitumorale dans des modèles de mélanome murin. Nous pourrons aussi analyser la biodistribution de ces anti-TNF par marquage au cuivre 64 et l'imagerie TEP. Nos résultats préliminaires de marquage du certolizumab et de l'infliximab à l'Alexa 680 dans un modèle de souris NSG implantées avec des cellules de mélanome humain A375 qui expriment le tmTNF, ont montré une meilleure infiltration du certolizumab dans la tumeur par rapport à l'infliximab.

La deuxième partie de TICIMEL est aujourd'hui terminée et tous les patients ont été inclus. L'analyse statistique finale devrait donc être réalisée prochainement. TICIMEL et la cohorte bithérapie de MELANF α ont été pensés pour que les patients reçoivent les mêmes doses de nivolumab et d'ipilimumab et que les prélèvements soient effectués aux mêmes temps. Ceci nous permettra d'étudier les effets de l'inhibition du TNF par l'infliximab et le certolizumab en combinaison avec le nivolumab et l'ipilimumab et de les comparer avec les effets de la bithérapie seule. Nous avons analysé diverses populations de cellules immunitaires circulantes parmi les PBMC ainsi que les concentrations de cytokines plasmatiques avant et pendant le traitement (semaines 6 et 12). De plus, nous avons réalisé le séquençage sur cellules uniques des PBMC de huit patients pour chacune des trois cohortes. L'analyse de toutes ces données est en cours et leur recoupement avec les données cliniques de chaque patient devrait nous permettre d'explorer les mécanismes responsables de l'efficacité et de la résistance induits par l'inhibition concomitante du TNF, de PD-1 et de CTLA-4.

3. L'inhibition du TNF améliore l'efficacité des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire chez la souris

En parallèle des essais cliniques, mes travaux de thèse ont permis de confirmer la meilleure efficacité de la trithérapie anti-PD-1 + anti-CTLA-4 + anti-TNF comparée à la bithérapie dans un modèle de mélanome murin et de mieux caractériser les mécanismes sous-jacents.

L'inhibition du TNF permet d'améliorer l'efficacité de la bithérapie et elle provoque surtout la régression totale de la tumeur chez 50% des souris. Ces souris, qui n'ont été traitées que pendant 30 jours n'ont pas rechuté pendant plus de 200 jours. Ce résultat montre que l'inhibition du TNF est bénéfique au moment de l'activation de la réponse immunitaire par les ICI et probablement au moment de la mise en place de la mémoire lymphocytaire mais pas nécessairement au-delà. En effet, parmi ces souris survivantes, plus de la moitié ont complètement contrôlé la tumeur lors d'une expérience de rechallenge sans nouveau traitement et elles ont survécu sans rechute pendant 180 jours supplémentaires. Cette expérience n'est toutefois pas suffisante pour conclure que la trithérapie permet une meilleure mémoire immunologique que la bithérapie. En effet, aucune souris du groupe bithérapie n'ayant survécu à la première injection de cellules tumorales, je n'ai pas pu comparer directement ces deux traitements lors d'un rechallenge. Cependant, ce résultat est cohérent avec le fait que le TNF provoque l'AICD des CD8 mémoires. En effet, les CD8 déficients pour le TNFR2 sont protégés de l'AICD, ce qui permet une meilleure réponse immunitaire antitumorale chez des souris préalablement vaccinées⁵⁰⁵. Le TNF peut aussi inhiber la différenciation des T_{RM} par un mécanisme dépendant de NF- κ B, en interférant avec la signalisation du TGF- β qui est nécessaire à l'établissement du phénotype résident mémoire⁵⁰⁶. L'inhibition du TNF permet notamment d'augmenter le nombre de T_{RM} induits dans les poumons de souris infectées par le virus de la grippe⁵⁰⁶.

Pour comparer la mémoire immunologique induite par la bithérapie et la trithérapie, il serait intéressant de mettre au point un protocole expérimental qui favorise le rejet de la tumeur après une première inoculation de cellules tumorales sous traitement par bithérapie et trithérapie afin de pouvoir comparer directement ces deux groupes lors d'un rechallenge sans nouveau traitement. En injectant un plus faible nombre de B16-OVA et en commençant le traitement dès le jour d'inoculation des tumeurs, il serait envisageable que toutes régressent complètement. Ceci permettrait de réaliser une expérience de rechallenge sans nouveau traitement quelques dizaines de jours après la première inoculation pour comparer directement la mémoire immunologique induite par la bithérapie et la trithérapie en évaluant le taux de rechute et la composition et le phénotype des cellules immunitaires dans le ganglion drainant et dans la tumeur ou la peau, où devrait se développer une mémoire locale.

Pour comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans la différence de réponse entre la bithérapie et la trithérapie, j'ai étudié les populations immunitaires dans la tumeur et le

ganglion drainant. Je me suis particulièrement intéressé aux lymphocytes T au vu de leur rôle essentiel dans l'immunité antitumorale²⁵¹. La bithérapie induit une augmentation de l'infiltration de la tumeur par les CD8 mais l'inhibition du TNF n'influe pas sur la proportion de CD8 infiltrant la tumeur, ce qui est cohérent avec les résultats déjà publiés avec ce modèle³⁰⁵. La bithérapie induit aussi une diminution de la proportion de T_{reg} dans la tumeur. Cet effet, bien caractérisé, est dû à la capacité des anticorps anti-CTLA-4 de dépléter les T_{reg} dans la tumeur par ADCC, ce qui participe en grande partie à leur efficacité, au moins chez la souris^{207,507,508}. La proportion de T_{reg}, déjà faible dans la tumeur des souris traitées par bithérapie, est encore diminuée par l'inhibition du TNF au jour 19 après inoculation des cellules tumorales. De même, la proportion de T_{reg} exprimant simultanément les marqueurs d'immunosuppression GITR, CTLA-4, CD120b et CD39 est diminuée au jour 17. Ces effets sur les T_{reg} peuvent s'expliquer par le rôle important de la signalisation TNF-TNFR2 dans leur biologie et notamment dans leurs fonctions effectrices, leur survie et la stabilité de leur phénotype^{357,361,367}. L'efficacité des anti-TNF pour améliorer la réponse aux ICI pourrait donc être en partie due à la modulation des proportions et du phénotype des T_{reg} dans la tumeur. Cependant, au vu de l'efficacité des anti-CTLA-4 à dépléter les T_{reg} intratumoraux, il est peu probable que cet effet soit majeur dans le cadre de la trithérapie.

En périphérie, la bithérapie et la trithérapie induisent toutes deux la prolifération des CD8 et des T_{reg}, un effet dû à l'activité des anti-PD-1 et anti-CTLA-4 qui, respectivement, induisent la prolifération de sous-populations exprimant PD-1 et baissent le seuil d'activation des lymphocytes T naïfs²⁰. Cependant, les proportions de CD8 et CD4_{conv} ne sont pas affectées par les ICI dans le ganglion drainant ce qui peut être expliqué par le fait que les lymphocytes activés recirculent *via* les vaisseaux sanguins⁸¹. En revanche, la proportion de T_{reg} augmente sous bithérapie, mais aussi en réponse aux anti-CTLA-4⁵⁰⁸, probablement pour contrôler l'activation immunitaire globale dans le ganglion. La trithérapie n'a pas d'effet additionnel sur la modulation des proportions de lymphocytes T et de leur prolifération dans le ganglion drainant la tumeur.

L'utilisation de pentamères de CMH-I:peptide fluorescents permet de détecter les CD8 spécifiques d'un antigène modèle et j'ai utilisé cette technique pour étudier les CD8 spécifiques de l'OVA. La proportion de ces cellules est étonnamment faible dans les tumeurs B16-OVA mais le contrôle total de ces tumeurs lorsque je les ai injectées chez des souris OT-I m'a rassuré sur le fait que ces cellules présentent bien le peptide OVA sur leur CMH. Par contre, dans la

tumeur, la plupart des CD8 expriment CD39 qui est fortement exprimés par les CD8 spécifiques d'antigènes tumoraux dans la tumeur^{463,464}, ce qui pourrait être plus fidèle à la proportion de CD8 spécifiques pour des antigènes tumoraux. Dans tous les cas, je n'ai pas détecté de différence dans la proportion de CD8 spécifique de l'OVA ou exprimant CD39 dans la tumeur entre la bithérapie et la trithérapie, ce qui suggère que l'inhibition du TNF n'influe pas sur la proportion de CD8 spécifiques infiltrant la tumeur dans ces conditions expérimentales, en contradiction avec les conclusions de Perez-Ruiz *et al.* dans le modèle de cancer du côlon MC38³⁰⁵. Mes résultats s'accordent par contre avec cette même étude pour dire que la trithérapie n'induit pas de diminution d'expression des points de contrôle immunitaire, dont PD-1, TIM-3 et LAG-3 (non montré) sur les CD8 infiltrant la tumeur. Au contraire, les résultats précédents de mon équipe avec le modèle de mélanome B16K1 montrent que le blocage du TNF permet de diminuer l'expression de TIM-3 à la surface des CD8 infiltrant la tumeur⁴⁶¹. Cette divergence pourrait s'expliquer par le fait que les ICI induisent l'expression de points de contrôles secondaires comme VISTA et TIM-3^{509,510}. Ainsi l'inhibition du TNF pourrait suffire à prévenir l'expression de TIM-3 en réponse aux anti-PD-1 seuls mais ne pas être suffisante dans le cas d'une activation plus importante avec la combinaison anti-PD-1 + anti-CTLA-4. De même, l'inhibition du TNF permet de diminuer la mort des CD8 infiltrant les tumeurs B16K1 chez les souris traitées par anti-PD-1⁴⁶¹ mais je n'ai pas observé cet effet chez les souris porteuses d'un mélanome B16-OVA et traitées par anti-PD-1 + anti-CTLA-4. Les B16K1 sont des B16F10 qui surexpriment le CMH-I, ce qui biaise probablement l'immunité antitumorale en faveur des CD8 et les rend potentiellement plus susceptibles à l'AICD induite par le TNF. J'ai étonnamment observé une augmentation de la proportion de CD4 exprimant PD-1 et TIM-3 dans la tumeur des souris traitées avec la trithérapie comparée à la bithérapie. Ceci pourrait correspondre à une activation plus importante des CD4 dans la tumeur, voire à leur épuisement. En effet, bien que l'épuisement des CD4 soit peu étudié, une étude rapporte que les CD4 épuisés expriment PD-1, TIM-3 et LAG-3 chez la souris, de façon similaire aux CD8⁵¹¹.

Les ICI, en particulier les anti-PD-1, agissent sur une sous-population de CD8 qualifiés de « précurseurs épuisés » se trouvant dans la tumeur et le ganglion drainant et qui est capable de se renouveler et de se différencier en CD8 effecteurs^{109,465-467}. Cette population est caractérisée par l'expression de TCF-1, de Slamf6 et de PD-1 et l'absence d'expression de TIM-3. J'ai observé une augmentation de la proportion des cellules exprimant Slamf6 et PD-1 et négatives pour TIM-3 parmi les CD8 et les CD4 chez les souris traitées par trithérapie en

comparaison à la bithérapie dans le ganglion drainant la tumeur au jour 17. La proportion de cette population est aussi significativement augmentée sous trithérapie parmi les CD4 dans la tumeur. L'inhibition du TNF pourrait donc induire l'expansion des « précurseurs épuisés », contribuant à améliorer la réponse antitumorale constatée avec la trithérapie.

L'étude transcriptomique en *bulk* des tumeurs de souris traitées par bithérapie ou trithérapie révèle que les signatures géniques associées à l'inflammation et à la réponse immunitaire sont enrichies chez les souris traitées par trithérapie. Cependant, il est difficile de savoir si cette meilleure activation immunitaire est causalement impliquée dans la réponse au traitement ou si elle est détectée de façon plus importante chez les souris ayant une meilleure réponse avec la trithérapie, car la proportion de cellules tumorales est moins importante. Pour mieux caractériser les cellules immunitaires infiltrant la tumeur en s'affranchissant du biais causé par la proportion des cellules tumorales, nous avons généré des données de séquençage d'ARN sur cellules uniques CD45⁺ isolées par FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) de tumeurs de souris traitées par bithérapie ou trithérapie. J'ai marqué les cellules de chaque souris avec des anticorps HTO (*Hash Tag Oligonucleotide*) afin de pouvoir identifier les cellules de chaque individu⁵¹². L'analyse de ces données est en cours et elle nous permettra de comparer les effets des deux traitements sur la modulation des populations immunitaires et leur phénotype dans la tumeur de façon non biaisée. Nous pourrions aussi confronter ces résultats à nos données de cytométrie en flux pour les renforcer et/ou identifier de nouveaux marqueurs d'intérêt. Elle permettra notamment d'apprécier plus finement la mise en place d'une mémoire cellulaire en étudiant par exemple la présence de T_{RM} et de « précurseurs épuisés » dans la tumeur. Enfin, cette expérience nous permettra d'explorer d'autres populations immunitaires que les lymphocytes T, notamment les cellules myéloïdes qui sont les principales cellules productrices de TNF et dont l'infiltration est importante dans les tumeurs humaines ainsi que dans les tumeurs issues de cellules B16 chez la souris. Il sera notamment intéressant de voir si les anti-TNF ont un effet sur les MDSC dont l'infiltration et les capacités immunosuppressives dépendent du TNFR2 et sur les macrophages inflammatoires qui sont une importante source de TNF^{315,351,352}.

Le TNF est une protéine membranaire qui est clivée pour être sécrétée³¹⁸. Il est donc possible que les anticorps anti-TNF se fixent sur les cellules productrices de TNF. Ceci pourrait potentiellement induire la signalisation inverse du TNF dans ces cellules et notamment les macrophages dans lesquels elle peut activer la production de TNF⁵¹³ mais aussi de TGF-β⁵¹⁴.

De plus, les anti-TNF pourrait potentiellement induire la destruction des cellules productrices de TNF par ADCC. Il sera donc important de vérifier si les effets des anti-TNF sur la réponse aux ICI sont exclusivement dus au blocage du TNF ou s'ils ont des effets sur les cellules productrices de TNF. Pour cela, nous pourrions utiliser l'étanercept qui est une protéine de fusion correspondant à un dimère de TNFR2 lié à une région Fc d'une IgG1 humaine. Cet inhibiteur du TNF reconnaît le TNF murin mais n'induit pas la signalisation inverse du TNF, par contre, il peut potentiellement induire l'ADCC chez la souris⁵¹⁵. En parallèle, nous pourrions utiliser un anticorps anti-TNF murin classique dont la région Fc a été désactivée afin de ne pas induire l'ADCC⁵¹⁶ ou, de façon plus radicale, nous pourrions utiliser des souris déficientes pour les FcγR⁵¹⁷ afin de voir si les fonctions effectrices des anti-TNF sont nécessaires à leur efficacité antitumorale.

En essayant d'élargir mes résultats dans d'autres modèles de mélanome chez la souris, je me suis heurté à l'absence totale de réponse des cellules 1014 pour les ICI. Ces cellules sont issues d'une tumeur qui s'est développée spontanément chez une souris immunocompétente. Pour cela, elles ont donc dû subir une immunoédition qui leur a permis d'échapper au système immunitaire et il n'est pas surprenant qu'elles soient si peu immunogènes. Ce résultat souligne tout de même la nécessité pour le système immunitaire de reconnaître les cellules tumorales en tant que telles pour qu'il soit en capacité de répondre aux ICI. La trithérapie n'échappe pas à la règle : elle ne permet pas de rendre immunogène une tumeur qui ne l'est pas. Pour utiliser ce modèle, il faudra donc rendre les cellules 1014 plus immunogènes en les modifiant pour qu'elles surexpriment le CMH-I (de la même façon que les B16K1) ou pour qu'elles expriment un antigène modèle comme l'ovalbumine (de la même façon que les B16-OVA). La troisième lignée de mélanome que j'ai utilisée, les cellules Yumm1.7, sont immunogènes et répondent à la bithérapie mais la trithérapie n'apporte pas de bénéfice thérapeutique. Il se pourrait que le TNF ait une implication importante dans la réponse aux ICI dans ce modèle ou que les anti-TNF aient directement un effet délétère sur des populations cellulaires nécessaires à la réponse. Il sera donc très important d'évaluer l'éventuelle participation de l'ADCC dans l'efficacité (ou son absence) des anti-TNF pour améliorer la réponse aux ICI. Pour tenter de comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance du modèle Yumm1.7 à la trithérapie, j'ai extrait les ARN des tumeurs de souris C57BL/6 femelles inoculées avec des cellules Yumm1.7 et traitées selon le même protocole que pour le modèle B16-OVA et ces ARN ont été séquencés en « *bulk* ». Ces données sont récentes et elles n'ont pas encore été analysées mais il sera intéressant

d'observer la différence d'expression génique entre les deux traitements dans un modèle pour lequel il n'y a pas de différence d'efficacité ainsi que de comparer ces résultats avec ceux obtenus dans le modèle B16-OVA. A partir de ces données de transcriptomique, des analyses par déconvolution devraient nous permettre d'évaluer ces éventuelles différences que nous pourrions vérifier dans un second temps par cytométrie en flux. De plus, nous quantifierons non seulement l'expression du TNF, de ses récepteurs et des protéines clefs de la signalisation du TNF, mais aussi l'activité de la signalisation du TNF évaluée par PROGENy⁵¹⁸. Ces analyses comparatives des deux modèles de mélanome murin pourraient nous permettre d'identifier des biomarqueurs prédictifs de réponse à la trithérapie. Nous évaluerons dans un second temps la pertinence clinique de ces biomarqueurs sur les données de séquençage d'ARN générées à partir de biopsies tumorales des patients de TICIMEL, collectées avant et 12 semaines après le début du traitement.

Pour conclure, mes résultats de thèse montrent que même si l'évolution de la concentration plasmatique de TNF sous traitement par ICI ne permet pas de prédire la réponse des patients atteints de mélanome avancé, les taux de TNF plasmatiques et la signalisation du TNF dans les lymphocytes T sont plus élevés chez les patients non répondeurs suite à l'induction du traitement. De plus, l'inhibition du TNF en combinaison avec les anti-PD-1 et les anti-CTLA-4 est sûre chez les patients et l'activité clinicobiologique semble dépendre de la nature des anti-TNF. Une telle combinaison n'entrave pas la réponse immunitaire périphérique et a le potentiel d'améliorer la survie des patients atteints de mélanome avancé, comme cela semble se confirmer dans un modèle de mélanome murin.

ANNEXES

Annexe I : Liste des publications

Combining TNF blockade with immune checkpoint inhibitors in patients with cancer

Montfort A, **Virazels M**, Colacios C, Meyer N, Ségui B

Nature Reviews Rheumatology, 2021

PMID : 34226729

Combining Nivolumab and Ipilimumab with Infliximab or Certolizumab in Patients with Advanced Melanoma: First Results of a Phase Ib Clinical Trial

Montfort A, Filleron T, **Virazels M**, Dufau C, Milhès J, Pagès C, Olivier P, Ayyoub M, Mounier M, Lusque A, Brayer S, DelordJP, Andrieu-Abadie N, Levade T, Colacios C, Ségui B*, Meyer N*

Clinical Cancer Research, 2021

PMID : 33272982

New Insights into the Role of Sphingolipid Metabolism in Melanoma

Carrié L*, **Virazels M***, Dufau C*, Montfort A, Levade T, Ségui B, Andrieu-Abadie N

Cells, 2020

PMID : 32858889



*Co-premiers auteurs

Annexe II : New insights into the role of sphingolipid metabolism in melanoma

Article de revue publié dans Cells en août 2020

Review

New Insights into the Role of Sphingolipid Metabolism in Melanoma

Lorry Carrié ^{1,†} , Mathieu Virazels ^{1,†}, Carine Dufau ^{1,†}, Anne Montfort ¹, Thierry Levade ^{1,2}, Bruno Ségui ^{1,‡} and Nathalie Andrieu-Abadie ^{1,*} 

¹ Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Equipe Labellisée Fondation ARC, Université Fédérale de Toulouse Midi-Pyrénées, Université Toulouse III Paul-Sabatier, Inserm 1037, 2 avenue Hubert Curien, CS 53717, 31037 Toulouse CEDEX 1, France; lorry.carrie@inserm.fr (L.C.); mathieu.virazels@inserm.fr (M.V.); carine.dufau@inserm.fr (C.D.); anne.montfort@inserm.fr (A.M.); thierry.levade@inserm.fr (T.L.); bruno.segui@inserm.fr (B.S.)

² Laboratoire de Biochimie Métabolique, CHU, 31059 Toulouse, France

* Correspondence: nathalie.andrieu@inserm.fr; Tel.: +33-582-7416-20

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors jointly supervised this work.

Received: 17 July 2020; Accepted: 24 August 2020; Published: 26 August 2020



Abstract: Cutaneous melanoma is a deadly skin cancer whose aggressiveness is directly linked to its metastatic potency. Despite remarkable breakthroughs in term of treatments with the emergence of targeted therapy and immunotherapy, the prognosis for metastatic patients remains uncertain mainly because of resistances. Better understanding the mechanisms responsible for melanoma progression is therefore essential to uncover new therapeutic targets. Interestingly, the sphingolipid metabolism is dysregulated in melanoma and is associated with melanoma progression and resistance to treatment. This review summarises the impact of the sphingolipid metabolism on melanoma from the initiation to metastatic dissemination with emphasis on melanoma plasticity, immune responses and resistance to treatments.

Keywords: cancer; ceramide; gangliosides; immunotherapy; metastasis; phenotype switching; sphingosine 1-phosphate

1. Introduction

Cutaneous melanoma is a skin cancer whose incidence is increasing significantly worldwide (Figure 1). Even though melanoma is not frequent, accounting for less than 5% of skin cancers, it can be very aggressive and causes more than 75% of all skin cancer deaths [1] (Figure 1). Despite significant improvement of treatment strategies in the last decade, owing both to the emergence of BRAF- or MEK-targeted therapies and checkpoint blockade immunotherapies (i.e., anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA4) and anti-programmed cell death-1 (PD-1)), the prognosis for patients with metastatic melanoma remains uncertain, predominantly due to treatment failures and recurrences [2]. Fortunately, melanoma is usually curable by excisional surgery if detected at an early stage, with a high five-year survival rate [3,4]. Thus, a better understanding of melanoma progression processes, before dissemination, is a major public health issue in order to discern new therapeutic targets.

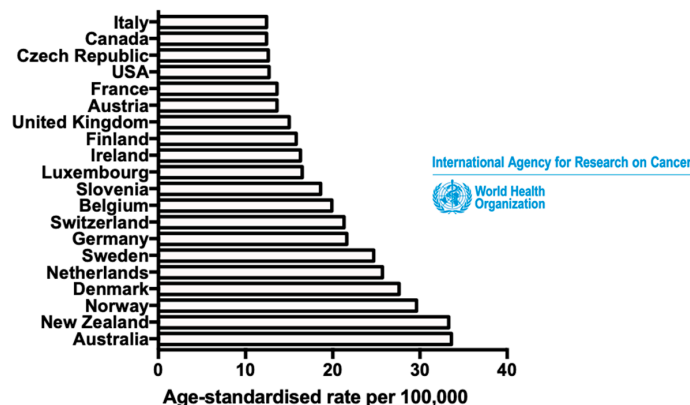


Figure 1. Cutaneous melanoma: the 19th most common cancer worldwide. Estimated age-standardised incidence rates of cutaneous melanoma in the most affected countries in 2018, for both sexes and all ages. Data from the International Agency for Research on Cancer (World Health Organisation).

Melanoma arises from melanocytes, i.e., melanin-producing neural crest-derived cells, which are located at the junction between the epidermis and the dermis [5]. The initial stage of melanomagenesis corresponds to a radial-growth phase (RGP), in which melanoma cells invade laterally but stay confined into the epidermis. This stage is followed by a vertical-growth phase (VGP), in which melanoma cells invade the dermis and are able to reach blood vessels. Then, an extravasation stage, corresponding to the release of melanoma cells from the blood circulation into new tissues, leads to the formation of metastatic niches [6–8]. Melanomagenesis requires at least two key events. The first is activating mutations in oncogenes such as *BRAF* or *NRAS*. *BRAF* mutations are found in 50% of melanoma patients (Figure 2) and the V600E mutation accounts for approximately 75% of all *BRAF* mutations detected in cutaneous melanoma [9]. Conversely, the most common *NRAS* mutations, i.e., Q61R and Q61K, affect about 20% of melanoma patients [10]. Since *BRAF* and *NRAS* mutations are mutually exclusives, these driver mutations lead to constitutive activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and aberrant cancer cell proliferation in approximately 70% of patients (Figure 2) [11]. The second event is illustrated by the loss of expression of key tumour suppressor genes such as *PTEN* or cell cycle checkpoint regulators such as *CDKN2A*, which occur in 13% and 24% of patients, respectively (Figure 2). These genetic changes can bypass oncogene-induced senescence (OIS) processes and cause the immortalisation of tumour cells [4,7,12] (Figure 2).

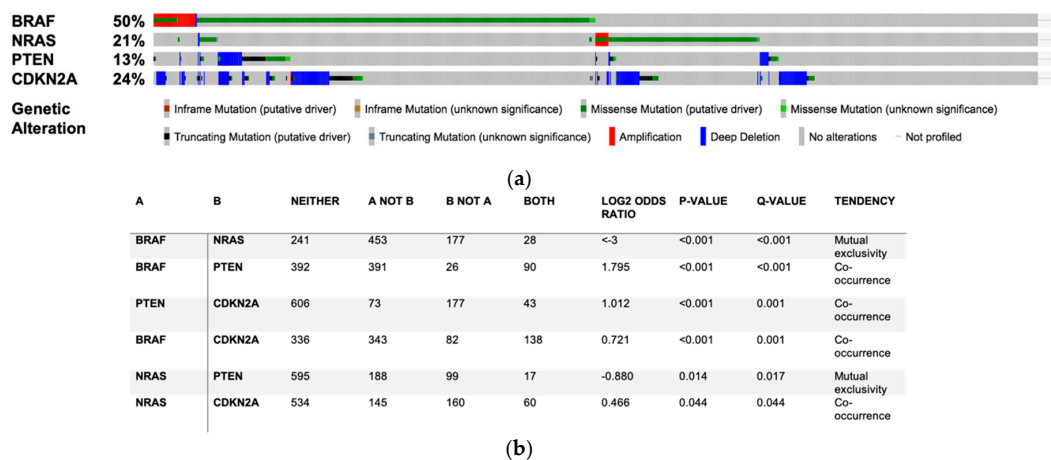


Figure 2. *BRAF*, *NRAS*, *PTEN* and *CDKN2A* are the most frequently mutated genes in cutaneous melanoma. Mutation rate, genetic alteration (a) and mutual exclusivity (b) for *BRAF*, *NRAS*, *PTEN* and *CDKN2A* mutations observed in 1635 samples from 1584 patients included in 12 studies analysed on cBioportal for cancer genomics (<https://www.cbioportal.org>).

Metabolic reprogramming is also crucial for melanomagenesis. Indeed, a shift from mitochondrial oxidative phosphorylation to cytoplasmic anaerobic glycolysis, known as Warburg effect, is required for metastatic dissemination [13]. The present review focuses on alterations in the metabolism of sphingolipids (SL). Interestingly, several key enzymes of the glycolytic pathway can be severely affected by changes in SL metabolism in melanoma. For instance, C16-ceramide, which is the major long-chain ceramide in melanocytes and melanoma cells, impairs pyruvate kinase, hexokinase and LDH activities, consequently altering cellular glycolysis and inhibiting melanoma progression [14].

How modulations of the SL metabolism affect dermatologic diseases have long been studied [15] and accumulating evidence demonstrates the presence of alterations in the ceramide metabolism in melanoma cells. This article aims at providing a comprehensive overview of the effects dysregulations of the SL metabolism have on melanomagenesis, melanoma progression, immunity and resistance to treatment, especially linked to the phenotype switching.

2. Alterations of Sphingolipid Metabolism in Melanoma

The main dysregulation affecting the SL metabolism in melanoma cells is a trend toward a reduction of ceramide, which promotes cell death (for review, see [16]). This is associated with changes in the expression and/or activity of a number of enzymes as well as the accumulation of tumour-promoting metabolites, which include sphingosine 1-phosphate (S1P) and gangliosides (Figure 3).

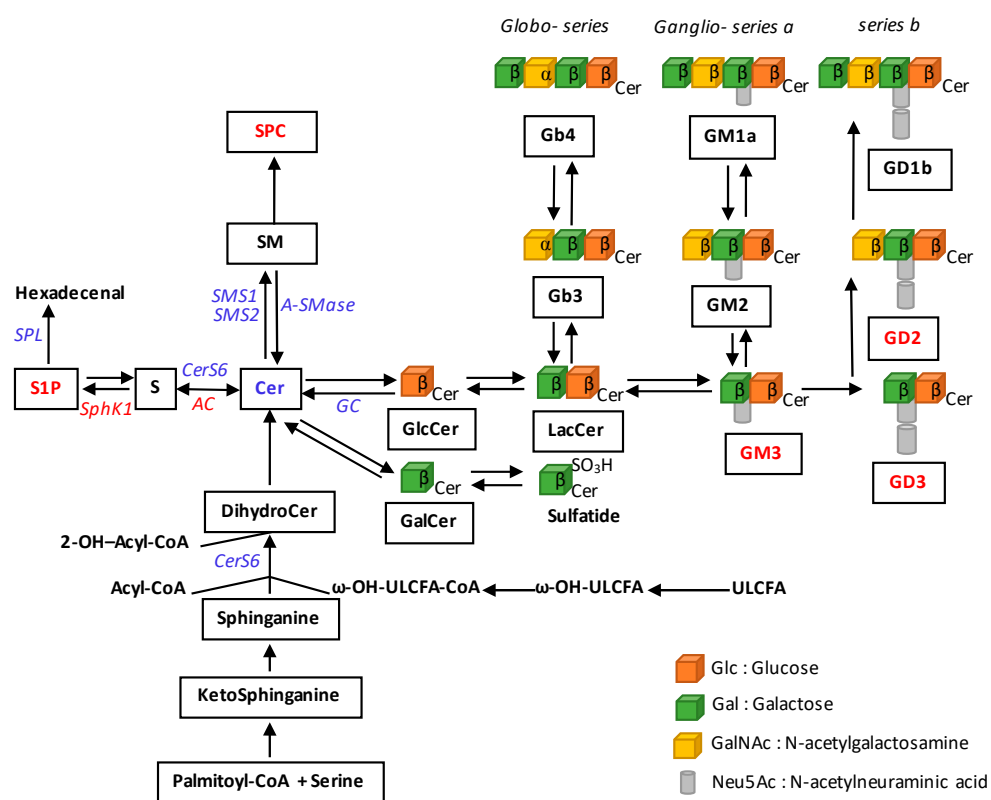


Figure 3. Multiple dysregulations of sphingolipid metabolism in melanoma. SL metabolites or SL-metabolising enzymes whose levels or expression are altered in melanoma, are mentioned. Decreases are indicated in blue and increases in red. AC, acid ceramidase; Cer, ceramide; CERS, ceramide synthase; CoA, coenzyme A; DihydroCer, dihydroceramide; GalCer, galactosylceramide; GC, glucosylceramidase; GlcCer, glucosylceramide; LacCer, lactosylceramide; S, sphingosine; S1P, sphingosine 1-phosphate; SM, sphingomyelin; SMases, sphingomyelinases; SMS, sphingomyelin synthase; SPC, sphingosylphosphorylcholine; SphK, sphingosine kinase; SPL, S1P lyase; ULCFA, ultralong chain fatty acids.

The impact of SL metabolism dysregulations in melanoma cell lines and/or patients is summarised in Table 1. For instance, a low expression of the ceramide synthase 6 (CerS6) in melanoma cells is related to malignant behaviours as demonstrated in WM35, WM451 and SKMEL28 human melanoma cell lines [17]. In addition, acid ceramidase (AC), encoded by the *ASAH1* gene, which hydrolyses ceramide into sphingosine, is expressed at high levels in melanocytes and proliferative melanoma cells, as observed in vitro as well as in biopsies from patients with stage II melanoma [18]. *ASAH1* expression was: (i) higher in human melanoma cell lines exhibiting a proliferative phenotype as compared to invasive ones; and (ii) reduced at the invasive front on tumour specimens from melanoma patients [19]. Sphingosine kinase 1 (SphK1), which phosphorylates sphingosine to produce sphingosine-1-phosphate (S1P), also shows increased expression and/or activity in melanoma cells compared to melanocytes, not only in human and murine cell lines [20,21] but also in human biopsies [22]. Collectively, these findings suggest a shift of the S1P-ceramide balance towards S1P production in melanoma cells. In accordance, the expression of *SGPL1* gene, encoding for S1P lyase (SPL), is downregulated in melanoma cell lines when compared to adult or juvenile melanocytes, suggesting that *SGPL1* might be downregulated during melanomagenesis [23].

Ceramide can also be converted into more complex SL, such as gangliosides. For instance, mono- and disialoganglioside levels are very high in human melanoma cells and tissues, especially GD3 [24]. Interestingly, levels of this latter ganglioside were correlated to the expression of the c-Yes tyrosine kinase whose activity is known to increase in melanoma cells as compared to melanocytes [25] and whose inhibition reduced the malignant potential of GD3⁺ melanoma cells only [26].

Alterations of the ceramide metabolism also include changes in the expression of sphingomyelin synthase 1 (SMS1), which is encoded by the *SGMS1* gene and catalyses the transformation of ceramide into sphingomyelin (SM) [27,28]. *SGMS1* is expressed at low levels in most of the human melanoma biopsies and low *SGMS1* expression is associated with a worse prognosis in metastatic melanoma patients. Of interest, a weak expression of *SMS1* was shown not to be associated with an intracellular accumulation of ceramide, most likely due to its conversion into glucosylceramide (GlcCer) through GlcCer synthase (GCS). Consequently, 6 out of 10 human melanoma cell lines exhibited higher levels of GlcCer than SM [29]. Moreover, SM can also be transformed into sphingosylphosphorylcholine (SPC) by a yet uncharacterised SM deacylase and SPC has been shown to stimulate regulators of melanomagenesis such as extracellular signal-regulated kinases (ERK), microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and Akt/mTOR [30–33].

Table 1. Impact of SL and SL-metabolising enzymes dysregulations on melanoma cell lines and patients.

| SL or SL-Metabolising Enzymes | Dysregulation | Cell Lines or Patients | Effects | Refs |
|-------------------------------|---------------|---|---|---------|
| CerS6 | Decreased | WM35, WM451 and SKMEL28 human melanoma cells | Malignant behaviour | [17] |
| AC | Decreased | Proliferative and invasive human melanoma cells | Pro-invasive | [18,19] |
| SphK1 | Increased | Murine and human melanoma cells and biopsies | Pro-tumoral Immunosuppressive signature | [20–22] |
| SPL | Decreased | Human melanoma cells | Resistance to chemotherapy Increased proliferation | [23] |
| GD3 | Increased | GD3 ⁺ human melanoma cells with c-Yes inhibition | Reduced malignancy | [24–26] |
| SMS1 | Decreased | Human biopsies | Worse prognosis | [29] |

Table 1. Cont.

| SL or SL-Metabolising Enzymes | Dysregulation | Cell Lines or Patients | Effects | Refs |
|-------------------------------|---------------|---|--|---------|
| SPC | Increased | Mel-Ab and human melanocytes | Stimulate melanomagenesis Hypopigmentation in melanocytes | [30–33] |
| A-SMase | Decreased | Primary melanomas and lymph node metastases Pigmented murine and human melanomas | Inverse correlation with melanin content | [34,35] |

Finally, the expression of acid sphingomyelinase (A-SMase), which hydrolyses SM into ceramide, has been shown to be higher in benign nevi than in primary melanomas, and further reduced in the lymph-node metastases [34]. Moreover, a lower expression/activity of A-SMase was observed in hyper-pigmented murine and human melanomas as compared to the hypo-pigmented ones, suggesting an inverse correlation between A-SMase expression/activity and melanin content. In accordance, exogenous C2-ceramide decreased melanin content in melanocytes [35].

3. Role of the Sphingolipid Metabolism in Melanomagenesis

3.1. Do SL Metabolism Alterations Increase the Risk to Develop Melanoma?

A genome-wide association study has identified the 1q21.3 chromosomal region, containing LASS2 gene that encodes ceramide synthase 2 (CerS2), as a locus predisposing to cutaneous melanoma [36]. These observations suggest the involvement of some genetic determinants of the ceramide metabolism in melanoma predisposition. Interestingly, a defect in glucosylceramidase 1 (GBA1) resulting in Gaucher inborn disorder (GD), owing to a defect in GlcCer hydrolysis into ceramide, is associated with an increased risk of malignancies, including melanoma [37,38]. Indeed, accumulation of GlcCer as well as glucosylsphingosine, which arises from the cleavage of excess GlcCer by AC [39,40], occurs in macrophages and could severely alter the immune and inflammatory responses. This could create a favourable microenvironment to promote melanomagenesis (for review see [38]).

Another hypothetical link between glucosylceramidase (GC) and melanoma development is autophagy, which can be either cell protective, promoting their survival, or lethal, via induction of a programmed-cell death mechanism [41,42]. Defective autophagy has been reported in models of GC or saposin C deficiency [43]. Accumulation of GlcCer was associated to autophagy dysfunction in a drosophila model of GD that lacked the two fly GBA1 orthologues [44]. In accordance, GlcCer accumulation was also associated with autophagy impairment and defective autophagosome-lysosome fusion, resulting in autophagosome accumulation in induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from patients with GD [45]. Moreover, an hyperactivation of the autophagic inhibitor mTOR and a downregulation of the master regulator of lysosome function TFEB were reported in human neuroglioma cells treated with the GC inhibitor conduritol B epoxide [46]. Numerous studies have shown that impaired autophagy can favour melanoma development. Indeed, the activation of mTOR was associated with poor prognosis in melanoma patients [47]. In addition, ERK-induced TFEB phosphorylation impaired expression of autophagy-lysosome target genes in BRAF-mutated melanoma, which elicited the formation of TGF- β -dependent metastases [48].

All these findings indicate a possible link between GC deficiency and melanomagenesis, that may result from an altered immune response or disturbed autophagy. The underlying mechanisms remain, however, to be determined.

3.2. Sphingolipid Metabolism Modulates Melanoma Cell Proliferation and Survival

Transformation of normal melanocytes into melanoma cells is mediated by the activation of growth stimulatory pathways, typically leading to cellular proliferation as well as the inactivation of

apoptotic and tumour suppressor pathways. The RAS-RAF-MEK-ERK pathway is one of the most important signalling pathways involved in melanoma cell growth and survival [49,50]. A constitutive activation of BRAF, mostly due to the substitution of valine by glutamic acid at position 600 (also known as V600E), affects about 50% of melanoma patients [9,51–53] (Figure 2). Therapies targeting the BRAF V600E mutation help advanced melanoma patients live longer [54,55]. Moreover, co-administration of BRAF (vemurafenib) and MEK (cobimetinib) inhibitors improves the progression-free survival [56] and extends the five-year overall survival by ~40% [57]. Unfortunately, most patients, including those who experience an initial tumour regression, exhibit disease progression within 6–8 months following the initiation of targeted therapy [58].

Multiple lines of evidence indicate that some SL-metabolising enzymes regulate melanoma cell proliferation and survival. First, SphK1 expression and activity are induced by ERK1/2 and AKT in numerous mammalian cells [59–61], including melanoma cells [20,21]. Moreover, SphK1 knockdown by siRNA decreased anchorage-dependent and -independent growth of human melanoma cells [20]. Similarly, targeting SphK1 using shRNA in B16F10 [62] or Yumm 1.7 [22] murine melanoma cells reduced tumour growth in syngeneic mice. Accordingly, the SphK1 inhibitor SKI-I, which increases the intracellular ceramide levels and decreases S1P levels in melanoma cells, resulted in a cell cycle arrest between G2/M and S phases as well as increased apoptotic cell death, caspase-3 activation and nuclear accumulation of cleaved PARP [20]. The intraperitoneal administration of SKI-I in mice harbouring melanoma also decreased tumour growth [20,22]. Consistently, the growth of B16F10 tumours is impaired in SphK1^{-/-} mice as compared to wild-type animals [21].

S1P, which is mainly produced by SphK1 in melanoma cells, conveys oncogenic signals as an intracellular second messenger via a ligation of a family of G-protein coupled receptors (S1P1–5) expressed both on the malignant and their neighbouring cells [63]. We recently demonstrated that the melanoma cell-autonomous survival in response to the BRAF inhibitor vemurafenib is mediated by S1P1 and S1P3 [64].

Moreover, AC, which is expressed at high levels in proliferative melanoma cells, may also contribute to melanoma cell proliferation and survival. Indeed, AC inhibition by siRNA dramatically reduced the number of 501mel melanoma cells, as shown using short-term cell growth and colony formation assays [19]. Similarly, CRISPR/Cas9-mediated AC ablation in A375 melanoma cells blocked G1/S cell cycle progression, promoted senescence and apoptosis, resulting in reduced cell growth. These cells were unable to form spheroids and showed a lower replication rate as well as a decreased invasive capacity compared to controls. Mechanistically, AC ablation resulted in the accumulation of the saturated C14-, C16- and C18-ceramides and is accompanied by the down-regulation of MYC, CDK1, CHK1 and AKT [65]. In accordance, the inhibition of AC activity with a chemically stable AC inhibitor, named compound ARN14988, sensitised proliferative melanoma cells to the cytotoxic actions of various anti-tumour agents [18]. In line with these observations, we previously reported that the cytotoxic action of dacarbazine was accompanied with AC proteolysis in human melanoma cells [66]. Of interest, confocal immunofluorescence analyses revealed the nuclear localisation of AC in normal melanocytes, a phenomenon not observed in melanoma cells, suggesting that AC could activate proliferation pathways only in tumour cells [18].

By reducing ceramide levels, AC, in concert with SphK1, favours melanoma cell proliferation. This was confirmed using short-chain C2-ceramide, which was reported to inhibit AKT and ERK activation as well as proliferation in Malme-3M melanoma cells [67]. In addition, the GCS inhibitor PDMP, which increases intracellular C16-ceramide levels, inhibited cell proliferation, migration and invasion of WM35 and WM451 human melanoma cells. The effect of PDMP was associated with the inhibition of key enzymes from the glycolysis pathway including the pyruvate kinase, hexokinase and lactic acid dehydrogenase. Strikingly, the treatment of melanoma cells with exogenous C16-ceramide neither altered melanoma cell growth nor migration and invasion. In contrast, exogenous C16-ceramide was shown to promote glycolysis. This opposite effect could be explained by the reduction of endogenous C16-ceramide levels, which was induced by exogenous C16-ceramide treatment [14].

Finally, GCS, which catalyses the first committed step in the synthesis of most glycosphingolipids, i.e., the transfer of glucose to ceramide to form GlcCer, is also able to control tumorigenic capability of melanoma cells. Indeed, antisense oligonucleotide targeting the *Ugcg* gene, encoding GCS, reduced tumorigenicity of MEB4 murine melanoma cells [68]. Similarly, the inhibitor of GCS, OGT2378, inhibited MEB4 melanoma tumour growth in a syngeneic, orthotopic murine model [69]. In agreement with these findings, we previously showed that overexpression of GBA2 in melanoma cells, an enzyme able to degrade GlcCer into ceramide, reduced tumour cell growth both in vitro and in vivo by triggering ER stress-induced apoptosis [70]. Of note, GBA2 gene is downregulated in melanoma cells as compared to melanocytes [70]. Altogether, these observations demonstrate that the transformation of ceramide into GlcCer facilitates melanoma cell proliferation.

Interestingly, sialic acid-containing glycosphingolipids, i.e., gangliosides, can also regulate melanoma cell proliferation. First, treatment of SKMEL-28 melanoma cells with the anti-GD3 antibody R24 reduced their growth in vitro and decreased their tumorigenicity when injected in immunodeficient mice [71]. Second, Furukawa et al. demonstrated that GD3 increased the proliferation of GD3 synthase-overexpressing melanoma cells [72]. In these settings, GD3 mediated the convergence of several pro-tumoral signals, including those induced by hepatocyte growth factor (HGF) and the receptor tyrosine kinase c-MET, notably promoting cell proliferation [73].

Altogether, these data illustrate that SL metabolism alterations, which redirect ceramide metabolism towards S1P or GD3 production, can promote melanoma cell proliferation and survival in response to drugs.

4. Role of the Sphingolipid Metabolism in Melanoma Progression

4.1. SL Metabolism Regulates Melanoma Cell Adhesion

Cell junctions, which are crucial for the communication between neighbouring cells and with the extracellular environment, can be divided into three major classes: anchoring junctions (including adherens junctions, desmosomes, hemidesmosomes and focal adhesions), tight junctions and gap junctions. In the epidermis, cadherins are the major adhesion molecules, especially involved in the composition of desmosomes and adherens junctions [74], whereas integrins are the major component of hemidesmosomes [75]. Among cadherins, E-cadherin mediates the adhesion between melanocytes and keratinocytes allowing keratinocytes to control cell growth and dendricity of melanocytes [76]. E-cadherin expression is lost in melanoma cells during the first steps of tumour progression [77]. Interestingly, when E-cadherin expression is restored, keratinocytes recover control of melanoma cells thus preventing tumour progression [78].

Here, we review studies documenting the role of the SL metabolism in the control of the expression of adhesion molecules as well as melanoma cell adhesion capacity. Previous reports have shown that E-cadherin loss was observed in SphK1-overexpressing cancer cells [79,80]. S1P-induced E-cadherin downregulation could be mediated by S1P2 and S1P3, as shown in alveolar epithelial cells [81] and lung fibroblasts [82]. This phenomenon could be indirect in melanoma cells as the SphK1/S1P pathway is able to stimulate TGF- β 1 production [62], which may trans-activate S1P2 and S1P3 [82]. Interestingly, overexpression of S1P2, but not S1P1, in B16F10 melanoma cells resulted in the inhibition of the small GTPase Rac activity as well as tumour progression in mice [83]. Importantly, Rac is crucial to create E-cadherin-dependent cell-cell contacts [84].

Moreover, downregulation of AC in melanoma cells induced E-cadherin loss and, inversely, increased expression of the epithelial-mesenchymal transition (EMT)-associated protein TWIST1, which is in accordance with a more aggressive phenotype [19].

Finally, GD3 was shown to favour the recruitment of integrins through glycolipid-enriched microdomains in GD3 synthase-overexpressing melanoma cells. Under these conditions, melanoma cell adhesion to the extracellular matrix (ECM) was increased [85]. Similarly, Ohmi et al. demonstrated that cell adhesion increased in GD2 synthase-overexpressing melanoma cells as compared control cells [86].

Thus, SL alterations appear to impact on melanoma cell adhesion, particularly through E-cadherin loss, which promotes melanoma progression.

4.2. SL Metabolism as a Determinant of Melanoma Plasticity

To colonise distant organs, tumour cells need, besides losing their cell junctions, to acquire invasive capacities. In skin cancers, EMT plays a key role in this process. This fundamental mechanism allows epithelial cells to gain mesenchymal features, increasing their migration and invasion abilities (for review, see [87]). However, unlike other skin cancers, melanoma does not arise from epithelial cells but from neural crest-derived melanocytes. For this reason, EMT *stricto sensu* cannot be considered in melanoma progression. Nevertheless, an EMT-like phenomenon has been described, in which melanoma cells can dynamically and reversibly switch between a proliferative and an invasive state; this is known as “phenotype switching”. Indeed, the microarray analysis of DNA from different human melanoma cell lines allowed Hoek et al. to determine a transcriptional signature representative of metastatic cell behaviour. The authors indeed demonstrated that MITF is one crucial actor in this switch, particularly in maintaining the proliferative state [88].

MITF represents a melanocytic lineage-specific transcription factor that regulates melanocyte differentiation, function and survival as well as melanoma progression [89]. MITF regulates pigment cell-specific transcription of genes encoding melanogenic enzymes such as TYR, DCT and TYRP1, as well as proteins involved in melanosome formation and maturation such as Melan-A, Premelanosome Protein and G Protein-Coupled Receptor 143. As a matter of fact, MITF expression and activity are modulated by a range of activators and suppressors operating at transcriptional, post-transcriptional and post-translational levels (for review, see [90]). MITF function has been tightly connected to melanoma cell plasticity. It is now well accepted that melanoma cells expressing moderate to high levels of MITF proliferate rapidly and are poorly invasive, whereas melanoma cells characterised by low MITF levels grow more slowly and are more invasive. Thereby, low levels of MITF correlate with a worse prognosis for melanoma patients [19,89,91].

Interestingly, numerous studies showed that the SL metabolism regulates MITF expression. Firstly, A-SMase expression has been shown to induce ERK-mediated MITF degradation by the proteasome. Therefore, the loss of A-SMase observed during melanoma progression accounts for the upregulation of MITF as well as for some of its downstream targets CDK2, Bcl-2 and c-MET [34]. Secondly, AC ablation by the CRISPR-Cas9 technology, which is associated with the accumulation of long-chain saturated ceramides, led to a strong downregulation of MITF expression in human A375 melanoma cells, reducing their ability to form cancer-initiating cells and to undergo self-renewal [65]. Furthermore, exogenous addition of C2-ceramide was shown to reduce MITF expression in human melanocytes [35]. Reciprocally, we demonstrated that MITF expression increased in AC-overexpressing melanoma cells. However, at variance with Lai et al., we observed that melanoma cells expressing AC at high levels displayed a proliferative phenotype as compared to cells with low expression of AC that exhibited high mobility and gain of mesenchymal features [19]. Moreover, using a ChIP-Seq database, we identified AC as a new target of MITF, demonstrating that MITF and AC are part of a positive feedback loop.

SL metabolism could also modulate MITF levels by acting on signalling pathways known to regulate its expression in melanoma cells. For instance, canonical Wnt signalling through the Wnt/ β -catenin pathway is a critical activator of MITF expression in melanoma cells [92], and deactivation correlates with a higher metastatic potential [88]. Interestingly, exogenous sphingosine has been shown to reduce nuclear and cytosolic β -catenin expression in SW480 and T84 colon cancer cells [93]. In accordance, pharmacological inhibition of SphK1 with SKI-II was associated to a decreased β -catenin expression in human hepatoma carcinoma [94]. As expected, FTY720, a sphingosine analogue known to inhibit SphK1 [95], led to the reduction of β -catenin as well as MITF expression in melanocytes [96].

Moreover, a switch in EMT-associated transcription factors (EMT-TFs) occurs in melanoma and drives tumour progression. This dynamic network includes Snail, Zeb and Twist families, which are major repressors of epithelial genes, and, conversely, major activators of mesenchymal genes (for

review, see [87]). In particular, a reduced expression of ZEB2 and SNAIL2 in favour of an increased expression in ZEB1 and TWIST1 was linked to E-cadherin loss, increased invasion properties and poor clinical outcomes in human melanoma [97]. The EMT-TFs switch was associated with a reduction of MITF expression. Indeed, ZEB1 and TWIST1 have been shown to downregulate MITF whereas SNAIL2 or ZEB2 induce MITF expression, demonstrating that these EMT-TFs act as key players in melanoma phenotype switching.

Recent studies identified a strong connection between SL metabolism and EMT-TFs. Indeed, reduced expression of CerS6, which decreased the levels of intracellular C16-ceramide, was associated with an increased expression of SNAIL2 in SW480 colon cancer cells [98]. Hence, by controlling the expression of EMT-TFs or by altering plasma membrane fluidity, C16-ceramide could affect cancer cell motility [99]. Another SL-metabolising enzyme could also account for the effects of ceramide on EMT-TFs. Indeed, SMS2, which produces SM from ceramide, seems to stimulate the expression of mesenchymal markers and enhance migration and invasion of MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. Interestingly, SMS2 expression was higher in metastatic breast cancer than in non-metastatic tumours. Mechanistically, SMS2 was shown to activate the canonical TGF β /SMAD signalling pathway leading to the expression of its downstream target Snail [100]. In addition, previous studies have demonstrated that some ganglioside-metabolising enzymes are connected with EMT-TFs and gangliosides play a critical role in EMT [101]. For instance, ZEB1 was reported to be a direct regulator of the GM3 synthase gene (*St3gal5*) in mammary epithelial NM18 cells. ZEB1 also impaired the expression of miR-200a, a microRNA targeting the 3'UTR GM3 synthase mRNA. Knockdown of GM3 synthase partly mimicked the effects of ZEB1 inhibition, leading to increased expression of cell junction components such as E-cadherin as well as intercellular adhesion [102]. Moreover, overexpressing TWIST or SNAIL1 in transformed human mammary epithelial cells enhanced the expression of GD3 synthase [103]. GD3 synthase knockdown reduced breast cancer stem cell-associated properties and completely abrogated tumour formation in vivo. In accordance, other studies have shown that ceramide glycosylation by GCS was enhanced in breast [104] and colon [105] cancer stem cells and GCS inhibition significantly decreased the expression of ZEB1 and β -catenin [105]. Whether GCS, a ganglioside-metabolising enzyme, CerS6 or SMS2 modulates EMT-TFs in melanoma cells remains to be evaluated.

Furthermore, numerous studies have shown that TGF- β is a strong promoter of EMT in many tumours [106,107], including melanoma [88]. TGF- β signalling inhibits MITF expression through PAX3 repression and GLI2 activation. Many studies reported that the SphK1/S1P and the TGF- β signalling are interconnected. Indeed, through its binding to S1P receptors, S1P was shown to promote TGF- β receptor trans-activation leading to Smad phosphorylation and cell migration [108–110]. Additionally, in different cancers including melanoma, S1P was reported to increase TGF- β expression and secretion [62,111,112]. Inversely, TGF- β was able to increase SphK expression and activity, which were essential to control the effects of TGF- β on extracellular matrix remodelling, cell migration and invasion [113,114].

Finally, TEAD transcription factors (TEADs) were identified as key regulators of the invasive state in melanoma [115]. TEADs need coactivators such as YAP and TAZ, which are known effectors of the Hippo pathway. This pathway has been shown to modulate Wnt and TGF- β signalling and confer pro-invasive properties in melanoma [116]. Strikingly, multiple studies have identified S1P as an activator of YAP through S1P2 signalling [117–119]. Similarly, a recent study demonstrated that inhibition of SphK1 using the PF-543 inhibitor could inhibit TGF β -induced activation of YAP [120]. As anticipated from its close structural similarity with S1P, SPC also regulated the Hippo pathway via S1P2, in a rather unclear manner as it could both inhibit and activate YAP [121].

To summarise, tight connections have been reported between SL metabolism and key players of the phenotype switching in melanoma including transcription factors such as MITF, EMT-TFs, TEADs and fundamental signalling pathways such as Wnt, TGF- β and Hippo. These observations further highlight the importance of the SL metabolism in melanoma progression.

4.3. SL Metabolism as a Major Regulator of Melanoma Aggressiveness

As discussed above, melanoma aggressiveness depends on the balance between its proliferative potential and migratory/invasive properties. S1P was reported either to activate or to inhibit melanoma cell migration depending on S1P receptor subtypes. Indeed, whereas S1P inhibited cell migration, with the concomitant inhibition of Rac and stimulation of RhoA, in S1P2-expressing B16F10 cells, it stimulated cell migration of S1P1-overexpressing cells, demonstrating a receptor subtype-specific action of S1P on melanoma cells [83]. The inhibitory effects of S1P were reversed by the S1P2-selective antagonist JTE013, which stimulated Rac and migration of B16F10 cells overexpressing either S1P1 or S1P3 [122]. Similar results were obtained in B16F10 cells treated with SPC instead of S1P [122].

In addition, AC overexpression in melanoma cells decreased tumour cell motility, whereas AC silencing had the opposite effect, as was observed for MITF [19]. We recently demonstrated that low AC expression was associated to increased FAK phosphorylation and relocation at focal adhesions instead of cytoplasm. This phenomenon led to increased expression of integrin $\beta 5$ (ITG $\beta 5$) and integrin αV (ITG αV), which play a critical roles in the migratory and invasive capacity of cancer cells. As a result, the melanoma invasive behaviour induced by AC inhibition was reduced using an ITG $\alpha V\beta 5$ blocking antibody [19].

Another study reported that lung metastases were reduced in A-SMase-deficient mice injected with B16-F10 melanoma cells. Treating B16F10 cells with exogenous A-SMase or C16-ceramide before inoculation restored lung metastatic lesions in A-SMase-deficient mice. Mechanistically, melanoma cells were shown to activate A-SMase in platelets, leading to ceramide production, which favoured the clustering and activation of $\alpha 5\beta 1$ integrins at the surface of melanoma cells and therefore tumour cell adhesion in the lungs [123]. As the expression of melanoma A-SMase negatively correlates with tumour aggressiveness [34], one could speculate that A-SMase expression acts as a key factor that controls melanoma cell invasion and adhesion into the metastatic niches.

Gangliosides also likely contribute to melanoma cell dissemination. As a matter of fact, the level of GM3, which has been described as one of the major gangliosides in melanoma [124], increased in murine metastatic melanoma [125], suggesting a role for GM3 in tumour aggressiveness. Indeed, the addition of GM3 to B16LuF1 melanoma cells, i.e., B16-melanoma cells of lower metastatic potential to lungs, increased their dissemination capacity once injected in mice [126]. Liu et al. also described that de-N-acetyl GM3 (d-GM3), a derivative of ganglioside GM3, was mainly found in metastatic melanomas but not in benign nevi or most primary melanomas. d-GM3 expressing melanoma cells possess increased migratory and invasive capacities as compared to melanoma cells lacking d-GM3. Mechanistically, d-GM3 stimulated MMP-2 expression via the urokinase-like plasminogen activator (uPA) receptor [127].

Some studies indicated that GD3 also stimulates melanoma cell invasion. Indeed, human melanoma GD3-positive cells showed a markedly increased cell invasion potential as compared to GD3-negative cells. The invasive activity induced by GD3 was shown to be mediated by p130Cas or paxillin, two components of the focal adhesion cytoskeleton [72]. More recently, Ohmi et al. compared the effect of GD3 and GD2 on melanoma progression. Using GD3^{high} or GD2^{high} melanoma cells, obtained by overexpressing the respective glycosyltransferases involved in their production, they demonstrated that GD2 enhanced the adhesion properties of melanoma cells, while GD3 stimulated their invasive capacities. These findings led the authors to propose that GD2 would rather act at the primary and metastatic sites in order to promote cell proliferation and dissemination, while GD3 would favour melanoma cell invasion in order to reach a metastatic niche [86].

Finally, emerging literature indicates that tumour exosomes actively participate in tumour invasiveness and favour the formation of pre-metastatic niches in various types of cancer, including melanoma [128–130]. Exosomes are small extracellular vesicles (EVs) that originate from the fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane and convey their cargo towards target cells. They carry transmembrane and cytosolic proteins, DNA and small RNAs [131]. In vitro, melanoma-derived exosomes were shown to promote the EMT-like processes in primary melanocytes.

This effect occurred in an autocrine/paracrine fashion and was mediated by the microRNA Let-7i [132]. In mice, B16-F10-derived exosomes demonstrated preferential homing to lymph nodes and facilitated the seeding of intravenously injected parental cells [133]. In particular, Peinado et al. showed that, through the receptor c-MET, B16-F10-derived exosomes can educate bone marrow-derived cells, promoting angiogenesis, vascular leakiness, the growth of primary tumours and metastasis [128].

It is well known that ceramide, generated by the neutral SMase2 (nSMase2) on the cytosolic leaflet of endosomal membranes, is involved in the budding of exosomes [134]. Mechanistically, the cone-shaped structure of ceramide could induce spontaneous negative curvature by creating an area difference between the membrane leaflets [135]. Moreover, a decrease in the activity of nSMase2 induced by the GW4869 compound, resulted in the reduced release of exosomal miRNAs [136]. By controlling exosomal miRNA secretion, nSMase2 is able to promote angiogenesis as well as metastasis [137]. Furthermore, Kajimoto et al. also showed that S1P, produced by SphK2 but not Sphk1, can regulate the cargo content in exosomes [138,139] probably through the G $\beta\gamma$ subunit of Gi proteins coupled with S1P1 [140]. Whether nSMase2- and/or SphK2-dependent exosome formation modulates melanoma progression remains to be investigated.

All these findings clearly establish a close relationship between SL metabolism and melanoma invasion and suggest that SL metabolism could be therapeutically targeted in order to improve the outcome of melanoma patients.

5. Role of SL Metabolism in the Immune Response to Melanoma

Melanoma cells harbour an aberrant antigenic profile, which allows for an anti-tumour immune response [141]. Despite their high immunogenicity, melanoma cells eventually evade the immune system, grow and metastasise [142,143]. A growing body of evidence in the literature indicates that SLs regulate various immune processes. Thus, deciphering the role of SL metabolism in melanoma immune escape is of great clinical interest.

5.1. S1P in Lymphocyte Traffic and Differentiation

Lymphocytes sense S1P concentration via S1P1 [144,145] allowing their egress from the thymus and lymph nodes to peripheral tissues [146]. S1P1 expression is modulated cyclically during lymphocyte traffic, depending on the local S1P concentration: it is downregulated in the blood, upregulated in secondary lymphoid organs (SLO) and downregulated again in the lymph [147]. CD69, an early activation marker on lymphocyte surface, induces S1P1 internalisation and degradation [148], sequestering lymphocytes in SLO [149] and peripheral tissues [150]. S1P1 downregulation is necessary to establish a long-term memory in the skin [151,152] and CD69 is one of the markers (with CD103) for tissue-resident memory cells (TRM) [153], which play a critical role in melanoma immunosurveillance [154–156].

Drouillard et al. proposed that the S1P1/S1P2 ratio dictates the migration of T cells, as S1P2 inhibited the chemo-attraction of peripheral T cells [157]. Sic et al. reported that human B cells also migrate towards S1P in an S1P1-dependent manner that is inhibited by CD69 expression [158]. Interestingly, egress of natural killer (NK) cells from the bone marrow and SLO is mediated by the expression of S1P5 [159,160], which is regulated by T-box transcription factor TBX21 [161]. Increased S1P5 expression as well as downregulation of CXCR4 during NK differentiation is necessary for their egress from the bone marrow [162].

SphK activity and S1P1 expression were shown to mediate differentiation of CD4⁺ T cells to Th1 cells and inhibit induced Treg (iTreg) generation [163]. In accordance, in T cell-specific S1p1-transgenic mice, S1P1 oriented the differentiation of CD4⁺ towards the Th1 lineage when antigen-activated. Moreover, S1P1 overexpression impaired the maintenance of Foxp3 expression in naïve TGF- β -treated CD4⁺ T cells. The differentiation of naïve CD4⁺ T cells towards Th1 or iTreg appeared to be reciprocal, driven by the S1P1-mTOR axis, and dependent on the SphK activity as demonstrated with the SphK

inhibitors N,N,-dimethylsphingosine (DMS) and SKI. Similarly, CD4⁺ T cells deficient for Sphk1 showed a lesser Foxp3 expression when cultured with IL-2 and TGF- β [164].

5.2. S1P Impairs the Immune Response in Melanoma

We reported that melanoma SphK1 plays a key role in the recruitment and phenotypic switch of TAM notably promoting their commitment to a pro-tumoral M2-like phenotype [62]. Moreover, we recently showed that high SphK1 expression in melanoma cells was associated with shorter progression-free and overall survivals in melanoma patients treated with anti-PD-1-based immunotherapy. In mice, SphK1 knockdown in melanoma tumours potently reduced the production of a number of immunosuppressive cytokines including TGF- β [22,62], limiting Treg tumour infiltration. Under these conditions, the response of melanoma cells to anti-PD-1 or anti-CTLA-4-based immunotherapy highly increased [22]. Interestingly, Chakraborty et al. also reported that tumour-infiltrating lymphocytes display higher Sphk1 expression as compared to splenocytes in B16-F10-bearing mice [164]. Melanoma antigen-specific T cells deficient for Sphk1 (pMel-SphK1^{-/-} T cells) were shown to maintain a central memory phenotype and have a reduced propensity to differentiate into Treg as compared to wild-type T cells (pMel T cells). Tumour growth was significantly slower upon adoptive transfer of pMel-SphK1^{-/-} T cells, as compared to mice injected with wild-type pMel T cells [164].

Recent findings also show that S1P secretion, via the S1P transporter Spinster Homologue 2 (Spns2), reduced CD8⁺ T cell function and therefore promoted lung metastasis. Indeed, the deletion of Spns2, either globally or in a lymphatic endothelial cell-specific manner, was associated with an increased ratio of effector T-cells to immunosuppressive Tregs, in the lungs of Spns2-deficient mice intravenously injected with B16F10 or HcMel12 murine melanoma cells. This resulted in a reduced pulmonary metastatic burden as compared to what was observed in wild-type animals [165].

5.3. Ceramide and Its Derivatives in the Immune Response

Several studies have shown that ceramide metabolism could regulate the immune response in different melanoma models. Firstly, A-SMase-deficient B16-F1 melanoma cells engrafted in mice display an inflammatory TME and are infiltrated by high levels MDSCs and Tregs and low levels of DCs. A-SMase overexpression in these cells restores CD8⁺ and CD4⁺ T cells and DCs infiltration while reducing levels of infiltrating MDSCs and Tregs, thereby reducing tumour growth [166].

Secondly, KRN7000, a synthetic alpha-galactosylceramide [167], showed promising results in enhancing NK, NKT, CD8⁺ T cells and M1 infiltration in the syngeneic murine B16 metastatic melanoma model [168] but further investigation needs to be conducted.

Thirdly, it was recently reported that liposomes enriched in C2-ceramide were shown to reprogram the immune TME in a PKC ζ -dependent manner in B16-F10-bearing mice. Under these conditions, TAMs shifted towards an M1 phenotype and CD8⁺ and Th1 cells infiltration was enhanced while intra-tumour MDSCs and Tregs levels were reduced [169].

Finally, gangliosides also represent attractive targets for immunotherapies as they are abundant in melanoma cells [24] and recognised by NKT cells [170]. GM2 [171] and N-glycolyl GM3 (NGcGM3), in particular, have been the main gangliosides used as targets for the development of anti-melanoma antibodies and vaccine [172,173]. In addition, gangliosides are also known to be shed by melanoma cells [174,175] and exert a pro-apoptotic effect on DCs [176,177]. 3F8, a monoclonal anti-GD2 mAb, demonstrated anti-proliferative and pro-apoptotic activity in human melanoma cell lines [178] but clinical studies focused on neuroblastoma [179] and medulloblastoma [180] patients. More recently, GD2 has been considered as a promising target for the treatment of melanoma patients using either CAR-T cell therapy [181] or the immunocytokine hu14.18-IL2, an anti-GD2 humanised mAb linked to two molecules of IL-2 and administered to patients with recurrent resectable stage III or IV melanoma [182].

5.4. Melanoma-Derived Exosomes Are Vectors of Immunosuppression

As mentioned above, Trajkovic et al. showed that the production of ceramide by nSMase 2 was part of the mechanisms involved in exosome budding [134]. In addition to favouring progression and metastasis, melanoma-derived small extracellular vesicles, often defined as exosomes, also carry immunomodulatory molecules that impair anti-tumour immune responses. In vitro, exosomes released from B16F0 murine melanoma cells inhibited the proliferation of T cells by delivering PTPN11(SHP-2) mRNA and protein [183]. B16F10-derived exosomes can also activate the mitochondrial apoptotic pathway of CD4⁺ T cells in vitro and in vivo, thereby increasing tumour growth and reducing T cell infiltration [184]. The authors proposed that the miRNA cargo of exosomes (e.g., miR-690) inhibited the expression of anti-apoptotic proteins in CD4⁺ T cells. In addition, small EVs produced by A375 human melanoma cells were shown to be able to reduce MHC class I molecules to the cell surface of primary human monocytes and THP-1 cells and downregulate the expression of endogenous MHC class I and II molecules in DCs [185]. Exosomes from metastatic melanoma-derived cell lines inhibited TCR signalling and cytokines secretion in CD8⁺ T cells by transferring an array of miRNA cargo [186]. Moreover, tumour-derived exosomes harvested from melanoma patients' plasma were shown to induce the apoptosis, inhibit proliferation and decrease the activation of CD8⁺ T cells. They were also able to downregulate NKG2D expression on NK cells [187]. In metastatic melanoma patients, circulating exosomal PD-L1 suppressed CD8⁺ T cell activity. The authors reported that the pre-treatment level of circulating exosomal PD-L1 was a better predictor of clinical response to anti-PD-1 therapy than total circulating PD-L1 [188]. Importantly, Poggio et al. showed that Pd11 knockout or exosome depletion by knocking out Smpd3, the gene encoding nSMase2, was sufficient to restore the anti-tumour immune response and to induce an efficient anti-tumour immune-memory response in the murine TRAMP-C2 prostate cancer model [189].

The relationship between SL metabolism and exosome-mediated immunosuppression in melanoma is not well understood, yet it could be a major mechanism of resistance to immunotherapy and thus deserves further investigation.

6. Potential Therapeutic Strategies for Melanoma Patients

Historically, when tumour resection was not possible or failed, chemotherapy was used to treat melanoma. dacarbazine (DTIC) has been approved as first-line treatment for advanced-stage melanoma and has remained for more than 30 years the standard chemotherapy despite no clear overall survival benefits [190–192].

The identification of melanoma driven mutations such as BRAF V600E allowed for a real breakthrough in the treatment of patients with metastatic melanoma. The emergence of BRAF targeted agents such as vemurafenib [54] and dabrafenib [55] allowed tremendous progresses in the field of personalised medicine and demonstrated survival benefits in metastatic melanoma patients as compared to dacarbazine-treated patients. Subsequently, the MEK inhibitor was also approved as treatment for this pathology as it showed survival benefits for patients displaying the BRAF V600E mutation [193]. Combination therapy using BRAF and MEK inhibitors such as cobimetinib [56] is nowadays one of the first line treatment for patients with BRAF V600E metastatic melanoma. This treatment results in higher rates as well as extended duration of response and decreases the cutaneous toxicities observed with the BRAF inhibitor monotherapy. Unfortunately, such therapeutic approaches remain constrained by the inevitable emergence of resistance to single-pathway blockade [194].

Immune checkpoint blockade (ICB) was the first therapeutic strategy to provide sustained responses and survival for advanced melanoma patients, even after treatment discontinuation [195–197]. Administering monoclonal antibodies targeting the immune checkpoint PD-1, alone or in combination with anti-CTLA-4 blocking antibodies is, to date, the standard of care for advanced melanoma patients. Independently of BRAF mutation status, patients treated with the anti-PD-1 and anti-CTLA-4 combo achieve at five years a progression-free survival and an overall survival of 36% and 52%, respectively [198]. Unfortunately, half of the patients do not respond or develop early resistance to ICB

and exhibit severe immune-related adverse events (IRAE) [199]. Although treatment discontinuation due to adverse events seems not to affect the outcome for patients treated with ICB combination therapy [198], IRAEs tend to be associated with a better outcome for patients treated with anti-PD1 monotherapy [200].

Targeted therapies and ICB have deeply changed therapeutic management of patients with metastatic melanoma but all these therapeutic approaches still need improvement. Understanding the mechanisms that underlie resistance to these treatments is of utmost importance to improve the outcome of melanoma patients.

Here, we review some studies, which identified alterations in the SL metabolism as a cause of melanoma resistance to treatment (Table 2) and other studies using SL-related molecules as monotherapy or combined therapy to fight melanoma (Table 3).

Table 2. SL-metabolising enzymes regulate the response of melanoma to therapy.

| Targeted SL-Metabolising Enzyme | Melanoma Cells | Experimental Strategy | Treatment | Effects on Drug Sensitivity | Refs |
|---------------------------------|---|--|---|---|-------|
| A-SMase | B16-W6_pSIL10 | shRNA | Cisplatin (chemotherapy) | Low A-SMase is associated with reduced mTOR-related autophagy and resistance to cisplatin | [201] |
| AC | A375 | AC overexpression | Dacarbazine (chemotherapy) | AC overexpression confers resistance to dacarbazine | [66] |
| AC | G361 A375 | ARN14988 ARN398 (AC inhibitor) | 5-FU (chemotherapy) | AC inhibition sensitises G361 cells (proliferative phenotype) but not A375 cells (invasive phenotype) to chemotherapeutic drugs | [18] |
| SphK1 | SK-Mel-28 A375 | FTY720 | Cisplatin (chemotherapy) | SK1 inhibition increases cisplatin-induced apoptosis through a downregulation of the PI3K/AKT/mTOR pathway and decreases EGFR expression | [202] |
| SphK1 | UACC 903 | siRNA | Staurosporine (Apoptosis inducing agent) | Downregulation of Sphk1 sensitises cells to staurosporine-induced apoptosis through AKT inhibition, and G0/G1 phase cell cycle arrest | [20] |
| SphK1 | A375 (overexpression) Mel-2a (downregulation) | SphK1 overexpression or downregulation | Doxorubicin (chemotherapy) | Sphk1 overexpression induces resistance to doxorubicin-induced apoptosis whereas its downregulation by siRNA increases melanoma cell sensitivity to the treatment | [203] |
| SphK1 | WM115 SK-Mel-28 | FTY720 | Vemurafenib (BRAF inhibitor) | SK1 inhibition increases vemurafenib-induced apoptosis | [204] |
| SphK1 | WM9 | SKI-I | Vemurafenib (BRAF inhibitor) | Sphk1 inhibition blocks BRAFi-resistant melanoma cell growth by reducing MITF and Bcl-2 expression | [64] |
| SphK1 | B16-F10 | PF-543 | ICB Adoptive transfer of melanoma antigen-specific T cells | Sphk1 inhibition in T cells maintains Tcm phenotype, reduces Treg induction and synergises with anti-PD1 treatment | [164] |

Table 2. Cont.

| Targeted SL-Metabolising Enzyme | Melanoma Cells | Experimental Strategy | Treatment | Effects on Drug Sensitivity | Refs |
|---------------------------------|----------------|-----------------------|--------------------------------------|--|-------|
| SphK1 | Yumm 1.7 | shRNA | ICB | SphK1 downregulation enhances ICB therapy efficacy by reducing Treg infiltration | [22] |
| GCS | B16 | PDMP | Genistein (Apoptosis inducing agent) | Ceramide accumulation enhances genistein-induced apoptosis and growth inhibition through JNK activation and AKT inhibition | [205] |

Table 3. SL-related molecules used therapy in melanoma.

| SL-Related Treatment | Models | Associated Drug | Effects | Refs |
|--|---|---------------------------|--|-------|
| Nanoliposomal ceramide | UACC 903 cells 1205 Lu cells Xenografts in nude mice | Sorafenib | Inhibition of melanoma cell growth by targeting both PI3K and MAPK signalling | [206] |
| Nanoliposomal ceramide | 1205 Lu cells In vitro experiments | None | Reduction of integrin affinity and inhibition of melanoma cell migration through PI3K and PKC ζ tumour-suppressive activities | [207] |
| KRN7000 | B16 melanoma cell graft intravenously injected in mice | None | Increase of lifespan of mice | [208] |
| OGT2378 (GCS inhibitor) | B16 derived MEB4 melanoma cell graft in female C57BL/6 mice | None | Inhibition of tumour growth and reduction of established tumours | [69] |
| Intra-muscular GM3/VSSP vaccine | Phase I clinical trial: 26 patients with advanced (stage III and IV) melanoma | Adjuvant Montanide Isa 51 | GM3/VSSP vaccine induces anti-GM3 IgM response in 44% of patients. Serum reactivity against melanoma cells and tumour biopsies is reported | [209] |
| L612-HuMAb (Human monoclonal antibody that binds to GM3) | Phase I clinical trial: 9 patients with advanced (stage IV) melanoma | None | L612 HuMAb induces significant antitumour activity in melanoma patients | [210] |

7. Conclusions

As developed in this review, changes in SL metabolism that contribute to melanomagenesis, tumour progression and therapeutic resistance are multiple (Figure 4).

The action of sphingolipids (via the enzymes that control their metabolism, and transporters) is likely mediated by modifications in key regulatory processes including the phenotypic switch and EV-mediated cell-cell communication. Interestingly, these metabolic alterations could be envisioned as potential biomarkers and be exploited to better characterise tumour progression in melanoma patients. As a matter of fact, we identified that a reduced expression of SMS1 was significantly associated with a worse prognosis in metastatic melanoma [29]. AC was also identified as a potential biomarker for the prognosis of melanoma [211]. Moreover, we recently demonstrated that human invasive melanoma cells had lower AC levels and activity than proliferative melanoma cells [19]. In accordance, high AC expression was observed in node-negative stage II melanomas [18].

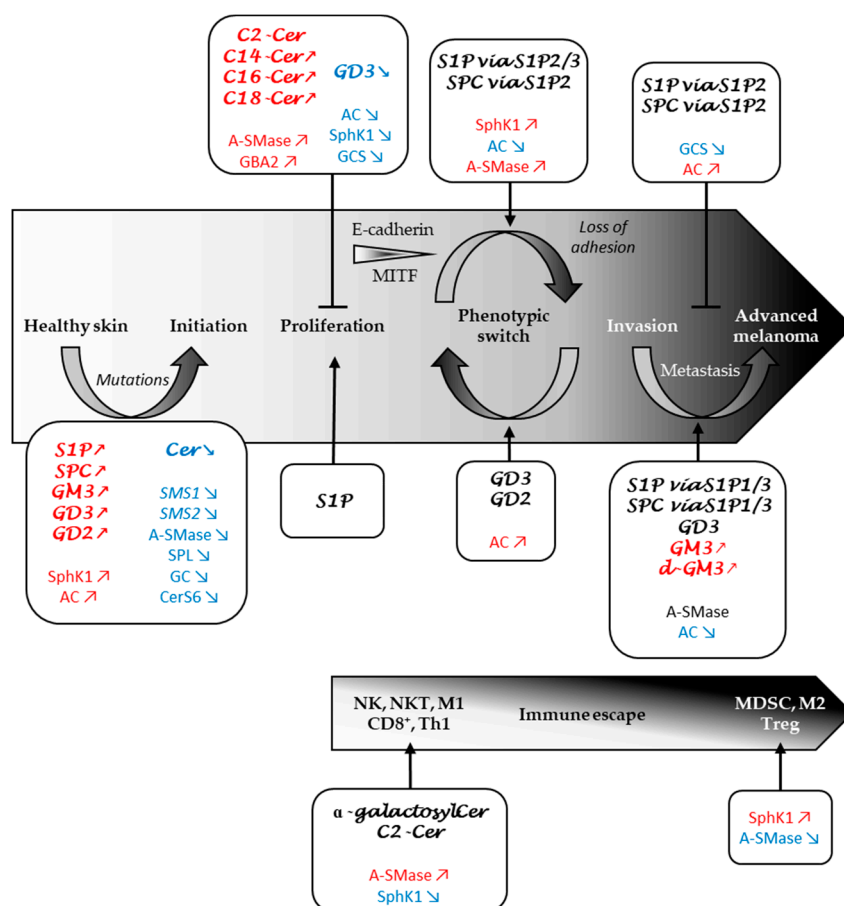


Figure 4. Role of sphingolipid metabolism in melanoma progression and immune response. SL metabolites and SL-metabolising enzymes whose levels and expression are increased, decreased or implicated are marked in red, blue or black, respectively. AC, acid ceramidase; CD8⁺, CD8⁺ T cells; Cer, ceramide; CerS, ceramide synthase; GC, glucosylceramidase; GCS, glucosylceramide synthase; M1, M1 macrophages; M2, M2 macrophages; MDSC, myeloid-derived suppressor cells; NK, natural killer cells; NKT, natural killer T cells; S1P, sphingosine 1-phosphate; S1P1/2/3, S1P receptor type 1/2/3; SMases, sphingomyelinases; SMS, sphingomyelin synthase; SPC, sphingosylphosphorylcholine; SphK, sphingosine kinase; SPL, S1P lyase; Th1, Th1 CD4⁺ T cells; Treg, regulatory T cells.

It is also interesting to note that a strong association between increased serum levels of gangliosides and high Breslow index or high Clark level as well as the presence of ulceration has been reported in melanoma patients, suggesting that circulating gangliosides may serve as potential markers for melanoma staging [212].

Monitoring the expression of SL-metabolising enzymes as well as SL levels could also be used to track the response to therapy in melanoma. Indeed, we previously showed that AC expression was associated to the response of melanoma cells to dacarbazine. Whereas overexpression of AC conferred resistance to dacarbazine, AC downregulation sensitised tumour cells to the drug [66]. DTIC triggered AC degradation and this effect was accompanied with an increased ceramide/S1P ratio. Our recent results also reveal that a distinct SL profile, i.e., a tendency for increased very long-chain ceramide species, was observed in the plasma of patients with melanoma who achieve a response to a BRAF-targeted therapy as compared with patients with progressive disease [64]. Finally, we recently discovered that melanoma patients with low SphK1 expression had significantly longer progression-free survival and overall survival than those with high SphK1 expression and patients with high SphK1 expression mostly failed to respond to anti-PD-1 therapy. These findings support the

hypothesis that SphK1 expression represents a potential biomarker to predict tumour progression and resistance to anti-PD-1 in metastatic melanoma patients [22].

It would now be of great interest to evaluate the possible association between these SL metabolic alterations and the mutation status of oncogenes such as BRAF or NRAS as well as immune responses in metastatic melanoma patients. This will be performed in patients treated with anti-PD-1 in combination or not with anti-CTLA-4 in a prospective clinical trial (IMMUSPHINX: NCT03627026) we are currently conducting in our institute.

Funding: This research was funded by INSERM, Paul Sabatier University, Fondation Association pour la Recherche sur le Cancer [B. Ségué (R19179BB) and N. Andrieu-Abadie (R18167BB)], Société Française de Dermatologie [N. Andrieu-Abadie (R18126BB)], Fondation Toulouse Cancer Santé [B. Ségué (R19225BB)] and Institut National du Cancer [N. Andrieu-Abadie (R19243BP)]. The work also received funding from the Transcan-2 Research Program, which is a transnational R&D program jointly funded by national funding organisations within the framework of the ERA-NET Transcan-2 [N. Andrieu-Abadie (TRANS201601250)]. The APC was funded by Fondation Association pour la Recherche sur le Cancer [N. Andrieu-Abadie (R18167BB)]. L.C. is a recipient of a fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale.

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

References

1. Gershenwald, J.E.; Guy, G.P. Stemming the Rising Incidence of Melanoma: Calling Prevention to Action. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2016**, *108*. [\[CrossRef\]](#)
2. Zhu, Z.; Liu, W.; Gotlieb, V. The rapidly evolving therapies for advanced melanoma—Towards immunotherapy, molecular targeted therapy, and beyond. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, *99*, 91–99. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Crowson, A.N.; Magro, C.M.; Mihm, M.C. Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. *Mod. Pathol.* **2006**, *19*, S71–S87. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Shain, A.H.; Bastian, B.C. From melanocytes to melanomas. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 345–358. [\[CrossRef\]](#)
5. Chang, A.E.; Karnell, L.H.; Menck, H.R. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: A summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer* **1998**, *83*, 1664–1678. [\[CrossRef\]](#)
6. Herlyn, M.; Thurin, J.; Balaban, G.; Bencicelli, J.L.; Bondi, E.; Guerry, D.; Nowell, P.; Clark, W.H.; Koprowski, H. Characteristics of Cultured Human Melanocytes Isolated from Different Stages of Tumor Progression. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 8.
7. Liu, J.; Fukunaga-Kalabis, M.; Li, L.; Herlyn, M. Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *563*, 13–21. [\[CrossRef\]](#)
8. Hsu, M.-Y.; Meier, F.; Herlyn, M. Melanoma development and progression: A conspiracy between tumor and host. *Differentiation* **2002**, *70*, 522–536. [\[CrossRef\]](#)
9. Davies, H.; Bignell, G.R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M.J.; Bottomley, W.; et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **2002**, *417*, 949–954. [\[CrossRef\]](#)
10. Akbani, R.; Akdemir, K.C.; Aksoy, B.A.; Albert, M.; Ally, A.; Amin, S.B.; Arachchi, H.; Arora, A.; Auman, J.T.; Ayala, B.; et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* **2015**, *161*, 1681–1696. [\[CrossRef\]](#)
11. Hodis, E.; Watson, I.R.; Kryukov, G.V.; Arold, S.T.; Imielinski, M.; Theurillat, J.-P.; Nickerson, E.; Auclair, D.; Li, L.; Place, C.; et al. A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. *Cell* **2012**, *150*, 251–263. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Lian, C.G.; Murphy, G. The Genetic Evolution of Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 993–996. [\[CrossRef\]](#)
13. Abildgaard, C.; Guldberg, P. Molecular drivers of cellular metabolic reprogramming in melanoma. *Trends Mol. Med.* **2015**, *21*, 164–171. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Liu, R.; Cao, K.; Tang, Y.; Liu, J.; Li, J.; Chen, J.; Wang, S.; Chen, Z.; Zhou, J. C16:0 ceramide effect on melanoma malignant behavior and glycolysis depends on its intracellular or exogenous location. *Am. J. Transl. Res.* **2020**, *12*, 1123–1135. [\[PubMed\]](#)
15. Borodziejcz, S.; Rudnicka, L.; Mirowska-Guzel, D.; Cudnoch-Jedrzejewska, A. The role of epidermal sphingolipids in dermatologic diseases. *Lipids Health Dis.* **2016**, *15*, 13. [\[CrossRef\]](#)

16. Garandeu, D.; Mrad, M.; Levade, T.; Perrotta, C.; Andrieu-Abadie, N.; Diab-Assaf, M. Dysregulation of Sphingolipid Metabolism in Melanoma: Roles in Pigmentation, Cell Survival and Tumor Progression. In *Bioactive Sphingolipids in Cancer Biology and Therapy*; Hannun, Y.A., Luberto, C., Mao, C., Obeid, L.M., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 123–139. ISBN 978-3-319-20749-0.
17. Tang, Y.; Cao, K.; Wang, Q.; Chen, J.; Liu, R.; Wang, S.; Zhou, J.; Xie, H. Silencing of CerS6 increases the invasion and glycolysis of melanoma WM35, WM451 and SK28 cell lines via increased GLUT1-induced downregulation of WNT5A. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 2907–2915. [[CrossRef](#)]
18. Realini, N.; Palese, F.; Pizzirani, D.; Pontis, S.; Basit, A.; Bach, A.; Ganesan, A.; Piomelli, D. Acid Ceramidase in Melanoma: EXPRESSION, LOCALIZATION, AND EFFECTS OF PHARMACOLOGICAL INHIBITION. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 2422–2434. [[CrossRef](#)]
19. Leclerc, J.; Garandeu, D.; Pandiani, C.; Gaudel, C.; Bille, K.; Nottet, N.; Garcia, V.; Colosetti, P.; Pagnotta, S.; Bahadoran, P.; et al. Lysosomal acid ceramidase ASAH1 controls the transition between invasive and proliferative phenotype in melanoma cells. *Oncogene* **2019**, *38*, 1282–1295. [[CrossRef](#)]
20. Madhunapantula, S.V.; Hengst, J.; Gowda, R.; Fox, T.E.; Yun, J.K.; Robertson, G.P. Targeting sphingosine kinase-1 to inhibit melanoma: Targeting SPHK1 in melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2012**, *25*, 259–274. [[CrossRef](#)]
21. Albinet, V.; Bats, M.-L.; Huwiler, A.; Rochaix, P.; Chevreau, C.; Ségui, B.; Levade, T.; Andrieu-Abadie, N. Dual role of sphingosine kinase-1 in promoting the differentiation of dermal fibroblasts and the dissemination of melanoma cells. *Oncogene* **2014**, *33*, 3364–3373. [[CrossRef](#)]
22. Imbert, C.; Montfort, A.; Fraisse, M.; Marcheteau, E.; Gilhodes, J.; Martin, E.; Bertrand, F.; Marcellin, M.; Burlet-Schiltz, O.; Peredo, A.G.d.; et al. Resistance of melanoma to immune checkpoint inhibitors is overcome by targeting the sphingosine kinase-1. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Colie, S.; Van Veldhoven, P.P.; Kedjouar, B.; Bedia, C.; Albinet, V.; Sorli, S.-C.; Garcia, V.; Djavaheri-Mergny, M.; Bauvy, C.; Codogno, P.; et al. Disruption of Sphingosine 1-Phosphate Lyase Confers Resistance to Chemotherapy and Promotes Oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL Upregulation. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 9346–9353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Portoukalian, J.; Zwingelstein, G.; Doré, J.F. Lipid composition of human malignant melanoma tumors at various levels of malignant growth. *Eur. J. Biochem.* **1979**, *94*, 19–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Loganzo, F.; Dosik, J.S.; Zhao, Y.; Vidal, M.J.; Nanus, D.M.; Sudol, M.; Albino, A.P. Elevated expression of protein tyrosine kinase c-Yes, but not c-Src, in human malignant melanoma. *Oncogene* **1993**, *8*, 2637–2644. [[PubMed](#)]
26. Hamamura, K.; Tsuji, M.; Hotta, H.; Ohkawa, Y.; Takahashi, M.; Shibuya, H.; Nakashima, H.; Yamauchi, Y.; Hashimoto, N.; Hattori, H.; et al. Functional Activation of Src Family Kinase Yes Protein Is Essential for the Enhanced Malignant Properties of Human Melanoma Cells Expressing Ganglioside GD3. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 18526–18537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Huitema, K.; van den Dikkenberg, J.; Brouwers, J.F.H.M.; Holthuis, J.C.M. Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.* **2004**, *23*, 33–44. [[CrossRef](#)]
28. Yamaoka, S.; Miyaji, M.; Kitano, T.; Umehara, H.; Okazaki, T. Expression Cloning of a Human cDNA Restoring Sphingomyelin Synthesis and Cell Growth in Sphingomyelin Synthase-defective Lymphoid Cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 18688–18693. [[CrossRef](#)]
29. Bilal, F.; Montfort, A.; Gilhodes, J.; Garcia, V.; Riond, J.; Carpentier, S.; Filleron, T.; Colacios, C.; Levade, T.; Daher, A.; et al. Sphingomyelin Synthase 1 (SMS1) Downregulation Is Associated With Sphingolipid Reprogramming and a Worse Prognosis in Melanoma. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 443. [[CrossRef](#)]
30. Higuchi, K.; Kawashima, M.; Ichikawa, Y.; Imokawa, G. Sphingosylphosphorylcholine is a Melanogenic Stimulator for Human Melanocytes. *Pigment Cell Res.* **2003**, *16*, 670–678. [[CrossRef](#)]
31. Kim, D.-S.; Park, S.-H.; Kwon, S.-B.; Park, E.-S.; Huh, C.-H.; Youn, S.-W.; Park, K.-C. Sphingosylphosphorylcholine-induced ERK activation inhibits melanin synthesis in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **2006**, *19*, 146–153. [[CrossRef](#)]
32. Jeong, H.-S.; Lee, S.H.; Yun, H.-Y.; Baek, K.J.; Kwon, N.S.; Park, K.-C.; Kim, D.-S. Involvement of mTOR signaling in sphingosylphosphorylcholine-induced hypopigmentation effects. *J. Biomed. Sci.* **2011**, *18*, 55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Jeong, H.-S.; Park, K.-C.; Kim, D.-S. PP2A and DUSP6 are involved in sphingosylphosphorylcholine-induced hypopigmentation. *Mol. Cell. Biochem.* **2012**, *367*, 43–49. [[CrossRef](#)]

34. Bizzozero, L.; Cazzato, D.; Cervia, D.; Assi, E.; Simbari, F.; Pagni, F.; De Palma, C.; Monno, A.; Verdelli, C.; Querini, P.R.; et al. Acid sphingomyelinase determines melanoma progression and metastatic behaviour via the microphthalmia-associated transcription factor signalling pathway. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 507–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kim, D.-S.; Kim, S.-Y.; Chung, J.-H.; Kim, K.-H.; Eun, H.-C.; Park, K.-C. Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cell. Signal.* **2002**, *14*, 779–785. [[CrossRef](#)]
36. Amos, C.I.; Wang, L.-E.; Lee, J.E.; Gershenwald, J.E.; Chen, W.V.; Fang, S.; Kosoy, R.; Zhang, M.; Qureshi, A.A.; Vattathil, S.; et al. Genome-wide association study identifies novel loci predisposing to cutaneous melanoma. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 5012–5023. [[CrossRef](#)]
37. Astudillo, L.; Therville, N.; Colacios, C.; Ségui, B.; Andrieu-Abadie, N.; Levade, T. Glucosylceramidases and malignancies in mammals. *Biochimie* **2016**, *125*, 267–280. [[CrossRef](#)]
38. Dubot, P.; Astudillo, L.; Therville, N.; Sabourdy, F.; Stirnemann, J.; Levade, T.; Andrieu-Abadie, N. Are Glucosylceramide-Related Sphingolipids Involved in the Increased Risk for Cancer in Gaucher Disease Patients? Review and Hypotheses. *Cancers* **2020**, *12*, 475. [[CrossRef](#)]
39. Ferraz, M.J.; Marques, A.R.A.; Appelman, M.D.; Verhoek, M.; Strijland, A.; Mirzaian, M.; Scheij, S.; Ouairy, C.M.; Lahav, D.; Wisse, P.; et al. Lysosomal glycosphingolipid catabolism by acid ceramidase: Formation of glycosphingoid bases during deficiency of glycosidases. *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 716–725. [[CrossRef](#)]
40. Flanagan, J.; Ranes, B.; Brignol, N.; Hamler, R.; Clark, S. The origins of glucosylsphingosine in Gaucher disease. *Mol. Genet. Metab.* **2013**, *108*, S40–S41. [[CrossRef](#)]
41. Lai, M.; La Rocca, V.; Amato, R.; Freer, G.; Pistello, M. Sphingolipid/Ceramide Pathways and Autophagy in the Onset and Progression of Melanoma: Novel Therapeutic Targets and Opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3436. [[CrossRef](#)]
42. Jiang, W.; Ogretmen, B. Autophagy paradox and ceramide. *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841*, 783–792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sun, Y.; Liou, B.; Ran, H.; Skelton, M.R.; Williams, M.T.; Vorhees, C.V.; Kitatani, K.; Hannun, Y.A.; Witte, D.P.; Xu, Y.-H.; et al. Neuronopathic Gaucher disease in the mouse: Viable combined selective saposin C deficiency and mutant glucocerebrosidase (V394L) mice with glucosylsphingosine and glucosylceramide accumulation and progressive neurological deficits. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 1088–1097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kinghorn, K.J.; Grönke, S.; Castillo-Quan, J.I.; Woodling, N.S.; Li, L.; Sirka, E.; Gegg, M.; Mills, K.; Hardy, J.; Bjedov, I.; et al. A Drosophila Model of Neuronopathic Gaucher Disease Demonstrates Lysosomal-Autophagic Defects and Altered mTOR Signalling and Is Functionally Rescued by Rapamycin. *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 11654–11670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Panicker, L.M.; Miller, D.; Park, T.S.; Patel, B.; Azevedo, J.L.; Awad, O.; Masood, M.A.; Veenstra, T.D.; Goldin, E.; Stubblefield, B.K.; et al. Induced pluripotent stem cell model recapitulates pathologic hallmarks of Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 18054–18059. [[CrossRef](#)]
46. Brown, R.A.; Voit, A.; Srikanth, M.P.; Thayer, J.A.; Kingsbury, T.J.; Jacobson, M.A.; Lipinski, M.M.; Feldman, R.A.; Awad, O. mTOR hyperactivity mediates lysosomal dysfunction in Gaucher’s disease iPSC-neuronal cells. *Dis. Model. Mech.* **2019**, *12*, dmm038596. [[CrossRef](#)]
47. Pópulo, H.; Soares, P.; Faustino, A.; Rocha, A.S.; Silva, P.; Azevedo, F.; Lopes, J.M. mTOR pathway activation in cutaneous melanoma is associated with poorer prognosis characteristics: Letter to the Editor. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2011**, *24*, 254–257. [[CrossRef](#)]
48. Li, S.; Song, Y.; Quach, C.; Guo, H.; Jang, G.-B.; Maazi, H.; Zhao, S.; Sands, N.A.; Liu, Q.; In, G.K.; et al. Transcriptional regulation of autophagy-lysosomal function in BRAF-driven melanoma progression and chemoresistance. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1693. [[CrossRef](#)]
49. Dhillon, A.S.; Hagan, S.; Rath, O.; Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **2007**, *26*, 3279–3290. [[CrossRef](#)]
50. Smalley, K.S.M. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int. J. Cancer* **2003**, *104*, 527–532. [[CrossRef](#)]
51. Gorden, A.; Osman, I.; Gai, W.; He, D.; Huang, W.; Davidson, A.; Houghton, A.N.; Busam, K.; Polsky, D. Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3955–3957.
52. Wellbrock, C.; Karasarides, M.; Marais, R. The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 875–885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Curtin, J.A.; Patel, H.N.; Cho, K.-H.; LeBoit, P.E. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Chapman, P.B.; Hauschild, A.; Robert, C.; Haanen, J.B.; Ascierto, P.; Larkin, J.; Dummer, R.; Garbe, C.; Testori, A.; Maio, M.; et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 2507–2516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hauschild, A.; Grob, J.-J.; Demidov, L.V.; Jouary, T.; Gutzmer, R.; Millward, M.; Rutkowski, P.; Blank, C.U.; Miller, W.H.; Kaempgen, E.; et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: A multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* **2012**, *380*, 358–365. [[CrossRef](#)]
56. Larkin, J.; Ascierto, P.A.; Dréno, B.; Atkinson, V.; Liskay, G.; Maio, M.; Mandalà, M.; Demidov, L.; Stryakovsky, D.; Thomas, L.; et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 1867–1876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Ribas, A.; Daud, A.; Pavlick, A.C.; Gonzalez, R.; Lewis, K.D.; Hamid, O.; Gajewski, T.F.; Puzanov, I.; Wongchenko, M.; Rooney, I.; et al. Extended 5-Year Follow-up Results of a Phase Ib Study (BRIM7) of Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF -Mutant Melanoma. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 46–53. [[CrossRef](#)]
58. Patel, H.; Yacoub, N.; Mishra, R.; White, A.; Yuan, L.; Alanazi, S.; Garrett, J.T. Current Advances in the Treatment of BRAF-Mutant Melanoma. *Cancers* **2020**, *12*, 482. [[CrossRef](#)]
59. Pitson, S.M.; Xia, P.; Leclercq, T.M.; Moretti, P.A.B.; Zebol, J.R.; Lynn, H.E.; Wattenberg, B.W.; Vadas, M.A. Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *J. Exp. Med.* **2005**, *201*, 49–54. [[CrossRef](#)]
60. Leclercq, T.; Pitson, S. Cellular signalling by sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate. *IUBMB Life Int. Union Biochem. Mol. Biol. Life* **2006**, *58*, 467–472. [[CrossRef](#)]
61. Francy, J.M.; Nag, A.; Conroy, E.J.; Hengst, J.A.; Yun, J.K. Sphingosine kinase 1 expression is regulated by signaling through PI3K, AKT2, and mTOR in human coronary artery smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA Gene Struct. Expr.* **2007**, *1769*, 253–265. [[CrossRef](#)]
62. Mrad, M.; Imbert, C.; Garcia, V.; Rambow, F.; Therville, N.; Carpentier, S.; Ségui, B.; Levade, T.; Azar, R.; Marine, J.-C.; et al. Downregulation of sphingosine kinase-1 induces protective tumor immunity by promoting M1 macrophage response in melanoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 71873–71886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Pyne, N.J.; Pyne, S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 489–503. [[CrossRef](#)]
64. Garandeau, D.; Noujarède, J.; Leclerc, J.; Imbert, C.; Garcia, V.; Bats, M.-L.; Rambow, F.; Gilhodes, J.; Filleron, T.; Meyer, N.; et al. Targeting the Sphingosine 1-Phosphate Axis Exerts Potent Antitumor Activity in BRAFi-Resistant Melanomas. *Mol. Cancer Ther.* **2019**, *18*, 289–300. [[CrossRef](#)]
65. Lai, M.; Realini, N.; La Ferla, M.; Passalacqua, I.; Matteoli, G.; Ganesan, A.; Pistello, M.; Mazzanti, C.M.; Piomelli, D. Complete Acid Ceramidase ablation prevents cancer-initiating cell formation in melanoma cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7411. [[CrossRef](#)]
66. Bedia, C.; Casas, J.; Andrieu-Abadie, N.; Fabriàs, G.; Levade, T. Acid Ceramidase Expression Modulates the Sensitivity of A375 Melanoma Cells to Dacarbazine. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 28200–28209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Han, W.S.; Yoo, J.Y.; Youn, S.W.; Kim, D.S.; Park, C.; Kim, S.Y.; Kim, K.H. Effects of C2-ceramide on the Malme-3M melanoma cell line. *J. Dermatol. Sci.* **2002**, *10*. [[CrossRef](#)]
68. Deng, W.; Li, R.; Guerrero, M.; Liu, Y.; Ladisch, S. Transfection of glucosylceramide synthase antisense inhibits mouse melanoma formation. *Glycobiology* **2002**, *12*, 145–152. [[CrossRef](#)]
69. Weiss, M.; Hettmer, S.; Smith, P.; Ladisch, S. Inhibition of melanoma tumor growth by a novel inhibitor of glucosylceramide synthase. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3654–3658. [[PubMed](#)]
70. Sorli, S.; Colié, S.; Albinet, V.; Dubrac, A.; Touriol, C.; Guilbaud, N.; Bedia, C.; Fabriàs, G.; Casas, J.; Ségui, B.; et al. The nonlysosomal β -glucosidase GBA2 promotes endoplasmic reticulum stress and impairs tumorigenicity of human melanoma cells. *FASEB J.* **2013**, *27*, 489–498. [[CrossRef](#)]
71. Nakano, J.; Raj, B.K.; Asagami, C.; Lloyd, K.O. Human melanoma cell lines deficient in GD3 ganglioside expression exhibit altered growth and tumorigenic characteristics. *J. Invest. Dermatol.* **1996**, *107*, 543–548. [[CrossRef](#)]
72. Hamamura, K.; Furukawa, K.; Hayashi, T.; Hattori, T.; Nakano, J.; Nakashima, H.; Okuda, T.; Mizutani, H.; Hattori, H.; Ueda, M.; et al. Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 11041–11046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

73. Furukawa, K.; Kambe, M.; Miyata, M.; Ohkawa, Y.; Tajima, O.; Furukawa, K. Ganglioside GD3 induces convergence and synergism of adhesion and hepatocyte growth factor/Met signals in melanomas. *Cancer Sci.* **2014**, *105*, 52–63. [[CrossRef](#)]
74. Li, G.; Satyamoorthy, K.; Herlyn, M. Dynamics of Cell Interactions and Communications during Melanoma Development. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **2002**, *13*, 62–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Walko, G.; Castañón, M.J.; Wiche, G. Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell Tissue Res.* **2015**, *360*, 529–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Haass, N.K.; Smalley, K.S.M.; Herlyn, M. The Role of Altered Cell–Cell Communication in Melanoma Progression. *J. Mol. Histol.* **2003**, *35*, 309–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Haass, N.K.; Smalley, K.S.M.; Li, L.; Herlyn, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* **2005**, *18*, 150–159. [[CrossRef](#)]
78. Hsu, M.-Y.; Meier, F.E.; Nesbit, M.; Hsu, J.-Y.; Van Belle, P.; Elder, D.E.; Herlyn, M. E-Cadherin Expression in Melanoma Cells Restores Keratinocyte-Mediated Growth Control and Down-Regulates Expression of Invasion-Related Adhesion Receptors. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 1515–1525. [[CrossRef](#)]
79. Tamashiro, P.M.; Furuya, H.; Shimizu, Y.; Kawamori, T. Sphingosine kinase 1 mediates head & neck squamous cell carcinoma invasion through sphingosine 1-phosphate receptor 1. *Cancer Cell Int.* **2014**, *14*, 76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Liu, H.; Ma, Y.; He, H.-W.; Zhao, W.-L.; Shao, R.-G. SPHK1 (sphingosine kinase 1) induces epithelial-mesenchymal transition by promoting the autophagy-linked lysosomal degradation of CDH1/E-cadherin in hepatoma cells. *Autophagy* **2017**, *13*, 900–913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Milara, J.; Navarro, R.; Juan, G.; Peiró, T.; Serrano, A.; Ramón, M.; Morcillo, E.; Cortijo, J. Sphingosine-1-phosphate is increased in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates epithelial to mesenchymal transition. *Thorax* **2012**, *67*, 147–156. [[CrossRef](#)]
82. Kono, Y.; Nishiuma, T.; Nishimura, Y.; Kotani, Y.; Okada, T.; Nakamura, S.; Yokoyama, M. Sphingosine Kinase 1 Regulates Differentiation of Human and Mouse Lung Fibroblasts Mediated by TGF- β 1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2007**, *37*, 395–404. [[CrossRef](#)]
83. Yamaguchi, H.; Kitayama, J.; Takuwa, N.; Arikawa, K.; Inoki, I.; Takehara, K.; Nagawa, H.; Takuwa, Y. Sphingosine-1-phosphate receptor subtype-specific positive and negative regulation of Rac and haematogenous metastasis of melanoma cells. *Biochem. J.* **2003**, *374*, 715–722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Braga, V.M.M.; Machesky, L.M.; Hall, A.; Hotchin, N.A. The Small GTPases Rho and Rac Are Required for the Establishment of Cadherin-dependent Cell–Cell Contacts. *J. Cell Biol.* **1997**, *137*, 1421–1431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Ohkawa, Y.; Miyazaki, S.; Hamamura, K.; Kambe, M.; Miyata, M.; Tajima, O.; Ohmi, Y.; Yamauchi, Y.; Furukawa, K.; Furukawa, K. Ganglioside GD3 Enhances Adhesion Signals and Augments Malignant Properties of Melanoma Cells by Recruiting Integrins to Glycolipid-enriched Microdomains. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 27213–27223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Ohmi, Y.; Kambe, M.; Ohkawa, Y.; Hamamura, K.; Tajima, O.; Takeuchi, R.; Furukawa, K.; Furukawa, K. Differential roles of gangliosides in malignant properties of melanomas. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0206881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Hodorogea, A.; Calinescu, A.; Antohe, M.; Balaban, M.; Nedelcu, R.I.; Turcu, G.; Ion, D.A.; Badarau, I.A.; Popescu, C.M.; Popescu, R.; et al. Epithelial-Mesenchymal Transition in Skin Cancers: A Review. *Anal. Cell. Pathol.* **2019**, *2019*, 1–11. [[CrossRef](#)]
88. Hoek, K.S.; Schlegel, N.C.; Brafford, P.; Sucker, A.; Ugurel, S.; Kumar, R.; Weber, B.L.; Nathanson, K.L.; Phillips, D.J.; Herlyn, M.; et al. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res.* **2006**, *19*, 290–302. [[CrossRef](#)]
89. Levy, C.; Khaled, M.; Fisher, D.E. MITF: Master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol. Med.* **2006**, *12*, 406–414. [[CrossRef](#)]
90. Goding, C.R.; Arnheiter, H. MITF—The first 25 years. *Genes Dev.* **2019**, *33*, 983–1007. [[CrossRef](#)]
91. Levy, C.; Lee, Y.-N.; Nechushtan, H.; Schueler-Furman, O.; Sonnenblick, A.; Hacohen, S.; Razin, E. Identifying a common molecular mechanism for inhibition of MITF and STAT3 by PIAS3. *Blood* **2006**, *107*, 2839–2845. [[CrossRef](#)]

92. Yasumoto, K.; Takeda, K.; Saito, H.; Watanabe, K.; Takahashi, K.; Shibahara, S. Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. *EMBO J.* **2002**, *21*, 2703–2714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Schmelz, E.M.; Roberts, P.C.; Kustin, E.M.; Lemonnier, L.A.; Sullards, M.C.; Dillehay, D.L.; Merrill, A.H. Modulation of intracellular beta-catenin localization and intestinal tumorigenesis in vivo and in vitro by sphingolipids. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6723–6729. [[PubMed](#)]
94. Liu, H.; Zhang, C.-X.; Ma, Y.; He, H.-W.; Wang, J.-P.; Shao, R.-G. SphK1 inhibitor SKI II inhibits the proliferation of human hepatoma HepG2 cells via the Wnt5A/ β -catenin signaling pathway. *Life Sci.* **2016**, *151*, 23–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. White, C.; Alshaker, H.; Cooper, C.; Winkler, M.; Pchejetski, D. The emerging role of FTY720 (Fingolimod) in cancer treatment. *Oncotarget* **2016**, *7*, 23106–23127. [[CrossRef](#)]
96. Lee, J.E.; Kim, S.Y.; Jeong, Y.-M.; Yun, H.-Y.; Baek, K.J.; Kwon, N.S.; Park, K.-C.; Kim, D.-S. The regulatory mechanism of melanogenesis by FTY720, a sphingolipid analogue: The regulation of melanogenesis by FTY720. *Exp. Dermatol.* **2011**, *20*, 237–241. [[CrossRef](#)]
97. Caramel, J.; Papadogeorgakis, E.; Hill, L.; Browne, G.J.; Richard, G.; Wierinckx, A.; Saldanha, G.; Osborne, J.; Hutchinson, P.; Tse, G.; et al. A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Cell* **2013**, *24*, 466–480. [[CrossRef](#)]
98. Lu, P.; White-Gilbertson, S.; Nganga, R.; Kester, M.; Voelkel-Johnson, C. Expression of the SNAI2 transcriptional repressor is regulated by C 16 -ceramide. *Cancer Biol. Ther.* **2019**, *20*, 922–930. [[CrossRef](#)]
99. Edmond, V.; Dufour, F.; Poiroux, G.; Shoji, K.; Malleter, M.; Fouqué, A.; Tauzin, S.; Rimokh, R.; Sergent, O.; Penna, A.; et al. Downregulation of ceramide synthase-6 during epithelial-to-mesenchymal transition reduces plasma membrane fluidity and cancer cell motility. *Oncogene* **2015**, *34*, 996–1005. [[CrossRef](#)]
100. Zheng, K.; Chen, Z.; Feng, H.; Chen, Y.; Zhang, C.; Yu, J.; Luo, Y.; Zhao, L.; Jiang, X.; Shi, F. Sphingomyelin synthase 2 promotes an aggressive breast cancer phenotype by disrupting the homeostasis of ceramide and sphingomyelin. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 157. [[CrossRef](#)]
101. Levade, T.; Andrieu-Abadie, N.; Micheau, O.; Legembre, P.; Ségui, B. Sphingolipids modulate the epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Cell Death Discov.* **2015**, *1*, 15001. [[CrossRef](#)]
102. Mathow, D.; Chessa, F.; Rabionet, M.; Kaden, S.; Jennemann, R.; Sandhoff, R.; Gröne, H.-J.; Feuerborn, A. Zeb1 affects epithelial cell adhesion by diverting glycosphingolipid metabolism. *EMBO Rep.* **2015**, *16*, 321–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Battula, V.L.; Shi, Y.; Evans, K.W.; Wang, R.-Y.; Spaeth, E.L.; Jacamo, R.O.; Guerra, R.; Sahin, A.A.; Marini, F.C.; Hortobagyi, G.; et al. Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 2066–2078. [[CrossRef](#)]
104. Gupta, V.; Bhinge, K.N.; Hosain, S.B.; Xiong, K.; Gu, X.; Shi, R.; Ho, M.-Y.; Khoo, K.-H.; Li, S.-C.; Li, Y.-T.; et al. Ceramide glycosylation by glucosylceramide synthase selectively maintains the properties of breast cancer stem cells. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 37195–37205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Hosain, S.B.; Khiste, S.K.; Uddin, M.B.; Vorubindi, V.; Ingram, C.; Zhang, S.; Hill, R.A.; Gu, X.; Liu, Y.-Y. Inhibition of glucosylceramide synthase eliminates the oncogenic function of p53 R273H mutant in the epithelial-mesenchymal transition and induced pluripotency of colon cancer cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 60575–60592. [[CrossRef](#)]
106. Hao, Y.; Baker, D.; ten Dijke, P. TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Tsubakihara, Y.; Moustakas, A. Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis under the Control of Transforming Growth Factor β . *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Xin, C.; Ren, S.; Kleuser, B.; Shabahang, S.; Eberhardt, W.; Radeke, H.; Schäfer-Korting, M.; Pfeilschifter, J.; Huwiler, A. Sphingosine 1-Phosphate Cross-activates the Smad Signaling Cascade and Mimics Transforming Growth Factor- β -induced Cell Responses. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 35255–35262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Sauer, B.; Vogler, R.; von Wenckstern, H.; Fujii, M.; Anzano, M.B.; Glick, A.B.; Schäfer-Korting, M.; Roberts, A.B.; Kleuser, B. Involvement of Smad Signaling in Sphingosine 1-Phosphate-mediated Biological Responses of Keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 38471–38479. [[CrossRef](#)]
110. Radeke, H.H.; von Wenckstern, H.; Stoidtner, K.; Sauer, B.; Hammer, S.; Kleuser, B. Overlapping Signaling Pathways of Sphingosine 1-Phosphate and TGF- β in the Murine Langerhans Cell Line XS52. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 2778–2786. [[CrossRef](#)]

111. Zeng, Y.; Yao, X.; Chen, L.; Yan, Z.; Liu, J.; Zhang, Y.; Feng, T.; Wu, J.; Liu, X. Sphingosine-1-phosphate induced epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma via an MMP-7/syndecan-1/TGF- β autocrine loop. *Oncotarget* **2016**, *7*, 63324–63337. [[CrossRef](#)]
112. Liu, Y.-N.; Zhang, H.; Zhang, L.; Cai, T.-T.; Huang, D.-J.; He, J.; Ni, H.-H.; Zhou, F.-J.; Zhang, X.-S.; Li, J. Sphingosine 1 phosphate receptor-1 (S1P1) promotes tumor-associated regulatory T cell expansion: Leading to poor survival in bladder cancer. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 50. [[CrossRef](#)]
113. Miller, A.V.; Alvarez, S.E.; Spiegel, S.; Lebman, D.A. Sphingosine Kinases and Sphingosine-1-Phosphate Are Critical for Transforming Growth Factor β -Induced Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 Activation and Promotion of Migration and Invasion of Esophageal Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 4142–4151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Yamanaka, M.; Shegogue, D.; Pei, H.; Bu, S.; Bielawska, A.; Bielawski, J.; Pettus, B.; Hannun, Y.A.; Obeid, L.; Trojanowska, M. Sphingosine Kinase 1 (SPHK1) Is Induced by Transforming Growth Factor- β and Mediates TIMP-1 Up-regulation. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 53994–54001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Verfaillie, A.; Imrichova, H.; Atak, Z.K.; Dewaele, M.; Rambow, F.; Hulselmans, G.; Christiaens, V.; Svetlichnyy, D.; Luciani, F.; Van den Mooter, L.; et al. Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Nallet-Staub, F.; Marsaud, V.; Li, L.; Gilbert, C.; Dodier, S.; Bataille, V.; Sudol, M.; Herlyn, M.; Mauviel, A. Pro-invasive activity of the Hippo pathway effectors YAP and TAZ in cutaneous melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134*, 123–132. [[CrossRef](#)]
117. Miller, E.; Yang, J.; DeRan, M.; Wu, C.; Su, A.I.; Bonamy, G.M.C.; Liu, J.; Peters, E.C.; Wu, X. Identification of Serum-Derived Sphingosine-1-Phosphate as a Small Molecule Regulator of YAP. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 955–962. [[CrossRef](#)]
118. Yu, F.-X.; Zhao, B.; Panupinthu, N.; Jewell, J.L.; Lian, I.; Wang, L.H.; Zhao, J.; Yuan, H.; Tumaneng, K.; Li, H.; et al. Regulation of the Hippo-YAP Pathway by G-Protein-Coupled Receptor Signaling. *Cell* **2012**, *150*, 780–791. [[CrossRef](#)]
119. Pors, S.E.; Harðardóttir, L.; Olesen, H.Ø.; Riis, M.L.; Jensen, L.B.; Andersen, A.S.; Cadenas, J.; Grønning, A.P.; Colmorn, L.B.; Dueholm, M.; et al. Effect of sphingosine-1-phosphate on activation of dormant follicles in murine and human ovarian tissue. *Mol. Hum. Reprod.* **2020**, gaaa022. [[CrossRef](#)]
120. Huang, L.S.; Sudhadevi, T.; Fu, P.; Punathil-Kannan, P.-K.; Ebenezer, D.L.; Ramchandran, R.; Putherickal, V.; Cheres, P.; Zhou, G.; Ha, A.W.; et al. Sphingosine Kinase 1/S1P Signaling Contributes to Pulmonary Fibrosis by Activating Hippo/YAP Pathway and Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Lung Fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2064. [[CrossRef](#)]
121. Kempainen, K.; Wentus, N.; Lassila, T.; Laiho, A.; Törnquist, K. Sphingosylphosphorylcholine regulates the Hippo signaling pathway in a dual manner. *Cell. Signal.* **2016**, *28*, 1894–1903. [[CrossRef](#)]
122. Arikawa, K.; Takuwa, N.; Yamaguchi, H.; Sugimoto, N.; Kitayama, J.; Nagawa, H.; Takehara, K.; Takuwa, Y. Ligand-dependent Inhibition of B16 Melanoma Cell Migration and Invasion via Endogenous S1P 2 G Protein-coupled Receptor: REQUIREMENT OF INHIBITION OF CELLULAR RAC ACTIVITY. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 32841–32851. [[CrossRef](#)]
123. Carpinteiro, A.; Becker, K.A.; Japtok, L.; Hessler, G.; Keitsch, S.; Požgajová, M.; Schmid, K.W.; Adams, C.; Müller, S.; Kleuser, B.; et al. Regulation of hematogenous tumor metastasis by acid sphingomyelinase. *EMBO Mol. Med.* **2015**, *7*, 714–734. [[CrossRef](#)]
124. Tsuchida, T.; Saxton, R.E.; Morton, D.L.; Irie, R.F. Gangliosides of human melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **1987**, *78*, 45–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Sawada, M.; Moriya, S.; Shineha, R.; Satomi, S.; Miyagi, T. Comparative study of sialidase activity and G(M3) content in B16 melanoma variants with different metastatic potential. *Acta Biochim. Pol.* **1998**, *45*, 343–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Saha, S.; Mohanty, K.C. Enhancement of metastatic potential of mouse B16-melanoma cells to lung after treatment with gangliosides of B-16-melanoma cells of higher metastatic potential to lung. *Indian J. Exp. Biol.* **2003**, *41*, 1253–1258. [[PubMed](#)]
127. Liu, J.-W.; Sun, P.; Yan, Q.; Paller, A.S.; Gerami, P.; Ho, N.; Vashi, N.; Le Poole, I.C.; Wang, X.-Q. De-N-acetyl GM3 Promotes Melanoma Cell Migration and Invasion through Urokinase Plasminogen Activator Receptor Signaling-Dependent MMP-2 Activation. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 8662–8669. [[CrossRef](#)]

128. Peinado, H.; Alečković, M.; Lavotshkin, S.; Matei, I.; Costa-Silva, B.; Moreno-Bueno, G.; Hergueta-Redondo, M.; Williams, C.; García-Santos, G.; Ghajar, C.M.; et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 883–891. [[CrossRef](#)]
129. Costa-Silva, B.; Aiello, N.M.; Ocean, A.J.; Singh, S.; Zhang, H.; Thakur, B.K.; Becker, A.; Hoshino, A.; Mark, M.T.; Molina, H.; et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 816–826. [[CrossRef](#)]
130. Hoshino, A.; Costa-Silva, B.; Shen, T.-L.; Rodrigues, G.; Hashimoto, A.; Tesic Mark, M.; Molina, H.; Kohsaka, S.; Di Giannatale, A.; Ceder, S.; et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **2015**, *527*, 329–335. [[CrossRef](#)]
131. Raposo, G.; Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **2013**, *200*, 373–383. [[CrossRef](#)]
132. Xiao, D.; Barry, S.; Kmetz, D.; Egger, M.; Pan, J.; Rai, S.N.; Qu, J.; McMasters, K.M.; Hao, H. Melanoma cell-derived exosomes promote epithelial–mesenchymal transition in primary melanocytes through paracrine/autocrine signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Lett.* **2016**, *376*, 318–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Hood, J.L.; San, R.S.; Wickline, S.A. Exosomes Released by Melanoma Cells Prepare Sentinel Lymph Nodes for Tumor Metastasis. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 3792–3801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Trajkovic, K.; Hsu, C.; Chiantia, S.; Rajendran, L.; Wenzel, D.; Wieland, F.; Schwille, P.; Brugger, B.; Simons, M. Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science* **2008**, *319*, 1244–1247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. López-Montero, I.; Vélez, M.; Devaux, P.F. Surface tension induced by sphingomyelin to ceramide conversion in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA Biomembr.* **2007**, *1768*, 553–561. [[CrossRef](#)]
136. Kosaka, N.; Iguchi, H.; Yoshioka, Y.; Takeshita, F.; Matsuki, Y.; Ochiya, T. Secretory Mechanisms and Intercellular Transfer of MicroRNAs in Living Cells. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 17442–17452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Kosaka, N.; Iguchi, H.; Hagiwara, K.; Yoshioka, Y.; Takeshita, F.; Ochiya, T. Neutral Sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent Exosomal Transfer of Angiogenic MicroRNAs Regulate Cancer Cell Metastasis. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 10849–10859. [[CrossRef](#)]
138. Kajimoto, T.; Okada, T.; Miya, S.; Zhang, L.; Nakamura, S. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2712. [[CrossRef](#)]
139. Mohamed, N.N.I.; Okada, T.; Kajimoto, T.; Nakamura, S.-I. Essential Role of Sphingosine Kinase 2 in the Regulation of Cargo Contents in the Exosomes from K562 Cells. *Kobe J. Med. Sci.* **2018**, *63*, E123–E129.
140. Kajimoto, T.; Mohamed, N.N.I.; Badawy, S.M.M.; Matovelo, S.A.; Hirase, M.; Nakamura, S.; Yoshida, D.; Okada, T.; Ijuin, T.; Nakamura, S. Involvement of G $\beta\gamma$ subunits of G $\beta\gamma$ protein coupled with S1P receptor on multivesicular endosomes in F-actin formation and cargo sorting into exosomes. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 245–253. [[CrossRef](#)]
141. Schumacher, T.N.; Schreiber, R.D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* **2015**, *348*, 69–74. [[CrossRef](#)]
142. Dunn, G.P.; Bruce, A.T.; Ikeda, H.; Old, L.J.; Schreiber, R.D. Cancer immunoeediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 991–998. [[CrossRef](#)]
143. Kim, R.; Emi, M.; Tanabe, K. Cancer immunoeediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **2007**, *121*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Mandala, S.; Hadju, R.; Bergstrom, J.; Quackenbush, E.; Xie, J.; Milligan, J.; Thornton, R.; Shei, G.-J.; Card, D. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* **2002**, *296*, 346–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Matloubian, M.; Lo, C.G.; Cinamon, G.; Lesneski, M.J.; Xu, Y.; Brinkmann, V.; Allende, M.L.; Proia, R.L.; Cyster, J.G. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **2004**, *427*, 355–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Resop, R.S.; Douaisi, M.; Craft, J.; Jachimowski, L.C.M.; Blom, B.; Uittenbogaart, C.H. Sphingosine-1-phosphate/sphingosine-1-phosphate receptor 1 signaling is required for migration of naive human T cells from the thymus to the periphery. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, *138*, 551–557.e8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

147. Lo, C.G.; Xu, Y.; Proia, R.L.; Cyster, J.G. Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J. Exp. Med.* **2005**, *201*, 291–301. [[CrossRef](#)]
148. Bankovich, A.J.; Shiow, L.R.; Cyster, J.G. CD69 Suppresses Sphingosine 1-Phosphate Receptor-1 (S1P 1) Function through Interaction with Membrane Helix 4. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 22328–22337. [[CrossRef](#)]
149. Shiow, L.R.; Rosen, D.B.; Brdičková, N.; Xu, Y.; An, J.; Lanier, L.L.; Cyster, J.G.; Matloubian, M. CD69 acts downstream of interferon- α/β to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* **2006**, *440*, 540–544. [[CrossRef](#)]
150. Mackay, L.K.; Braun, A.; Macleod, B.L.; Collins, N.; Tebartz, C.; Bedoui, S.; Carbone, F.R.; Gebhardt, T. Cutting Edge: CD69 Interference with Sphingosine-1-Phosphate Receptor Function Regulates Peripheral T Cell Retention. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 2059–2063. [[CrossRef](#)]
151. Skon, C.N.; Lee, J.-Y.; Anderson, K.G.; Masopust, D.; Hogquist, K.A.; Jameson, S.C. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 1285–1293. [[CrossRef](#)]
152. 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.* **2018**, *19*, 538–546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Gebhardt, T.; Wakim, L.M.; Eidsmo, L.; Reading, P.C.; Heath, W.R.; Carbone, F.R. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat. Immunol.* **2009**, *10*, 524–530. [[CrossRef](#)]
154. Park, S.L.; Buzzai, A.; Rautela, J.; Hor, J.L.; Hochheiser, K.; Effern, M.; McBain, N.; Wagner, T.; Edwards, J.; McConville, R.; et al. Tissue-resident memory CD8+ T cells promote melanoma-immune equilibrium in skin. *Nature* **2019**, *565*, 366–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Menares, E.; Gálvez-Cancino, F.; Cáceres-Morgado, P.; Ghorani, E.; López, E.; Díaz, X.; Saavedra-Almarza, J.; Figueroa, D.A.; Roa, E.; Quezada, S.A.; et al. Tissue-resident memory CD8+ T cells amplify anti-tumor immunity by triggering antigen spreading through dendritic cells. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Hochheiser, K.; Aw Yeang, H.X.; Wagner, T.; Tutuka, C.; Behren, A.; Waithman, J.; Angel, C.; Neeson, P.J.; Gebhardt, T.; Gyorki, D.E. Accumulation of CD103 + CD8 + T cells in a cutaneous melanoma micrometastasis. *Clin. Transl. Immunol.* **2019**, *8*. [[CrossRef](#)]
157. Drouillard, A.; Neyra, A.; Mathieu, A.-L.; Marçais, A.; Wencker, M.; Marvel, J.; Belot, A.; Walzer, T. Human Naive and Memory T Cells Display Opposite Migratory Responses to Sphingosine-1 Phosphate. *J. Immunol.* **2018**, *200*, 551–557. [[CrossRef](#)]
158. Sic, H.; Kraus, H.; Madl, J.; Flittner, K.-A.; von Münchow, A.L.; Pieper, K.; Rizzi, M.; Kienzler, A.-K.; Ayata, K.; Rauer, S.; et al. Sphingosine-1-phosphate receptors control B-cell migration through signaling components associated with primary immunodeficiencies, chronic lymphocytic leukemia, and multiple sclerosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *134*, 420–428.e15. [[CrossRef](#)]
159. Walzer, T.; Chiossone, L.; Chaix, J.; Calver, A.; Carozzo, C.; Garrigue-Antar, L.; Jacques, Y.; Baratin, M.; Tomasello, E.; Vivier, E. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat. Immunol.* **2007**, *8*, 1337–1344. [[CrossRef](#)]
160. Drouillard, A.; Mathieu, A.-L.; Marçais, A.; Belot, A.; Viel, S.; Mingueneau, M.; Guckian, K.; Walzer, T. S1PR5 is essential for human natural killer cell migration toward sphingosine-1 phosphate. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *141*, 2265–2268.e1. [[CrossRef](#)]
161. Jenne, C.N.; Enders, A.; Rivera, R.; Watson, S.R.; Bankovich, A.J.; Pereira, J.P.; Xu, Y.; Roots, C.M.; Beilke, J.N.; Banerjee, A.; et al. T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 2469–2481. [[CrossRef](#)]
162. Mayol, K.; Biajoux, V.; Marvel, J.; Balabanian, K.; Walzer, T. Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking. *Blood* **2011**, *118*, 4863–4871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Liu, G.; Yang, K.; Burns, S.; Shrestha, S.; Chi, H. The S1P1-mTOR axis directs the reciprocal differentiation of TH1 and Treg cells. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 1047–1056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Chakraborty, P.; Vaena, S.G.; Thyagarajan, K.; Chatterjee, S.; Al-Khami, A.; Selvam, S.P.; Nguyen, H.; Kang, I.; Wyatt, M.W.; Baliga, U.; et al. Pro-Survival Lipid Sphingosine-1-Phosphate Metabolically Programs T Cells to Limit Anti-tumor Activity. *Cell Rep.* **2019**, *28*, 1879–1893.e7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

165. Sanger Mouse Genetics Project; van der Weyden, L.; Arends, M.J.; Campbell, A.D.; Bald, T.; Wardle-Jones, H.; Griggs, N.; Velasco-Herrera, M.D.C.; Tüting, T.; Sansom, O.J.; et al. Genome-wide in vivo screen identifies novel host regulators of metastatic colonization. *Nature* **2017**, *541*, 233–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Assi, E.; Cervia, D.; Bizzozero, L.; Capobianco, A.; Pambianco, S.; Morisi, F.; De Palma, C.; Moscheni, C.; Pellegrino, P.; Clementi, E.; et al. Modulation of Acid Sphingomyelinase in Melanoma Reprogrammes the Tumour Immune Microenvironment. *Mediators Inflamm.* **2015**, *2015*, 1–13. [[CrossRef](#)]
167. Coerdts, I.; Full-Scharrer, G.; Hösl, E. Long-term results in surgical treatment of cleft lips and palates. *Prog. Pediatr. Surg.* **1977**, *10*, 1–3.
168. Nakagawa, R.; Serizawa, I.; Motoki, K.; Sato, M.; Ueno, H.; Iijima, R.; Nakamura, H.; Shimosaka, A.; Koezuka, Y. Antitumor activity of alpha-galactosylceramide, KRN7000, in mice with the melanoma B16 hepatic metastasis and immunohistological study of tumor infiltrating cells. *Oncol. Res.* **2000**, *12*, 51–58. [[CrossRef](#)]
169. Ghosh, S.; Juin, S.K.; Nandi, P.; Majumdar, S.B.; Bose, A.; Baral, R.; Sil, P.C.; Majumdar, S. PKC ζ mediated anti-proliferative effect of C2 ceramide on neutralization of the tumor microenvironment and melanoma regression. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **2020**, *69*, 611–627. [[CrossRef](#)]
170. Tiwary, S.; Berzofsky, J.A.; Terabe, M. Altered Lipid Tumor Environment and Its Potential Effects on NKT Cell Function in Tumor Immunity. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2187. [[CrossRef](#)]
171. Bay, S.; Fort, S.; Birikaki, L.; Ganneau, C.; Samain, E.; Coic, Y.-M.; Bonhomme, F.; Dériaud, E.; Leclerc, C.; Lo-Man, R. Induction of a melanoma-specific antibody response by a monovalent, but not a divalent, synthetic GM2 neoglycopeptide. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 582–587. [[CrossRef](#)]
172. Fernandez, L.E.; Gabri, M.R.; Guthmann, M.D.; Gomez, R.E.; Gold, S.; Fainboim, L.; Gomez, D.E.; Alonso, D.F. NGcGM3 ganglioside: A privileged target for cancer vaccines. *Clin. Dev. Immunol.* **2010**, *2010*, 814397. [[CrossRef](#)]
173. Pérez, K.; Osorio, M.; Hernández, J.; Carr, A.; Fernández, L.E. NGcGM3/VSSP vaccine as treatment for melanoma patients. *Hum. Vaccines Immunother.* **2013**, *9*, 1237–1240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Bernhard, H.; Meyer zum Büschenfelde, K.H.; Dippold, W.G. Ganglioside GD3 shedding by human malignant melanoma cells. *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 155–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Portoukalian, J.; Zwingelstein, G.; Abdul-Malak, N.; Doré, J.F. Alteration of gangliosides in plasma and red cells of humans bearing melanoma tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *85*, 916–920. [[CrossRef](#)]
176. Péguet-Navarro, J.; Sportouch, M.; Popa, I.; Berthier, O.; Schmitt, D.; Portoukalian, J. Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2003**, *170*, 3488–3494. [[CrossRef](#)]
177. Bennaceur, K.; Popa, I.; Chapman, J.A.; Migdal, C.; Péguet-Navarro, J.; Touraine, J.-L.; Portoukalian, J. Different mechanisms are involved in apoptosis induced by melanoma gangliosides on human monocyte-derived dendritic cells. *Glycobiology* **2009**, *19*, 576–582. [[CrossRef](#)]
178. Tsao, C.-Y.; Sabbatino, F.; Cheung, N.-K.V.; Hsu, J.C.-F.; Villani, V.; Wang, X.; Ferrone, S. Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of GD2 ganglioside-specific monoclonal antibody 3F8 in human melanoma cells. *Oncoimmunology* **2015**, *4*, e1023975. [[CrossRef](#)]
179. Kushner, B.H.; Cheung, I.Y.; Modak, S.; Basu, E.M.; Roberts, S.S.; Cheung, N.-K. Humanized 3F8 Anti-GD2 Monoclonal Antibody Dosing With Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Patients With Resistant Neuroblastoma: A Phase 1 Clinical Trial. *JAMA Oncol.* **2018**, *4*, 1729–1735. [[CrossRef](#)]
180. Kramer, K.; Pandit-Taskar, N.; Humm, J.L.; Zanzonico, P.B.; Haque, S.; Dunkel, I.J.; Wolden, S.L.; Donzelli, M.; Goldman, D.A.; Lewis, J.S.; et al. A phase II study of radioimmunotherapy with intraventricular 131 I-3F8 for medulloblastoma. *Pediatr. Blood Cancer* **2018**, *65*. [[CrossRef](#)]
181. Yu, J.; Wu, X.; Yan, J.; Yu, H.; Xu, L.; Chi, Z.; Sheng, X.; Si, L.; Cui, C.; Dai, J.; et al. Anti-GD2/4-1BB chimeric antigen receptor T cell therapy for the treatment of Chinese melanoma patients. *J. Hematol. Oncol. J. Hematol. Oncol.* **2018**, *11*, 1. [[CrossRef](#)]
182. Albertini, M.R.; Yang, R.K.; Ranheim, E.A.; Hank, J.A.; Zuleger, C.L.; Weber, S.; Neuman, H.; Hartig, G.; Weigel, T.; Mahvi, D.; et al. Pilot trial of the hu14.18-IL2 immunocytokine in patients with completely resectable recurrent stage III or stage IV melanoma. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **2018**, *67*, 1647–1658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

183. Wu, Y.; Deng, W.; McGinley, E.C.; Klinke, D.J. Melanoma exosomes deliver a complex biological payload that upregulates PTPN11 to suppress T lymphocyte function. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2017**, *30*, 203–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Zhou, J.; Yang, Y.; Wang, W.; Zhang, Y.; Chen, Z.; Hao, C.; Zhang, J. Melanoma-released exosomes directly activate the mitochondrial apoptotic pathway of CD4+ T cells through their microRNA cargo. *Exp. Cell Res.* **2018**, *371*, 364–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Döchler, M.; Czernek, L.; Peczek, L.; Cypriak, W.; Sztiller-Sikorska, M.; Czyz, M. Melanoma-Derived Extracellular Vesicles Bear the Potential for the Induction of Antigen-Specific Tolerance. *Cells* **2019**, *8*, 665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Vignard, V.; Labbé, M.; Marec, N.; André-Grégoire, G.; Jouand, N.; Fonteneau, J.-F.; Labarrière, N.; Fradin, D. MicroRNAs in Tumor Exosomes Drive Immune Escape in Melanoma. *Cancer Immunol. Res.* **2020**, *8*, 255–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Sharma, P.; Diergaarde, B.; Ferrone, S.; Kirkwood, J.M.; Whiteside, T.L. Melanoma cell-derived exosomes in plasma of melanoma patients suppress functions of immune effector cells. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 92. [[CrossRef](#)]
188. Chen, G.; Huang, A.C.; Zhang, W.; Zhang, G.; Wu, M.; Xu, W.; Yu, Z.; Yang, J.; Wang, B.; Sun, H.; et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* **2018**, *560*, 382–386. [[CrossRef](#)]
189. Poggio, M.; Hu, T.; Pai, C.-C.; Chu, B.; Belair, C.D.; Chang, A.; Montabana, E.; Lang, U.E.; Fu, Q.; Fong, L.; et al. Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. *Cell* **2019**, *177*, 414–427.e13. [[CrossRef](#)]
190. Falkson, C.I.; Ibrahim, J.; Kirkwood, J.M.; Coates, A.S.; Atkins, M.B.; Blum, R.H. Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: An Eastern Cooperative Oncology Group study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 1743–1751. [[CrossRef](#)]
191. Middleton, M.R.; Grob, J.J.; Aaronson, N.; Fierlbeck, G.; Tilgen, W.; Seiter, S.; Gore, M.; Aamdal, S.; Cebon, J.; Coates, A.; et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 158–166. [[CrossRef](#)]
192. Avril, M.F.; Aamdal, S.; Grob, J.J.; Hauschild, A.; Mohr, P.; Bonerandi, J.J.; Weichenthal, M.; Neuber, K.; Bieber, T.; Gilde, K.; et al. Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: A phase III study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 1118–1125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Flaherty, K.T.; Robert, C.; Hersey, P.; Nathan, P.; Garbe, C.; Milhem, M.; Demidov, L.V.; Hassel, J.C.; Rutkowski, P.; Mohr, P.; et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 107–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Tian, Y.; Guo, W. A Review of the Molecular Pathways Involved in Resistance to BRAF Inhibitors in Patients with Advanced-Stage Melanoma. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2020**, *26*, e920957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Schadendorf, D.; Hodi, F.S.; Robert, C.; Weber, J.S.; Margolin, K.; Hamid, O.; Patt, D.; Chen, T.-T.; Berman, D.M.; Wolchok, J.D. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 1889–1894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
196. Robert, C.; Schachter, J.; Long, G.V.; Arance, A.; Grob, J.J.; Mortier, L.; Daud, A.; Carlino, M.S.; McNeil, C.; Lotem, M.; et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 2521–2532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Robert, C.; Long, G.V.; Brady, B.; Dutriaux, C.; Maio, M.; Mortier, L.; Hassel, J.C.; Rutkowski, P.; McNeil, C.; Kalinka-Warzocha, E.; et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 320–330. [[CrossRef](#)]
198. Larkin, J.; Chiarion-Sileni, V.; Gonzalez, R.; Grob, J.-J.; Rutkowski, P.; Lao, C.D.; Cowey, C.L.; Schadendorf, D.; Wagstaff, J.; Dummer, R.; et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 1535–1546. [[CrossRef](#)]
199. Postow, M.A. Managing immune checkpoint-blocking antibody side effects. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* **2015**, 76–83. [[CrossRef](#)]

200. Suo, A.; Chan, Y.; Beaulieu, C.; Kong, S.; Cheung, W.Y.; Monzon, J.G.; Smylie, M.; Walker, J.; Morris, D.; Cheng, T. Anti-PD1-Induced Immune-Related Adverse Events and Survival Outcomes in Advanced Melanoma. *Oncologist* **2020**, *25*, 438–446. [[CrossRef](#)]
201. Cervia, D.; Assi, E.; De Palma, C.; Giovarelli, M.; Bizzozero, L.; Pambianco, S.; Di Renzo, I.; Zecchini, S.; Moscheni, C.; Vantaggiato, C.; et al. Essential role for acid sphingomyelinase-inhibited autophagy in melanoma response to cisplatin. *Oncotarget* **2016**, *7*. [[CrossRef](#)]
202. Ishitsuka, A.; Fujine, E.; Mizutani, Y.; Tawada, C.; Kanoh, H.; Banno, Y.; Seishima, M. FTY720 and cisplatin synergistically induce the death of cisplatin-resistant melanoma cells through the downregulation of the PI3K pathway and the decrease in epidermal growth factor receptor expression. *Int. J. Mol. Med.* **2014**, *34*, 1169–1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
203. Bektas, M.; Jolly, P.S.; Müller, C.; Eberle, J.; Spiegel, S.; Geilen, C.C. Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: Role of Bcl-2 expression. *Oncogene* **2005**, *24*, 178–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Takahashi, T.; Abe, N.; Kanoh, H.; Banno, Y.; Seishima, M. Synergistic effects of vemurafenib and fingolimod (FTY720) in vemurafenib-resistant melanoma cell lines. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *18*, 5151–5158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Ji, C.; Yang, Y.-L.; He, L.; Gu, B.; Xia, J.-P.; Sun, W.-L.; Su, Z.-L.; Chen, B.; Bi, Z.-G. Increasing ceramides sensitizes genistein-induced melanoma cell apoptosis and growth inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *421*, 462–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
206. Tran, M.A.; Smith, C.D.; Kester, M.; Robertson, G.P. Combining nanoliposomal ceramide with sorafenib synergistically inhibits melanoma and breast cancer cell survival to decrease tumor development. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2008**, *14*, 3571–3581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
207. Zhang, P.; Fu, C.; Hu, Y.; Dong, C.; Song, Y.; Song, E. C6-ceramide nanoliposome suppresses tumor metastasis by eliciting PI3K and PKC ζ tumor-suppressive activities and regulating integrin affinity modulation. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9275. [[CrossRef](#)]
208. Kobayashi, E.; Motoki, K.; Uchida, T.; Fukushima, H.; Koezuka, Y. KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol. Res.* **1995**, *7*, 529–534.
209. Guthmann, M.D.; Bitton, R.J.; Carnero, A.J.L.; Gabri, M.R.; Cinat, G.; Koliren, L.; Lewi, D.; Fernandez, L.E.; Alonso, D.F.; Gómez, D.E.; et al. Active specific immunotherapy of melanoma with a GM3 ganglioside-based vaccine: A report on safety and immunogenicity. *J. Immunother.* **2004**, *27*, 442–451. [[CrossRef](#)]
210. Irie, R.F.; Ollila, D.W.; O'Day, S.; Morton, D.L. Phase I pilot clinical trial of human IgM monoclonal antibody to ganglioside GM3 in patients with metastatic melanoma. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **2004**, *53*, 110–117. [[CrossRef](#)]
211. Musumarra, G.; Barresi, V.; Condorelli, D.F.; Scirè, S. A bioinformatic approach to the identification of candidate genes for the development of new cancer diagnostics. *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 321–327. [[CrossRef](#)]
212. Ene (Nicolae), C.-D.; Nicolae, I. Gangliosides and Antigangliosides in Malignant Melanoma. In *Melanoma—Current Clinical Management and Future Therapeutics*; Murph, M., Ed.; Intech: London, UK, 2015; ISBN 978-953-51-2036-0.



BIBLIOGRAPHIE

1. Schadendorf, D. *et al.* Melanoma. *The Lancet* **392**, 971–984 (2018).
2. Centeno, P. P., Pavet, V. & Marais, R. The journey from melanocytes to melanoma. *Nat. Rev. Cancer* (2023) doi:10.1038/s41568-023-00565-7.
3. INCa. Panorama des cancers en France - édition 2023, <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Les-donnees-sur-les-cancers/Incidence-et-mortalite-des-cancers/Incidence-nationale-des-cancers-en-2023>. Consulté le 07/07/23.
4. Domingues, B., Lopes, J. M., Soares, P. & Pópulo, H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther.* **7**, 35–49 (2018).
5. Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415–421 (2013).
6. Global Cancer Observatory, OMS. <https://gco.iarc.fr/>. Consulté le 07/07/23.
7. Shain, A. H. & Bastian, B. C. From melanocytes to melanomas. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 345–358 (2016).
8. Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A. & Tymińska, A. Skin melanocytes: biology and development. *Adv. Dermatol. Allergol.* **1**, 30–41 (2013).
9. Clark, W. H. *et al.* Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 1893–1904 (1989).
10. Bevona, C., Goggins, W., Quinn, T., Fullerton, J. & Tsao, H. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch. Dermatol.* **139**, 1620–1624; discussion 1624 (2003).
11. Miller, A. J. & Mihm, M. C. Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **355**, 51–65 (2006).
12. Shain, A. H. *et al.* The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1926–1936 (2015).
13. Hayward, N. K. *et al.* Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature* **545**, 175–180 (2017).
14. Aoude, L. G., Wadt, K. A. W., Pritchard, A. L. & Hayward, N. K. Genetics of familial melanoma: 20 years after *CDKN2A*. *Pigment Cell Melanoma Res.* **28**, 148–160 (2015).
15. Hodis, E. *et al.* A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. *Cell* **150**, 251–263 (2012).
16. Gembarska, A. *et al.* MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat. Med.* **18**, 1239–1247 (2012).
17. Garbe, C. *et al.* European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: Diagnostics: Update 2022. *Eur. J. Cancer* **170**, 236–255 (2022).
18. Michielin, O., Van Akkooi, A. C. J., Ascierto, P. A., Dummer, R. & Keilholz, U. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **30**, 1884–1901 (2019).
19. Lelliott, E. J., McArthur, G. A., Oliaro, J. & Sheppard, K. E. Immunomodulatory Effects of BRAF, MEK, and CDK4/6 Inhibitors: Implications for Combining Targeted Therapy and Immune Checkpoint Blockade for the Treatment of Melanoma. *Front. Immunol.* **12**, 661737 (2021).
20. Wei, S. C., Duffy, C. R. & Allison, J. P. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov.* **8**, 1069–1086 (2018).

21. Brady, M. S. *et al.* Patterns of detection in patients with cutaneous melanoma. *Cancer* **89**, 342–347 (2000).
22. Haute Autorité de Santé. Stratégie de diagnostic précoce du mélanome. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2006.
23. Gershenwald, J. E. *et al.* Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 472–492 (2017).
24. Mélanome cutané - Prise en charge | Recommandations |. VIDAL Campus <https://www.campus.vidal.fr/>.
25. Livingstone, E. *et al.* Adjuvant nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus placebo in patients with resected stage IV melanoma with no evidence of disease (IMMUNED): final results of a randomised, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Lond. Engl.* **400**, 1117–1129 (2022).
26. Ugurel, S. *et al.* Survival of patients with advanced metastatic melanoma: the impact of novel therapies-update 2017. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **83**, 247–257 (2017).
27. Wolchok, J. D. *et al.* Long-Term Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab or Nivolumab Alone Versus Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol.* JCO.21.02229 (2021) doi:10.1200/JCO.21.02229.
28. Long, G. V. *et al.* Combination nivolumab and ipilimumab or nivolumab alone in melanoma brain metastases: a multicentre randomised phase 2 study. *Lancet Oncol.* **19**, 672–681 (2018).
29. Tawbi, H. A.-H. *et al.* Efficacy and safety of the combination of nivolumab (NIVO) plus ipilimumab (IPI) in patients with symptomatic melanoma brain metastases (CheckMate 204). *J. Clin. Oncol.* **37**, 9501–9501 (2019).
30. Delves, P. J. The Immune System. *Adv. Immunol.* (2000).
31. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
32. Tisoncik, J. R. *et al.* Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **76**, 16–32 (2012).
33. Cooper, M. D. & Alder, M. N. The Evolution of Adaptive Immune Systems. *Cell* **124**, 815–822 (2006).
34. Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E. & Dick, J. E. Hematopoiesis: A Human Perspective. *Cell Stem Cell* **10**, 120–136 (2012).
35. Bruni, D., Angell, H. K. & Galon, J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat. Rev. Cancer* (2020) doi:10.1038/s41568-020-0285-7.
36. Lee, M. K. S. *et al.* Interplay between Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential and Metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **31**, 525–535 (2020).
37. Ehrlich, P. Über den jetzigen Stand der Farzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* **5**, 273–290 (1909).
38. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
39. Burnet, M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br. Med. J.* **1**, 841–847 (1957).
40. Thomas, L. On Immunosurveillance in Human Cancer.
41. Burnet, F. M. The Concept of Immunological Surveillance. in *Progress in Tumor Research* (ed. Schwartz, R. S.) vol. 13 1–27 (S. Karger AG, 1970).
42. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991–998 (2002).

43. Stutman, O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* **183**, 534–536 (1974).
44. Hunig, T. T-cell function and specificity in athymic mice. *Immunol. Today* **4**, 84–87 (1983).
45. Dighe, S. & Old, L. J. Enhanced In Vivo Growth and Resistance to Rejection of Tumor Cells Expressing Dominant Negative IFN γ Receptors.
46. Kaplan, D. H. *et al.* Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 7556–7561 (1998).
47. Van Den Broek, M. E. *et al.* Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J. Exp. Med.* **184**, 1781–1790 (1996).
48. Smyth, M. J. *et al.* Perforin-Mediated Cytotoxicity Is Critical for Surveillance of Spontaneous Lymphoma. *J. Exp. Med.* **192**, 755–760 (2000).
49. Park, M. D., Silvin, A., Ginhoux, F. & Merad, M. Macrophages in health and disease. *Cell* **185**, 4259–4279 (2022).
50. Woo, S.-R., Corrales, L. & Gajewski, T. F. Innate immune recognition of cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 445–474 (2015).
51. López-Janeiro, Á., Padilla-Ansala, C., De Andrea, C. E., Hardisson, D. & Melero, I. Prognostic value of macrophage polarization markers in epithelial neoplasms and melanoma. A systematic review and meta-analysis. *Mod. Pathol.* **33**, 1458–1465 (2020).
52. Jensen, T. O. *et al.* Macrophage Markers in Serum and Tumor Have Prognostic Impact in American Joint Committee on Cancer Stage I/II Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **27**, 3330–3337 (2009).
53. Ma, R.-Y., Black, A. & Qian, B.-Z. Macrophage diversity in cancer revisited in the era of single-cell omics. *Trends Immunol.* **43**, 546–563 (2022).
54. van Vlerken-Ysla, L., Tyurina, Y. Y., Kagan, V. E. & Gabrilovich, D. I. Functional states of myeloid cells in cancer. *Cancer Cell* **41**, 490–504 (2023).
55. Burn, G. L., Foti, A., Marsman, G., Patel, D. F. & Zychlinsky, A. The Neutrophil. *Immunity* **54**, 1377–1391 (2021).
56. Hagerling, C. *et al.* Immune effector monocyte–neutrophil cooperation induced by the primary tumor prevents metastatic progression of breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 21704–21714 (2019).
57. Patel, S. *et al.* Unique pattern of neutrophil migration and function during tumor progression. *Nat. Immunol.* **19**, 1236–1247 (2018).
58. Templeton, A. J. *et al.* Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **106**, (2014).
59. Teijeira, Á. *et al.* CXCR1 and CXCR2 Chemokine Receptor Agonists Produced by Tumors Induce Neutrophil Extracellular Traps that Interfere with Immune Cytotoxicity. *Immunity* **52**, 856-871.e8 (2020).
60. Linde, I. L. *et al.* Neutrophil-activating therapy for the treatment of cancer. *Cancer Cell* **41**, 356-372.e10 (2023).
61. Gungabeesoon, J. *et al.* A neutrophil response linked to tumor control in immunotherapy. *Cell* **186**, 1448-1464.e20 (2023).
62. Hirschhorn, D. *et al.* T cell immunotherapies engage neutrophils to eliminate tumor antigen escape variants. *Cell* **186**, 1432-1447.e17 (2023).
63. André, P. *et al.* Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells. *Cell* **175**, 1731-1743.e13 (2018).
64. Huntington, N. D., Cursons, J. & Rautela, J. The cancer–natural killer cell immunity cycle. *Nat. Rev. Cancer* (2020) doi:10.1038/s41568-020-0272-z.

65. Speiser, D. E., Chijioke, O., Schaeuble, K. & Münz, C. CD4⁺ T cells in cancer. *Nat. Cancer* **4**, 317–329 (2023).
66. Wolf, N. K., Kissiov, D. U. & Raulet, D. H. Roles of natural killer cells in immunity to cancer, and applications to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* (2022) doi:10.1038/s41577-022-00732-1.
67. Kawano, T. *et al.* Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5690–5693 (1998).
68. Benlagha, K., Kyin, T., Beavis, A., Teyton, L. & Bendelac, A. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* **296**, 553–555 (2002).
69. Bae, E.-A., Seo, H., Kim, I.-K., Jeon, I. & Kang, C.-Y. Roles of NKT cells in cancer immunotherapy. *Arch. Pharm. Res.* **42**, 543–548 (2019).
70. Cui, J. *et al.* Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* **278**, 1623–1626 (1997).
71. Bonneville, M., O’Brien, R. L. & Born, W. K. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 467–478 (2010).
72. Girardi, M. *et al.* Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* **294**, 605–609 (2001).
73. Argentati, K. *et al.* Reduced number and impaired function of circulating gamma delta T cells in patients with cutaneous primary melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 829–834 (2003).
74. Wistuba-Hamprecht, K. *et al.* Phenotypic characterization and prognostic impact of circulating $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T-cells in metastatic malignant melanoma. *Int. J. Cancer* **138**, 698–704 (2016).
75. Harrer, D. C. *et al.* RNA-transfection of $\gamma\delta$ T cells with a chimeric antigen receptor or an $\alpha\beta$ T-cell receptor: a safer alternative to genetically engineered $\alpha\beta$ T cells for the immunotherapy of melanoma. *BMC Cancer* **17**, 551 (2017).
76. Zagorulya, M. & Spranger, S. Once upon a prime: DCs shape cancer immunity. *Trends Cancer* **9**, 172–184 (2023).
77. Eisenbarth, S. C. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 89–103 (2019).
78. Plesca, I. *et al.* Tumor-associated human dendritic cell subsets: Phenotype, functional orientation, and clinical relevance. *Eur. J. Immunol.* **52**, 1750–1758 (2022).
79. Zhou, B., Lawrence, T. & Liang, Y. The Role of Plasmacytoid Dendritic Cells in Cancers. *Front. Immunol.* **12**, 749190 (2021).
80. Akkaya, M., Kwak, K. & Pierce, S. K. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 229–238 (2020).
81. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
82. Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. & Jordan, M. S. T Cell Activation. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 591–619 (2009).
83. Pishesha, N., Harmand, T. J. & Ploegh, H. L. A guide to antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* (2022) doi:10.1038/s41577-022-00707-2.
84. Jhunjhunwala, S., Hammer, C. & Delamarre, L. Antigen presentation in cancer: insights into tumour immunogenicity and immune evasion. *Nat. Rev. Cancer* **21**, 298–312 (2021).
85. Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A. & Amigorena, S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 557–569 (2012).

86. Kambayashi, T. & Laufer, T. M. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 719–730 (2014).
87. Kalaora, S., Nagler, A., Wargo, J. A. & Samuels, Y. Mechanisms of immune activation and regulation: lessons from melanoma. *Nat. Rev. Cancer* **22**, 195–207 (2022).
88. Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* **348**, 69–74 (2015).
89. Leko, V. & Rosenberg, S. A. Identifying and Targeting Human Tumor Antigens for T Cell-Based Immunotherapy of Solid Tumors. *Cancer Cell* **38**, 454–472 (2020).
90. Haas, G. G., D’Cruz, O. J. & De Bault, L. E. Distribution of human leukocyte antigen-ABC and -D/DR antigens in the unfixed human testis. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol. AJRIM* **18**, 47–51 (1988).
91. Simpson, A. J. G., Caballero, O. L., Jungbluth, A., Chen, Y.-T. & Old, L. J. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 615–625 (2005).
92. Valmori, D. *et al.* Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8+ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients. *Cancer Res.* **60**, 4499–4506 (2000).
93. Hoek, K. S. *et al.* Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy. *Pigment Cell Melanoma Res.* **21**, 665–676 (2008).
94. Berset, M. *et al.* Expression of Melan-A/MART-1 antigen as a prognostic factor in primary cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer* **95**, 73–77 (2001).
95. Ayyoub, M. *et al.* Activation of human melanoma reactive CD8+ T cells by vaccination with an immunogenic peptide analog derived from Melan-A/melanoma antigen recognized by T cells-1. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **9**, 669–677 (2003).
96. Peri, A. *et al.* The landscape of T cell antigens for cancer immunotherapy. *Nat. Cancer* **4**, 937–954 (2023).
97. Schatton, T., Scolyer, R. A., Thompson, J. F. & Mihm, M. C. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Significance in Melanoma Prognosis. in *Molecular Diagnostics for Melanoma: Methods and Protocols* (eds. Thurin, M. & Marincola, F. M.) 287–324 (Humana Press, 2014). doi:10.1007/978-1-62703-727-3_16.
98. Castellsagué, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* **110**, S4–S7 (2008).
99. Farrell, P. J. Epstein–Barr Virus and Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **14**, 29–53 (2019).
100. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 298–306 (2012).
101. Gocher, A. M., Workman, C. J. & Vignali, D. A. A. Interferon- γ : teammate or opponent in the tumour microenvironment? *Nat. Rev. Immunol.* (2021) doi:10.1038/s41577-021-00566-3.
102. Mikucki, M. E. *et al.* Non-redundant requirement for CXCR3 signalling during tumoricidal T-cell trafficking across tumour vascular checkpoints. *Nat. Commun.* **6**, 7458 (2015).
103. Moreno Ayala, M. A. *et al.* CXCR3 expression in regulatory T cells drives interactions with type I dendritic cells in tumors to restrict CD8+ T cell antitumor immunity. *Immunity* S1074761323002601 (2023) doi:10.1016/j.immuni.2023.06.003.
104. Dustin, M. L. The Immunological Synapse. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 1023–1033 (2014).
105. McKenzie, B. & Valitutti, S. Resisting T cell attack: tumor-cell-intrinsic defense and reparation mechanisms. *Trends Cancer* **9**, 198–211 (2023).

106. McLane, L. M., Abdel-Hakeem, M. S. & Wherry, E. J. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 457–495 (2019).
107. Khan, O. *et al.* TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion. *Nature* **571**, 211–218 (2019).
108. Scott, A. C. *et al.* TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature* **571**, 270–274 (2019).
109. Miller, B. C. *et al.* Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat. Immunol.* **20**, 326–336 (2019).
110. Im, S. J. *et al.* Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature* **537**, 417–421 (2016).
111. Sade-Feldman, M. *et al.* Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. *Cell* **175**, 998–1013.e20 (2018).
112. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 445–489 (2010).
113. 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).
114. Gutiérrez-Melo, N. & Baumjohann, D. T follicular helper cells in cancer. *Trends Cancer* S2405803322002709 (2023) doi:10.1016/j.trecan.2022.12.007.
115. Tay, C., Tanaka, A. & Sakaguchi, S. Tumor-infiltrating regulatory T cells as targets of cancer immunotherapy. *Cancer Cell* **41**, 450–465 (2023).
116. Borst, J. CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. 13.
117. Brightman, S. E. *et al.* Neoantigen-specific stem cell memory-like CD4+ T cells mediate CD8+ T cell-dependent immunotherapy of MHC class II-negative solid tumors. *Nat. Immunol.* **24**, 1345–1357 (2023).
118. Laumont, C. M. & Nelson, B. H. B cells in the tumor microenvironment: Multi-faceted organizers, regulators, and effectors of anti-tumor immunity. *Cancer Cell* **41**, 466–489 (2023).
119. Kruse, B. *et al.* CD4+ T cell-induced inflammatory cell death controls immune-evasive tumours. *Nature* (2023) doi:10.1038/s41586-023-06199-x.
120. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. C ENTRAL M EMORY AND E FFECTOR M EMORY T C ELL S UBSETS : Function, Generation, and Maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 745–763 (2004).
121. Jameson, S. C. & Masopust, D. Understanding Subset Diversity in T Cell Memory. *Immunity* **48**, 214–226 (2018).
122. Gebhardt, T. *et al.* Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat. Immunol.* **10**, 524 (2009).
123. Pauls, K. *et al.* Role of Integrin α E(CD103) β 7 for Tissue-Specific Epidermal Localization of CD8+ T Lymphocytes. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 569–575 (2001).
124. Watanabe, R. *et al.* Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells. *Sci. Transl. Med.* **7**, 279ra39 (2015).
125. Cheuk, S. *et al.* CD49a Expression Defines Tissue-Resident CD8 + T Cells Poised for Cytotoxic Function in Human Skin. *Immunity* **46**, 287–300 (2017).
126. Bankovich, A. J., Shiow, L. R. & Cyster, J. G. CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. *J. Biol. Chem.* **285**, 22328–22337 (2010).
127. Shiow, L. R. *et al.* CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* **440**, 540–544 (2006).

128. Mackay, L. K. *et al.* Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**, 2059–2063 (2015).
129. Skon, C. N. *et al.* Transcriptional downregulation of *S1pr1* is required for the establishment of resident memory CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.* **14**, 1285–1293 (2013).
130. Dijkgraaf, F. E. *et al.* Tissue patrol by resident memory CD8⁺ T cells in human skin. *Nat. Immunol.* **20**, 756–764 (2019).
131. Park, S. L. *et al.* Tissue-resident memory CD8⁺ T cells promote melanoma–immune equilibrium in skin. *Nature* **565**, 366–371 (2019).
132. Menares, E. *et al.* Tissue-resident memory CD8⁺ T cells amplify anti-tumor immunity by triggering antigen spreading through dendritic cells. *Nat. Commun.* **10**, 4401 (2019).
133. Edwards, J. *et al.* CD103⁺ Tumor-Resident CD8⁺ T Cells Are Associated with Improved Survival in Immunotherapy-Naïve Melanoma Patients and Expand Significantly During Anti-PD-1 Treatment. *Clin. Cancer Res.* **24**, 3036–3045 (2018).
134. Molodtsov, A. K. *et al.* Resident memory CD8⁺ T cells in regional lymph nodes mediate immunity to metastatic melanoma. *Immunity* **54**, 2117-2132.e7 (2021).
135. Shevryev, D. & Tereshchenko, V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front. Immunol.* **10**, 3100 (2020).
136. Togashi, Y., Shitara, K. & Nishikawa, H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **16**, 356–371 (2019).
137. Nishikawa, H. & Koyama, S. Mechanisms of regulatory T cell infiltration in tumors: implications for innovative immune precision therapies. *J. Immunother. Cancer* **9**, e002591 (2021).
138. Ahmadzadeh, M. *et al.* Tumor-infiltrating human CD4⁺ regulatory T cells display a distinct TCR repertoire and exhibit tumor and neoantigen reactivity. *Sci. Immunol.* **4**, eaao4310 (2019).
139. Gooden, M. J. M., De Bock, G. H., Leffers, N., Daemen, T. & Nijman, H. W. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br. J. Cancer* **105**, 93–103 (2011).
140. Sato, E. *et al.* Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 18538–18543 (2005).
141. Peng, L. *et al.* Increased tumor-infiltrating CD8⁺Foxp3⁺ T lymphocytes are associated with tumor progression in human gastric cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**, 2183–2192 (2012).
142. Eschweiler, S. *et al.* Intratumoral follicular regulatory T cells curtail anti-PD-1 treatment efficacy. *Nat. Immunol.* **22**, 1052–1063 (2021).
143. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nat. Immunol.* **8**, 1353–1362 (2007).
144. Chinen, T. *et al.* An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat. Immunol.* **17**, 1322–1333 (2016).
145. Ohta, A. *et al.* A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 13132–13137 (2006).
146. Young, A., Mittal, D., Stagg, J. & Smyth, M. J. Targeting Cancer-Derived Adenosine: New Therapeutic Approaches. *Cancer Discov.* **4**, 879–888 (2014).
147. Deaglio, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1257–1265 (2007).

148. Grossman, W. J. *et al.* Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* **21**, 589–601 (2004).
149. Cao, X. *et al.* Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* **27**, 635–646 (2007).
150. Rubtsov, Y. P. *et al.* Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity* **28**, 546–558 (2008).
151. Hsu, P. *et al.* IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1. *J. Immunol.* **195**, 3665–3674 (2015).
152. Jarnicki, A. G., Lysaght, J., Todryk, S. & Mills, K. H. G. Suppression of Antitumor Immunity by IL-10 and TGF- β -Producing T Cells Infiltrating the Growing Tumor: Influence of Tumor Environment on the Induction of CD4⁺ and CD8⁺ Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **177**, 896–904 (2006).
153. Sawant, D. V. *et al.* Adaptive plasticity of IL-10⁺ and IL-35⁺ Treg cells cooperatively promotes tumor T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **20**, 724–735 (2019).
154. Mumm, J. B. *et al.* IL-10 Elicits IFN γ -Dependent Tumor Immune Surveillance. *Cancer Cell* **20**, 781–796 (2011).
155. Hanna, B. S. *et al.* Interleukin-10 receptor signaling promotes the maintenance of a PD-1^{int} TCF-1⁺ CD8⁺ T cell population that sustains anti-tumor immunity. *Immunity* **54**, 2825–2841.e10 (2021).
156. Forthall, D. N. Functions of Antibodies. *Microbiol. Spectr.* **2**, 2.4.21 (2014).
157. Victora, G. D. & Nussenzweig, M. C. Germinal Centers. *Annu. Rev. Immunol.* **40**, 413–442 (2022).
158. 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.* **18**, 3281–3292 (2012).
159. Griss, J. *et al.* B cells sustain inflammation and predict response to immune checkpoint blockade in human melanoma. *Nat. Commun.* **10**, 4186 (2019).
160. Petitprez, F. *et al.* B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature* **577**, 556–560 (2020).
161. Helmink, B. A. *et al.* B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature* **577**, 549–555 (2020).
162. Cabrita, R. *et al.* Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature* **577**, 561–565 (2020).
163. Fridman, W. H. *et al.* B cells and tertiary lymphoid structures as determinants of tumour immune contexture and clinical outcome. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **19**, 441–457 (2022).
164. Bod, L. *et al.* B-cell-specific checkpoint molecules that regulate anti-tumour immunity. *Nature* (2023) doi:10.1038/s41586-023-06231-0.
165. Schumacher, T. N. & Thommen, D. S. Tertiary lymphoid structures in cancer. *Science* **375**, eabf9419 (2022).
166. Hiraoka, N. *et al.* Intratumoral tertiary lymphoid organ is a favourable prognosticator in patients with pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* **112**, 1782–1790 (2015).
167. Goc, J., Fridman, W.-H., Hammond, S. A., Sautès-Fridman, C. & Dieu-Nosjean, M.-C. Tertiary lymphoid structures in human lung cancers, a new driver of antitumor immune responses. *OncoImmunology* **3**, e28976 (2014).
168. Posch, F. *et al.* Maturation of tertiary lymphoid structures and recurrence of stage II and III colorectal cancer. *OncoImmunology* **7**, e1378844 (2018).
169. Vanhersecke, L. *et al.* Mature tertiary lymphoid structures predict immune checkpoint inhibitor efficacy in solid tumors independently of PD-L1 expression. *Nat. Cancer* **2**, 794–802 (2021).

170. Vella, G., Hua, Y. & Bergers, G. High endothelial venules in cancer: Regulation, function, and therapeutic implication. *Cancer Cell* **41**, 527–545 (2023).
171. Shankaran, V. *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **410**, (2001).
172. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565–1570 (2011).
173. Restifo, N. P. *et al.* Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J. Exp. Med.* **177**, 265–272 (1993).
174. Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., Uchida, Y. & Toge, T. The role of Fas ligand and transforming growth factor β in tumor progression: Molecular mechanisms of immune privilege via Fas-mediated apoptosis and potential targets for cancer therapy. *Cancer* **100**, 2281–2291 (2004).
175. Iwai, Y. *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12293–12297 (2002).
176. Xu, R. *et al.* Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements in cancer care. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 617–638 (2018).
177. Krummel, M. F. & Allison, J. P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* **182**, 459–465 (1995).
178. Leach, D. R., Krummel, M. F. & Allison, J. P. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science* **271**, 1734–1736 (1996).
179. Sharma, P. *et al.* The Next Decade of Immune Checkpoint Therapy. *Cancer Discov.* **11**, 838–857 (2021).
180. Brunet, J.-F. *et al.* A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature* **328**, 267–270 (1987).
181. Phan, G. Q. *et al.* Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 8372–8377 (2003).
182. Hodi, F. S. *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**, 711–723 (2010).
183. Robert, C. *et al.* Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2517–2526 (2011).
184. Linsley, P. S. *et al.* CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* **174**, 561–569 (1991).
185. Linsley, P. S. *et al.* Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* **1**, 793–801 (1994).
186. van der Merwe, P. A., Bodian, D. L., Daenke, S., Linsley, P. & Davis, S. J. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J. Exp. Med.* **185**, 393–403 (1997).
187. Waterhouse, P. *et al.* Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science* **270**, 985–988 (1995).
188. Tivol, E. A. *et al.* Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* **3**, 541–547 (1995).
189. Gavin, M. A. *et al.* Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* **445**, 771–775 (2007).
190. Corse, E. & Allison, J. P. Cutting edge: CTLA-4 on effector T cells inhibits in trans. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 1123–1127 (2012).

191. Qureshi, O. S. *et al.* Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4. *Science* **332**, 600–603 (2011).
192. Tekguc, M., Wing, J. B., Osaki, M., Long, J. & Sakaguchi, S. Treg-expressed CTLA-4 depletes CD80/CD86 by trogocytosis, releasing free PD-L1 on antigen-presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, e2023739118 (2021).
193. Grohmann, U. *et al.* CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* **3**, 1097–1101 (2002).
194. Magistrelli, G. *et al.* A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3596–3602 (1999).
195. Sondak, V. K., Smalley, K. S. M., Kudchadkar, R., Gripton, S. & Kirkpatrick, P. Ipilimumab. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 411–412 (2011).
196. European Medicines Agency. Yervoy - Résumé des caractéristiques du produit - https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/yervoy-epar-product-information_fr.pdf, consulté le 07/08/23.
197. Ramagopal, U. A. *et al.* Structural basis for cancer immunotherapy by the first-in-class checkpoint inhibitor ipilimumab. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, (2017).
198. Marangoni, F. *et al.* Expansion of tumor-associated Treg cells upon disruption of a CTLA-4-dependent feedback loop. *Cell* **184**, 3998-4015.e19 (2021).
199. Fehlings, M. *et al.* Checkpoint blockade immunotherapy reshapes the high-dimensional phenotypic heterogeneity of murine intratumoural neoantigen-specific CD8⁺ T cells. *Nat. Commun.* **8**, 562 (2017).
200. Wei, S. C. *et al.* Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. *Cell* **170**, 1120-1133.e17 (2017).
201. Robert, L. *et al.* CTLA4 Blockade Broadens the Peripheral T-Cell Receptor Repertoire. *Clin. Cancer Res.* **20**, 2424–2432 (2014).
202. Cha, E. *et al.* Improved Survival with T Cell Clonotype Stability After Anti-CTLA-4 Treatment in Cancer Patients. *Sci. Transl. Med.* **6**, (2014).
203. Kvistborg, P. *et al.* Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8⁺ T cell response. *Sci. Transl. Med.* **6**, (2014).
204. Oh, D. Y. *et al.* Immune Toxicities Elicited by CTLA-4 Blockade in Cancer Patients Are Associated with Early Diversification of the T-cell Repertoire. *Cancer Res.* **77**, 1322–1330 (2017).
205. Sharma, A. *et al.* Anti-CTLA-4 Immunotherapy Does Not Deplete FOXP3⁺ Regulatory T Cells (Tregs) in Human Cancers. *Clin. Cancer Res.* **25**, 1233–1238 (2019).
206. Quezada, S. A. & Peggs, K. S. Lost in Translation: Deciphering the Mechanism of Action of Anti-human CTLA-4. *Clin. Cancer Res.* **25**, 1130–1132 (2019).
207. Arce Vargas, F. *et al.* Fc Effector Function Contributes to the Activity of Human Anti-CTLA-4 Antibodies. *Cancer Cell* **33**, 649-663.e4 (2018).
208. Yofe, I. *et al.* Anti-CTLA-4 antibodies drive myeloid activation and reprogram the tumor microenvironment through FcγR engagement and type I interferon signaling. *Nat. Cancer* (2022) doi:10.1038/s43018-022-00447-1.
209. 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).
210. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141–151 (1999).
211. Nishimura, H. *et al.* Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* **291**, 319–322 (2001).

212. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. & Chen, L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* **5**, 1365–1369 (1999).
213. Freeman, G. J. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **192**, 1027–1034 (2000).
214. Latchman, Y. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* **2**, 261–268 (2001).
215. Tseng, S. Y. *et al.* B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J. Exp. Med.* **193**, 839–846 (2001).
216. Dong, H. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* **8**, 793–800 (2002).
217. 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).
218. Sharpe, A. H. & Pauken, K. E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 153–167 (2018).
219. Keir, M. E. *et al.* Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med.* **203**, 883–895 (2006).
220. Zinselmeyer, B. H. *et al.* PD-1 promotes immune exhaustion by inducing antiviral T cell motility paralysis. *J. Exp. Med.* **210**, 757–774 (2013).
221. Damo, M. *et al.* PD-1 maintains CD8 T cell tolerance towards cutaneous neoantigens. *Nature* **619**, 151–159 (2023).
222. European Medicines Agency. Opdivo - Résumé des caractéristiques du produit - https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/opdivo-epar-product-information_fr.pdf, consulté le 07/08/23.
223. 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).
224. European Medicines Agency. Keytruda - Résumé des caractéristiques du produit - https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/keytruda-epar-product-information_fr.pdf, consulté le 07/08/23.
225. Pauken, K. E. *et al.* Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science* **354**, 1160–1165 (2016).
226. Ghoneim, H. E. *et al.* De Novo Epigenetic Programs Inhibit PD-1 Blockade-Mediated T Cell Rejuvenation. *Cell* **170**, 142–157.e19 (2017).
227. Philip, M. *et al.* Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature* **545**, 452–456 (2017).
228. Pai, J. A. *et al.* Lineage tracing reveals clonal progenitors and long-term persistence of tumor-specific T cells during immune checkpoint blockade. *Cancer Cell* **41**, 776–790.e7 (2023).
229. Spitzer, M. H. *et al.* Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. *Cell* **168**, 487–502.e15 (2017).
230. Balança, C.-C. *et al.* PD-1 blockade restores helper activity of tumor-infiltrating, exhausted PD-1hiCD39+ CD4 T cells. *JCI Insight* **6**, e142513 (2021).
231. Kamada, T. *et al.* PD-1⁺ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 9999–10008 (2019).
232. Geels, S. N. *et al.* Interruption of the Intratumor CD8:Treg Crosstalk Improves the Efficacy of PD-1 Immunotherapy. *BioRxiv Prepr. Serv. Biol.* 2023.05.15.540889 (2023) doi:10.1101/2023.05.15.540889.

233. Hsu, J. *et al.* Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade. *J. Clin. Invest.* **128**, 4654–4668 (2018).
234. Kleffel, S. *et al.* Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth. *Cell* **162**, 1242–1256 (2015).
235. Curran, M. A., Montalvo, W., Yagita, H. & Allison, J. P. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 4275–4280 (2010).
236. Wolchok, J. D. *et al.* Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **369**, 122–133 (2013).
237. Olson, D. J. *et al.* Pembrolizumab Plus Ipilimumab Following Anti-PD-1/L1 Failure in Melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **39**, 2647–2655 (2021).
238. Sullivan, R. J. *et al.* An update on the Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumor immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma: version 2.0. *J. Immunother. Cancer* **6**, 44 (2018).
239. Marin-Acevedo, J. A., Kimbrough, E. O. & Lou, Y. Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond. *J. Hematol. Oncol.* **14**, 45 (2021).
240. Kraehenbuehl, L., Weng, C.-H., Eghbali, S., Wolchok, J. D. & Merghoub, T. Enhancing immunotherapy in cancer by targeting emerging immunomodulatory pathways. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* (2021) doi:10.1038/s41571-021-00552-7.
241. Sharma, P. *et al.* Immune checkpoint therapy—current perspectives and future directions. *Cell* **186**, 1652–1669 (2023).
242. Tawbi, H. A. *et al.* Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **386**, 24–34 (2022).
243. Cho, B. C. *et al.* Tiragolumab plus atezolizumab versus placebo plus atezolizumab as a first-line treatment for PD-L1-selected non-small-cell lung cancer (CITYSCAPE): primary and follow-up analyses of a randomised, double-blind, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **23**, 781–792 (2022).
244. Mullard, A. Roche’s anti-TIGIT drug suffers a phase III cancer setback. *Nat. Rev. Drug Discov.* **21**, 327–327 (2022).
245. Wolf, Y., Anderson, A. C. & Kuchroo, V. K. TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 173–185 (2020).
246. Postow, M. A., Sidlow, R. & Hellmann, M. D. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N. Engl. J. Med.* **378**, 158–168 (2018).
247. Dougan, M., Luoma, A. M., Dougan, S. K. & Wucherpfennig, K. W. Understanding and treating the inflammatory adverse events of cancer immunotherapy. *Cell* S0092867421001616 (2021) doi:10.1016/j.cell.2021.02.011.
248. Larkin, J. *et al.* Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **381**, 1535–1546 (2019).
249. Wang, S. J., Dougan, S. K. & Dougan, M. Immune mechanisms of toxicity from checkpoint inhibitors. *Trends Cancer* **9**, 543–553 (2023).
250. Haanen, J. *et al.* Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **33**, 1217–1238 (2022).
251. Chen, D. S. & Mellman, I. Elements of cancer immunity and the cancer–immune set point. *Nature* **541**, 321–330 (2017).
252. Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A. & Ribas, A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* **168**, 707–723 (2017).
253. Chhabra, Y. & Weeraratna, A. T. Fibroblasts in cancer: Unity in heterogeneity. *Cell* **186**, 1580–1609 (2023).

254. Shin, D. S. *et al.* Primary Resistance to PD-1 Blockade Mediated by *JAK1/2* Mutations. *Cancer Discov.* **7**, 188–201 (2017).
255. Zaretsky, J. M. *et al.* Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **375**, 819–829 (2016).
256. Landsberg, J. *et al.* Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* **490**, 412–416 (2012).
257. Khazen, R. *et al.* Melanoma cell lysosome secretory burst neutralizes the CTL-mediated cytotoxicity at the lytic synapse. *Nat. Commun.* **7**, 10823 (2016).
258. Kersten, K. *et al.* Spatiotemporal co-dependency between macrophages and exhausted CD8⁺ T cells in cancer. *Cancer Cell* **40**, 624–638.e9 (2022).
259. Arlauckas, S. P. *et al.* In vivo imaging reveals a tumor-associated macrophage-mediated resistance pathway in anti-PD-1 therapy. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaal3604 (2017).
260. Doherty, J. R. & Cleveland, J. L. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J. Clin. Invest.* **123**, 3685–3692 (2013).
261. Bayerl, F. *et al.* Tumor-derived prostaglandin E2 programs cDC1 dysfunction to impair intratumoral orchestration of anti-cancer T cell responses. *Immunity* **56**, 1341–1358.e11 (2023).
262. Mándi, Y. & Vécsei, L. The kynurenine system and immunoregulation. *J. Neural Transm.* **119**, 197–209 (2012).
263. Yan, C. *et al.* Exhaustion-associated cholesterol deficiency dampens the cytotoxic arm of antitumor immunity. *Cancer Cell* **41**, 1276–1293.e11 (2023).
264. Mrad, M. *et al.* Downregulation of sphingosine kinase-1 induces protective tumor immunity by promoting M1 macrophage response in melanoma. *Oncotarget* **7**, 71873–71886 (2016).
265. Imbert, C. *et al.* Resistance of melanoma to immune checkpoint inhibitors is overcome by targeting the sphingosine kinase-1. *Nat. Commun.* **11**, 437 (2020).
266. Trajkovic, K. *et al.* Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science* **319**, 1244–1247 (2008).
267. Poggio, M. *et al.* Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. *Cell* **177**, 414–427.e13 (2019).
268. Montfort, A. *et al.* Neutral Sphingomyelinase 2 Heightens Anti-Melanoma Immune Responses and Anti-PD-1 Therapy Efficacy. *Cancer Immunol. Res.* **9**, 568–582 (2021).
269. Ansaldo, E., Farley, T. K. & Belkaid, Y. Control of Immunity by the Microbiota. *Annu. Rev. Immunol.* **39**, 449–479 (2021).
270. Zheng, D., Liwinski, T. & Elinav, E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res.* **30**, 492–506 (2020).
271. Sivan, A. *et al.* Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* **350**, 1084–1089 (2015).
272. Vétizou, M. *et al.* Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *7*.
273. Routy, B. *et al.* Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* **359**, 91–97 (2018).
274. Gopalakrishnan, V. *et al.* Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* **359**, 97–103 (2018).
275. Matson, V. *et al.* The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* **359**, 104–108 (2018).
276. Simpson, R. C. *et al.* Diet-driven microbial ecology underpins associations between cancer immunotherapy outcomes and the gut microbiome. *Nat. Med.* (2022) doi:10.1038/s41591-022-01965-2.

277. Baruch, E. N. *et al.* Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. *Science* **371**, 602–609 (2021).
278. Davar, D. *et al.* Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. *Science* **371**, 595–602 (2021).
279. Fidelle, M. *et al.* A microbiota-modulated checkpoint directs immunosuppressive intestinal T cells into cancers. *Science* **380**, eabo2296 (2023).
280. Hu, Z. I. *et al.* Immune checkpoint inhibitors unleash pathogenic immune responses against the microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **119**, e2200348119 (2022).
281. McCulloch, J. A. Intestinal microbiota signatures of clinical response and immune-related adverse events in melanoma patients treated with anti-PD-1. *Nat. Med.* **28**, 35 (2022).
282. Andrews, M. C. *et al.* Gut microbiota signatures are associated with toxicity to combined CTLA-4 and PD-1 blockade. *Nat. Med.* (2021) doi:10.1038/s41591-021-01406-6.
283. Halsey, T. M. *et al.* Microbiome alteration via fecal microbiota transplantation is effective for refractory immune checkpoint inhibitor-induced colitis. *Sci. Transl. Med.* **15**, eabq4006 (2023).
284. Dizman, N. *et al.* Nivolumab plus ipilimumab with or without live bacterial supplementation in metastatic renal cell carcinoma: a randomized phase 1 trial. *Nat. Med.* **28**, 704–712 (2022).
285. Routy, B. *et al.* Fecal microbiota transplantation plus anti-PD-1 immunotherapy in advanced melanoma: a phase I trial. *Nat. Med.* (2023) doi:10.1038/s41591-023-02453-x.
286. Chen, Y. E. *et al.* Engineered skin bacteria induce antitumor T cell responses against melanoma. (2023).
287. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **12**, 31–46 (2022).
288. Garbe, C. *et al.* Neoadjuvant immunotherapy for melanoma is now ready for clinical practice. *Nat. Med.* (2023) doi:10.1038/s41591-023-02336-1.
289. Blank, C. U. *et al.* Neoadjuvant versus adjuvant ipilimumab plus nivolumab in macroscopic stage III melanoma. *Nat. Med.* **24**, 1655–1661 (2018).
290. Patel, S. P. *et al.* Neoadjuvant–Adjuvant or Adjuvant-Only Pembrolizumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **388**, 813–823 (2023).
291. Menzies, A. M. *et al.* Pathological response and survival with neoadjuvant therapy in melanoma: a pooled analysis from the International Neoadjuvant Melanoma Consortium (INMC). *Nat. Med.* **27**, 301–309 (2021).
292. Rojas, L. A. *et al.* Personalized RNA neoantigen vaccines stimulate T cells in pancreatic cancer. *Nature* (2023) doi:10.1038/s41586-023-06063-y.
293. mRNA Vaccine Slows Melanoma Recurrence. *Cancer Discov.* **13**, 1278–1278 (2023).
294. Labanieh, L. & Mackall, C. L. CAR immune cells: design principles, resistance and the next generation. *Nature* **614**, 635–648 (2023).
295. Lybaert, L. *et al.* Neoantigen-directed therapeutics in the clinic: where are we? *Trends Cancer* **9**, 503–519 (2023).
296. Larson, R. C. *et al.* CAR T cell killing requires the IFN γ R pathway in solid but not liquid tumours. *Nature* **604**, 563–570 (2022).
297. Kim, G. B. *et al.* Quantitative immunopeptidomics reveals a tumor stroma-specific target for T cell therapy. *Sci. Transl. Med.* **14**, eabo6135 (2022).
298. Dolgin, E. Personalized cancer vaccines pass first major clinical test. *Nat. Rev. Drug Discov.* **22**, 607–609 (2023).
299. Brinkmann, U. & Kontermann, R. E. Bispecific antibodies. *Science* **372**, 916–917 (2021).
300. Mullard, A. Trispecific antibodies take to the clinic. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 657–658 (2020).

301. Wu, L. *et al.* Trispecific antibodies enhance the therapeutic efficacy of tumor-directed T cells through T cell receptor co-stimulation. *Nat. Cancer* **1**, 86–98 (2020).
302. Szijj, P. A. *et al.* Chemical generation of checkpoint inhibitory T cell engagers for the treatment of cancer. *Nat. Chem.* (2023) doi:10.1038/s41557-023-01280-4.
303. Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860–867 (2002).
304. Propper, D. J. & Balkwill, F. R. Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* (2022) doi:10.1038/s41571-021-00588-9.
305. Perez-Ruiz, E. *et al.* Prophylactic TNF blockade uncouples efficacy and toxicity in dual CTLA-4 and PD-1 immunotherapy. *Nature* **569**, 428–432 (2019).
306. Hailemichael, Y. *et al.* Interleukin-6 blockade abrogates immunotherapy toxicity and promotes tumor immunity. *Cancer Cell* **40**, 509–523.e6 (2022).
307. Salomon, B. L. Insights into the biology and therapeutic implications of TNF and regulatory T cells. *Nat. Rev. Rheumatol.* (2021) doi:10.1038/s41584-021-00639-6.
308. Balkwill, F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11** (2009).
309. Montfort, A. *et al.* The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. *Front. Immunol.* **10**, 1818 (2019).
310. Chen, A. Y., Wolchok, J. D. & Bass, A. R. TNF in the era of immune checkpoint inhibitors: friend or foe? *Nat. Rev. Rheumatol.* (2021) doi:10.1038/s41584-021-00584-4.
311. Dobosz, P. & Dzieciatkowski, T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **10**, 2965 (2019).
312. THE TREATMENT OF MALIGNANT TUMORS BY INOCULATIONS OF ERYSIPELAS. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **XX**, 615 (1893).
313. Carswell, E. A. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 3666–3670 (1975).
314. Gamm, H., Lindemann, A., Mertelsmann, R. & Herrmann, F. Phase I Trial of Recombinant Human Tumour Necrosis Factor α in Patients with Advanced Malignancy.
315. Kalliolias, G. D. & Ivashkiv, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat. Rev. Rheumatol.* **12**, 49–62 (2016).
316. Dostert, C., Grusdat, M., Letellier, E. & Brenner, D. The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond. *Physiol. Rev.* **99**, 115–160 (2019).
317. Collette, Y., Gilles, A., Pontarotti, P. & Olive, D. A co-evolution perspective of the TNFSF and TNFRSF families in the immune system. *Trends Immunol.* **24**, 387–394 (2003).
318. Black, R. A. *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* **385**, 729–733 (1997).
319. Atretkhany, K.-S. N., Gogoleva, V. S., Drutskaya, M. S. & Nedospasov, S. A. Distinct modes of TNF signaling through its two receptors in health and disease. *J. Leukoc. Biol.* **107**, 893–905 (2020).
320. Grell, M. *et al.* The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **83**, 793–802 (1995).
321. Jiang, Y., Woronicz, J. D., Liu, W. & Goeddel, D. V. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* **283**, 543–546 (1999).
322. Winston, J. T. *et al.* The SCF β -TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in Ikappa B α and β -catenin and stimulates Ikappa B α ubiquitination in vitro. *Genes Dev.* **13**, 270–283 (1999).
323. Micheau, O. & Tschopp, J. Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell* **114**, 181–190 (2003).

324. Twu, Y.-C., Gold, M. R. & Teh, H.-S. TNFR1 delivers pro-survival signals that are required for limiting TNFR2-dependent activation-induced cell death (AICD) in CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* **41**, 335–344 (2011).
325. Kirchner, S. *et al.* LPS resistance in monocytic cells caused by reverse signaling through transmembrane TNF (mTNF) is mediated by the MAPK/ERK pathway. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 324–331 (2004).
326. Zhang, H. *et al.* Transmembrane TNF-alpha mediates 'forward' and 'reverse' signaling, inducing cell death or survival via the NF-kappaB pathway in Raji Burkitt lymphoma cells. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 789–797 (2008).
327. Granger, G. A. & Kolb, W. P. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: mechanisms of immune and non-immune small lymphocyte mediated target L cell destruction. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **101**, 111–120 (1968).
328. Williams, T. W. & Granger, G. A. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: lymphotoxins of several mammalian species. *Nature* **219**, 1076–1077 (1968).
329. Aggarwal, B. B., Moffat, B. & Harkins, R. N. Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J. Biol. Chem.* **259**, 686–691 (1984).
330. Ruddle, N. H. Lymphotoxin and TNF: How it all began—A tribute to the travelers. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 83–89 (2014).
331. Asrir, A. *et al.* Tumor-associated high endothelial venules mediate lymphocyte entry into tumors and predict response to PD-1 plus CTLA-4 combination immunotherapy. *Cancer Cell* S1535610822000046 (2022) doi:10.1016/j.ccell.2022.01.002.
332. Hua, Y. *et al.* Cancer immunotherapies transition endothelial cells into HEVs that generate TCF1+ T lymphocyte niches through a feed-forward loop. *Cancer Cell* **40**, 1600-1618.e10 (2022).
333. Lukacs, N. W., Strieter, R. M., Chensue, S. W., Widmer, M. & Kunkel, S. L. TNF-alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. *J. Immunol.* **154**, 5411–5417 (1995).
334. Rampart, M., De Smet, W., Fiers, W. & Herman, A. G. Inflammatory properties of recombinant tumor necrosis factor in rabbit skin in vivo. *J. Exp. Med.* **169**, 2227–2232 (1989).
335. Venkatesh, D. *et al.* Endothelial TNF receptor 2 induces IRF1 transcription factor-dependent interferon- β autocrine signaling to promote monocyte recruitment. *Immunity* **38**, 1025–1037 (2013).
336. Briscoe, D. M., Cotran, R. S. & Pober, J. S. Effects of tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vivo. Correlation with CD3+ T cell infiltration. *J. Immunol.* **149**, 2954–2960 (1992).
337. Ding, X. *et al.* TNF Receptor 1 Mediates Dendritic Cell Maturation and CD8 T Cell Response through Two Distinct Mechanisms. *J. Immunol.* **187**, 1184–1191 (2011).
338. Bachus, H. *et al.* Impaired Tumor-Necrosis-Factor- α -driven Dendritic Cell Activation Limits Lipopolysaccharide-Induced Protection from Allergic Inflammation in Infants. *Immunity* **50**, 225-240.e4 (2019).
339. Chatzidakis, I., Fousteri, G., Tsoukatou, D., Kollias, G. & Mamalaki, C. An Essential Role for TNF in Modulating Thresholds for Survival, Activation, and Tolerance of CD8+ T Cells. *J. Immunol.* **178**, 6735–6745 (2007).
340. Kim, E. Y. & Teh, H.-S. TNF Type 2 Receptor (p75) Lowers the Threshold of T Cell Activation. *J. Immunol.* **167**, 6812–6820 (2001).
341. Ratner, A. & Clark, W. R. Role of TNF-alpha in CD8+ cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis. *J. Immunol.* **150**, 4303–4314 (1993).

342. Caron, G. *et al.* Human NK cells constitutively express membrane TNF-alpha (mTNFalpha) and present mTNFalpha-dependent cytotoxic activity. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3588–3595 (1999).
343. Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V. & Kollias, G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J. Exp. Med.* **184**, 1397–1411 (1996).
344. Park, S. H., Park-Min, K.-H., Chen, J., Hu, X. & Ivashkiv, L. B. Tumor necrosis factor induces GSK3 kinase-mediated cross-tolerance to endotoxin in macrophages. *Nat. Immunol.* **12**, 607–615 (2011).
345. Zakharova, M. & Ziegler, H. K. Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF-alpha: inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 5024–5033 (2005).
346. Yarilina, A., Park-Min, K.-H., Antoniv, T., Hu, X. & Ivashkiv, L. B. TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes. *Nat. Immunol.* **9**, 378–387 (2008).
347. Park, S. H. *et al.* Type I interferons and the cytokine TNF cooperatively reprogram the macrophage epigenome to promote inflammatory activation. *Nat. Immunol.* **18**, 1104–1116 (2017).
348. Kusnadi, A. *et al.* The Cytokine TNF Promotes Transcription Factor SREBP Activity and Binding to Inflammatory Genes to Activate Macrophages and Limit Tissue Repair. *Immunity* **51**, 241-257.e9 (2019).
349. Hu, X. *et al.* Transmembrane TNF- α Promotes Suppressive Activities of Myeloid-Derived Suppressor Cells via TNFR2. *J. Immunol.* **192**, 1320–1331 (2014).
350. Chavez-Galan, L. *et al.* Transmembrane Tumor Necrosis Factor Controls Myeloid-Derived Suppressor Cell Activity via TNF Receptor 2 and Protects from Excessive Inflammation during BCG-Induced Pleurisy. *Front. Immunol.* **8**, 999 (2017).
351. Zhao, X. *et al.* TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J. Clin. Invest.* **122**, 4094–4104 (2012).
352. Sade-Feldman, M. *et al.* Tumor necrosis factor- α blocks differentiation and enhances suppressive activity of immature myeloid cells during chronic inflammation. *Immunity* **38**, 541–554 (2013).
353. Raveney, B. J. E., Copland, D. A., Dick, A. D. & Nicholson, L. B. TNFR1-dependent regulation of myeloid cell function in experimental autoimmune uveoretinitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 2321–2329 (2009).
354. Olivera, I. *et al.* A Therapeutically Actionable Protumoral Axis of Cytokines Involving IL-8, TNFa, and IL-1b. 18.
355. Alfaro, C. *et al.* Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts Human Myeloid-Derived Suppressor Cells and Elicits Extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs). *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **22**, 3924–3936 (2016).
356. Chen, X., Bäuml, M., Männel, D. N., Zack, O. M. & Oppenheim, J. J. Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion and Function of Mouse CD4+CD25+ T Regulatory Cells. *J. Immunol.* **9**.
357. Okubo, Y., Mera, T., Wang, L. & Faustman, D. L. Homogeneous Expansion of Human T-Regulatory Cells Via Tumor Necrosis Factor Receptor 2. *Sci. Rep.* **11**.
358. Lubrano Di Ricco, M. *et al.* Tumor necrosis factor receptor family costimulation increases regulatory T-cell activation and function via NF- κ B. *Eur. J. Immunol.* **50**, 972–985 (2020).

359. Nagar, M. *et al.* TNF activates a NF-kappaB-regulated cellular program in human CD45RA- regulatory T cells that modulates their suppressive function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 3570–3581 (2010).
360. Nguyen, D. X. & Ehrenstein, M. R. Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF–TNF-RII binding in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **213**, 1241–1253 (2016).
361. Chen, X. *et al.* TNFR2 Is Critical for the Stabilization of the CD4⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cell Phenotype in the Inflammatory Environment. *J. Immunol.* **190**, 1076–1084 (2013).
362. Urbano, P. C. M., Koenen, H. J. P. M., Joosten, I. & He, X. An Autocrine TNF α –Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Loop Promotes Epigenetic Effects Inducing Human Treg Stability In Vitro. *Front. Immunol.* **9**, 573 (2018).
363. Valencia, X. *et al.* TNF downmodulates the function of human CD4²CD25^{hi} T-regulatory cells. **108**, (2006).
364. Stoop, J. N. *et al.* Tumor necrosis factor alpha inhibits the suppressive effect of regulatory T cells on the hepatitis B virus-specific immune response. *Hepatology. Baltim. Md* **46**, 699–705 (2007).
365. Hamano, R., Huang, J., Yoshimura, T., Oppenheim, J. J. & Chen, X. TNF optimally activates regulatory T cells by inducing TNF receptor superfamily members TNFR2, 4-1BB and OX40. *Eur. J. Immunol.* **41**, 2010–2020 (2011).
366. Zaragoza, B. *et al.* Suppressive activity of human regulatory T cells is maintained in the presence of TNF. *Nat. Med.* **22**, 16–17 (2016).
367. Chen, X. *et al.* Cutting Edge: Expression of TNFR2 Defines a Maximally Suppressive Subset of Mouse CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T Regulatory Cells: Applicability to Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells. **6**.
368. Brunkow, M. E. *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* **27**, 68–73 (2001).
369. Mahmud, S. A. *et al.* Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **15**, 11 (2014).
370. Zhang, Q. *et al.* TNF- α impairs differentiation and function of TGF- β -induced Treg cells in autoimmune diseases through Akt and Smad3 signaling pathway. *J. Mol. Cell Biol.* **5**, 85–98 (2013).
371. Nadkarni, S., Mauri, C. & Ehrenstein, M. R. Anti–TNF- α therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- β . *J. Exp. Med.* **204**, 33–39 (2007).
372. Cope, A. P. *et al.* Chronic Tumor Necrosis Factor Alters T Cell Responses by Attenuating T Cell Receptor Signaling. *J. Exp. Med.* **185**, 1573–1584 (1997).
373. Aspalter, R. M., Wolf, H. M. & Eibl, M. M. Chronic TNF- α exposure impairs TCR-signaling via TNF-RII but not TNF-RI. *Cell. Immunol.* **237**, 55–67 (2005).
374. Beyer, M. *et al.* Tumor-necrosis factor impairs CD4⁺ T cell-mediated immunological control in chronic viral infection. *Nat. Immunol.* **17**, 593–603 (2016).
375. Zheng, L., Fisher, G., Millert, R. E., Peschont, J. & Lynch, D. H. Induction of apoptosis in mature T cells. **377**, (1995).
376. Qin, H.-Y. In vivo apoptosis of diabetogenic T cells in NOD mice by IFN- γ /TNF- α . *Int. Immunol.* **16**, 1723–1732 (2004).
377. Otano, I. *et al.* Human CD8 T cells are susceptible to TNF-mediated activation-induced cell death. *Theranostics* **10**, 4481–4489 (2020).

378. Keffer, J. *et al.* Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* **10**, 4025–4031 (1991).
379. Powrie, F. *et al.* Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* **1**, 553–562 (1994).
380. Jang, D. *et al.* The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 2719 (2021).
381. Li, Z. *et al.* Reciprocal changes of Foxp3 expression in blood and intestinal mucosa in IBD patients responding to infliximab†: *Inflamm. Bowel Dis.* **16**, 1299–1310 (2010).
382. Pennica, D. *et al.* Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**, 724–729 (1984).
383. Brouckaert, P. G., Leroux-Roels, G. G., Guisez, Y., Tavernier, J. & Fiers, W. In vivo anti-tumour activity of recombinant human and murine TNF, alone and in combination with murine IFN-gamma, on a syngeneic murine melanoma. *Int. J. Cancer* **38**, 763–769 (1986).
384. Balkwill, F. R. *et al.* Human tumor xenografts treated with recombinant human tumor necrosis factor alone or in combination with interferons. *Cancer Res.* **46**, 3990–3993 (1986).
385. Kettelhut, I. C., Fiers, W. & Goldberg, A. L. The toxic effects of tumor necrosis factor in vivo and their prevention by cyclooxygenase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 4273–4277 (1987).
386. Havell, E. A., Fiers, W. & North, R. J. The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF), I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity. *J. Exp. Med.* **167**, 1067–1085 (1988).
387. Selby, P. *et al.* Tumour necrosis factor in man: clinical and biological observations. *Br. J. Cancer* **56**, 803–808 (1987).
388. Kimura, K. *et al.* Phase I study of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **20**, 223–229 (1987).
389. Creagan, E. T., Kovach, J. S., Moertel, C. G., Frytak, S. & Kvols, L. K. A phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer* **62**, 2467–2471 (1988).
390. Grünhagen, D. J., De Wilt, J. H., Ten Hagen, T. L. & Eggermont, A. M. Technology Insight: utility of TNF- α -based isolated limb perfusion to avoid amputation of irresectable tumors of the extremities. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **3**, 94–103 (2006).
391. Lienard, D., Ewalenko, P., Delmotte, J. J., Renard, N. & Lejeune, F. J. High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **10**, 52–60 (1992).
392. Nooijen, P. T. *et al.* Synergistic effects of TNF-alpha and melphalan in an isolated limb perfusion model of rat sarcoma: a histopathological, immunohistochemical and electron microscopical study. *Br. J. Cancer* **74**, 1908–1915 (1996).
393. van der Veen, A. H. *et al.* TNF-alpha augments intratumoural concentrations of doxorubicin in TNF-alpha-based isolated limb perfusion in rat sarcoma models and enhances anti-tumour effects. *Br. J. Cancer* **82**, 973–980 (2000).
394. Probst, P. *et al.* Sarcoma Eradication by Doxorubicin and Targeted TNF Relies upon CD8+ T-cell Recognition of a Retroviral Antigen. *Cancer Res.* **77**, 3644–3654 (2017).
395. Look, T. *et al.* Targeted delivery of tumor necrosis factor in combination with CCNU induces a T cell-dependent regression of glioblastoma. *Sci. Transl. Med.* **15**, eadf2281 (2023).

396. Fräter-Schröder, M., Risau, W., Hallmann, R., Gautschi, P. & Böhlen, P. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 5277–5281 (1987).
397. Leibovich, S. J., Polverini, P. J., Shepard, H. M., Shively, V. & Nuseir, N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor- α . (1987).
398. Li, B. *et al.* Low Levels of Tumor Necrosis Factor Increase Tumor Growth by Inducing an Endothelial Phenotype of Monocytes Recruited to the Tumor Site. *Cancer Res.* **69**, 338–348 (2009).
399. Fajardo, L. F., Kwan, H. H., Kowalski, J., Prionas, S. D. & Allison, A. C. Dual role of tumor necrosis factor- α in angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **140**, 539–544 (1992).
400. Sasi, S. P. *et al.* Breaking the ‘harmony’ of TNF- α signaling for cancer treatment. *Oncogene* **31**, 4117–4127 (2012).
401. Rubin, B. Y. *et al.* Nonhematopoietic cells selected for resistance to tumor necrosis factor produce tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **164**, 1350–1355 (1986).
402. Krönke, M. *et al.* Tumor necrosis factor and lymphotoxin gene expression in human tumor cell lines. *Cancer Res.* **48**, 5417–5421 (1988).
403. Spriggs, D., Imamura, K., Rodriguez, C., Horiguchi, J. & Kufe, D. W. Induction of tumor necrosis factor expression and resistance in a human breast tumor cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 6563–6566 (1987).
404. Beissert, S. *et al.* Regulation of tumor necrosis factor gene expression in colorectal adenocarcinoma: in vivo analysis by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 5064–5068 (1989).
405. Naylor, M. S., Malik, S. T., Stamp, G. W., Jobling, T. & Balkwill, F. R. In situ detection of tumour necrosis factor in human ovarian cancer specimens. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **26**, 1027–1030 (1990).
406. Naylor, M. S., Stamp, G. W., Foulkes, W. D., Eccles, D. & Balkwill, F. R. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *J. Clin. Invest.* **91**, 2194–2206 (1993).
407. Ardizzoia, A. *et al.* Tumor necrosis factor in solid tumors: increased blood levels in the metastatic disease. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **6**, 103–107 (1992).
408. Michalaki, V., Syrigos, K., Charles, P. & Waxman, J. Serum levels of IL-6 and TNF- α correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br. J. Cancer* **90**, 2312–2316 (2004).
409. Malik, S. T. A., Stuart Naylor, M., East, N., Oliff, A. & Balkwill, F. R. Cells secreting tumour necrosis factor show enhanced metastasis in nude mice. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **26**, 1031–1034 (1990).
410. Orosz, P. *et al.* Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **177**, 1391–1398 (1993).
411. Okahara, H., Yagita, H., Miyake, K. & Okumura, K. Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis. *Cancer Res.* **54**, 3233–3236 (1994).
412. Moore, R. J. *et al.* Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. *Nat. Med.* **5**, 828–831 (1999).
413. Starcher, B. Role for tumour necrosis factor- α receptors in ultraviolet-induced skin tumours. *Br. J. Dermatol.* **142**, 1140–1147 (2000).
414. Komori, A. *et al.* Tumor necrosis factor acts as a tumor promoter in BALB/3T3 cell transformation. *Cancer Res.* **53**, 1982–1985 (1993).
415. Li, J. *et al.* TNF- α induces leukemic clonal evolution ex vivo in Fanconi anemia group C murine stem cells. *J. Clin. Invest.* **117**, 3283–3295 (2007).

416. Yan, B. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation. *Cancer Res.* **66**, 11565–11570 (2006).
417. Babbar, N. & Casero, R. A. Tumor necrosis factor-alpha increases reactive oxygen species by inducing spermine oxidase in human lung epithelial cells: a potential mechanism for inflammation-induced carcinogenesis. *Cancer Res.* **66**, 11125–11130 (2006).
418. Popivanova, B. K. *et al.* Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J. Clin. Invest.* **118**, 560–570 (2008).
419. Karabela, S. P. *et al.* Neutralization of tumor necrosis factor bioactivity ameliorates urethane-induced pulmonary oncogenesis in mice. *Neoplasia N. Y. N* **13**, 1143–1151 (2011).
420. Suganuma, M. *et al.* Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice. *Cancer Res.* **59**, 4516–4518 (1999).
421. Kulbe, H. *et al.* The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 585–592 (2007).
422. Egberts, J.-H. *et al.* Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* **68**, 1443–1450 (2008).
423. Stathopoulos, G. T. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha promotes malignant pleural effusion. *Cancer Res.* **67**, 9825–9834 (2007).
424. Zins, K., Abraham, D., Sioud, M. & Aharinejad, S. Colon cancer cell-derived tumor necrosis factor-alpha mediates the tumor growth-promoting response in macrophages by up-regulating the colony-stimulating factor-1 pathway. *Cancer Res.* **67**, 1038–1045 (2007).
425. Wilson, A. G., Di Giovine, F. S., Blakemore, A. I. F. & Duff, G. W. Single base polymorphism in the human Tumour Necrosis Factor alpha (TNF α) gene detectable by *Nco*I restriction of PCR product. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 353–353 (1992).
426. Wilson, A. G., Symons, J. A., McDowell, T. L., McDevitt, H. O. & Duff, G. W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 3195–3199 (1997).
427. Louis, E. *et al.* Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin. Exp. Immunol.* **113**, 401–406 (1998).
428. Gorouhi, F., Islami, F., Bahrami, H. & Kamangar, F. Tumour-necrosis factor-A polymorphisms and gastric cancer risk: a meta-analysis. *Br. J. Cancer* **98**, 1443–1451 (2008).
429. Ma, L. *et al.* Association between tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms and prostate cancer risk: a meta-analysis. *Diagn. Pathol.* **9**, 74 (2014).
430. Riesenberger, S. *et al.* MITF and c-Jun antagonism interconnects melanoma dedifferentiation with pro-inflammatory cytokine responsiveness and myeloid cell recruitment. *Nat. Commun.* **6**, 8755 (2015).
431. Perotti, V. *et al.* NFATc2 is an intrinsic regulator of melanoma dedifferentiation. *Oncogene* **35**, 2862–2872 (2016).
432. Kortlever, R. M. *et al.* Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression. *Cell* **171**, 1301-1315.e14 (2017).
433. Spain, L. *et al.* Late-Stage Metastatic Melanoma Emerges through a Diversity of Evolutionary Pathways. *Cancer Discov.* **13**, 1364–1385 (2023).
434. Fane, M. E., Chhabra, Y., Smith, A. G. & Sturm, R. A. BRN 2, a POU erful driver of melanoma phenotype switching and metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res.* **32**, 9–24 (2019).

435. Mengoni, M., Braun, A. D., Gaffal, E. & Tüting, T. The aryl hydrocarbon receptor promotes inflammation-induced dedifferentiation and systemic metastatic spread of melanoma cells. *Int. J. Cancer* **147**, 2902–2913 (2020).
436. Reinhardt, J. *et al.* MAPK Signaling and Inflammation Link Melanoma Phenotype Switching to Induction of CD73 during Immunotherapy. *Cancer Res.* **77**, 4697–4709 (2017).
437. Ahn, A. *et al.* Transcriptional Reprogramming and Constitutive PD-L1 Expression in Melanoma Are Associated with Dedifferentiation and Activation of Interferon and Tumour Necrosis Factor Signalling Pathways. *Cancers* **13**, 4250 (2021).
438. Mehta, A. *et al.* Immunotherapy Resistance by Inflammation-Induced Dedifferentiation. *Cancer Discov.* **8**, 935–943 (2018).
439. Smith, M. P. *et al.* The immune microenvironment confers resistance to MAPK pathway inhibitors through macrophage-derived TNF α . *Cancer Discov.* **4**, 1214–1229 (2014).
440. Gray-Schopfer, V. C., Karasarides, M., Hayward, R. & Marais, R. Tumor necrosis factor- α blocks apoptosis in melanoma cells when BRAF signaling is inhibited. *Cancer Res.* **67**, 122–129 (2007).
441. Bald, T. *et al.* Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiogenesis and metastasis in melanoma. *Nature* **507**, 109–113 (2014).
442. Kearney, C. J. *et al.* Tumor immune evasion arises through loss of TNF sensitivity. *Sci. Immunol.* **3**, eaar3451 (2018).
443. Kashii, Y., Giorda, R., Herberman, R. B., Whiteside, T. L. & Vujanovic, N. L. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **163**, 5358–5366 (1999).
444. Baxevanis, C. N. *et al.* Compromised anti-tumor responses in tumor necrosis factor- α knockout mice. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1957–1966 (2000).
445. Zhao, X. *et al.* Tumor necrosis factor receptor 2-mediated tumor suppression is nitric oxide dependent and involves angiostasis. *Cancer Res.* **67**, 4443–4450 (2007).
446. Chopra, M. *et al.* Tumor necrosis factor receptor 2-dependent homeostasis of regulatory T cells as a player in TNF-induced experimental metastasis. *Carcinogenesis* **34**, 1296–1303 (2013).
447. Kawano, S. *et al.* TNFR2 Signaling Enhances Suppressive Abilities of Human Circulating T Follicular Regulatory Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **208**, 1057–1065 (2022).
448. Schioppa, T. *et al.* B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 10662–10667 (2011).
449. Harris, R. J. *et al.* Enriched circulating and tumor-resident TGF- β ⁺ regulatory B cells in patients with melanoma promote FOXP3⁺ Tregs. *Oncoimmunology* **11**, 2104426 (2022).
450. Donia, M. *et al.* Aberrant Expression of MHC Class II in Melanoma Attracts Inflammatory Tumor-Specific CD4⁺ T-Cells, Which Dampen CD8⁺ T-cell Antitumor Reactivity. *Cancer Res.* **75**, 3747–3759 (2015).
451. Madhusudan, S. *et al.* Study of Etanercept, a Tumor Necrosis Factor-Alpha Inhibitor, in Recurrent Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 5950–5959 (2005).
452. Madhusudan, S. *et al.* A Phase II Study of Etanercept (Enbrel), a Tumor Necrosis Factor α Inhibitor in Patients with Metastatic Breast Cancer.
453. Harrison, M. L. *et al.* Tumor Necrosis Factor α As a New Target for Renal Cell Carcinoma: Two Sequential Phase II Trials of Infliximab at Standard and High Dose. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4542–4549 (2007).
454. Brown, E. R. *et al.* A clinical study assessing the tolerability and biological effects of infliximab, a TNF- α inhibitor, in patients with advanced cancer. *Ann. Oncol.* **19**, 1340–1346 (2008).

455. Wu, C. *et al.* Disrupting Cytokine Signaling in Pancreatic Cancer: A Phase I/II Study of Etanercept in Combination With Gemcitabine in Patients With Advanced Disease. *Pancreas* **42**, 813–818 (2013).
456. Marthey, L. *et al.* Cancer Immunotherapy with Anti-CTLA-4 Monoclonal Antibodies Induces an Inflammatory Bowel Disease. *J. Crohns Colitis* **10**, 395–401 (2016).
457. Dougan, M. Checkpoint Blockade Toxicity and Immune Homeostasis in the Gastrointestinal Tract. *Front. Immunol.* **8**, 1547 (2017).
458. Murray-Brown, W. *et al.* Nivolumab-induced synovitis is characterized by florid T cell infiltration and rapid resolution with synovial biopsy-guided therapy. *J. Immunother. Cancer* **8**, e000281 (2020).
459. Bertrand, F. *et al.* Blocking Tumor Necrosis Factor Enhances CD8 T-cell-Dependent Immunity in Experimental Melanoma. *Cancer Res.* **75**, 2619–2628 (2015).
460. Meeth, K., Wang, J. X., Micevic, G., Damsky, W. & Bosenberg, M. W. The YUMM lines: a series of congenic mouse melanoma cell lines with defined genetic alterations. *Pigment Cell Melanoma Res.* **29**, 590–597 (2016).
461. Bertrand, F. *et al.* TNF α blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. *Nat. Commun.* **8**, 2256 (2017).
462. Montfort, A. *et al.* Anti-TNF, a magic bullet in cancer immunotherapy? *J. Immunother. Cancer* **7**, 303 (2019).
463. Duhén, T. *et al.* Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors. *Nat. Commun.* **9**, 2724 (2018).
464. Chow, A. *et al.* The ectonucleotidase CD39 identifies tumor-reactive CD8⁺ T cells predictive of immune checkpoint blockade efficacy in human lung cancer. *Immunity* **56**, 93-106.e6 (2023).
465. Siddiqui, I. *et al.* Intratumoral Tcf1+PD-1+CD8⁺ T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Immunity* **50**, 195-211.e10 (2019).
466. Connolly, K. A. *et al.* A reservoir of stem-like CD8⁺ T cells in the tumor-draining lymph node preserves the ongoing antitumor immune response. *Sci. Immunol.* **6**, eabg7836 (2021).
467. Schenkel, J. M. *et al.* Conventional type I dendritic cells maintain a reservoir of proliferative tumor-antigen specific TCF-1⁺ CD8⁺ T cells in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* S1074761321003605 (2021) doi:10.1016/j.immuni.2021.08.026.
468. Hänzelmann, S., Castelo, R. & Guinney, J. GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics* **14**, 7 (2013).
469. Petit, V. *et al.* C57BL/6 congenic mouse NRAS^{Q61K} melanoma cell lines are highly sensitive to the combination of Mek and Akt inhibitors in vitro and in vivo. *Pigment Cell Melanoma Res.* **32**, 829–841 (2019).
470. Ackermann, J. *et al.* Metastasizing Melanoma Formation Caused by Expression of Activated N-RasQ61K on an INK4a-Deficient Background. *Cancer Res.* **65**, 4005–4011 (2005).
471. Wolchok, J. D. *et al.* Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1345–1356 (2017).
472. Hodi, F. S. *et al.* TMB and Inflammatory Gene Expression Associated With Clinical Outcomes Following Immunotherapy in Advanced Melanoma. *Cancer Immunol. Res.* canimm.0983.2020 (2021) doi:10.1158/2326-6066.CIR-20-0983.
473. Daud, A. I. *et al.* Programmed Death-Ligand 1 Expression and Response to the Anti-Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **34**, 4102–4109 (2016).

474. Nishino, M., Ramaiya, N. H., Hatabu, H. & Hodi, F. S. Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 655–668 (2017).
475. Yap, T. A., Gerlinger, M., Futreal, P. A., Pusztai, L. & Swanton, C. Intratumor Heterogeneity: Seeing the Wood for the Trees. *Sci. Transl. Med.* **4**, (2012).
476. Grzywa, T. M., Paskal, W. & Włodarski, P. K. Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. *Transl. Oncol.* **10**, 956–975 (2017).
477. Heitzer, E., Haque, I. S., Roberts, C. E. S. & Speicher, M. R. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 71–88 (2019).
478. Babačić, H., Lehtiö, J., Pico de Coaña, Y., Pernemalm, M. & Eriksson, H. In-depth plasma proteomics reveals increase in circulating PD-1 during anti-PD-1 immunotherapy in patients with metastatic cutaneous melanoma. *J. Immunother. Cancer* **8**, e000204 (2020).
479. Keegan, A. *et al.* Plasma IL-6 changes correlate to PD-1 inhibitor responses in NSCLC. *J. Immunother. Cancer* **8**, e000678 (2020).
480. Shi, Y. *et al.* Circulating cytokines associated with clinical outcomes in advanced non-small cell lung cancer patients who received chemoimmunotherapy. *Thorac. Cancer* **13**, 219–227 (2022).
481. Liu, C. *et al.* Systematic analysis of IL-6 as a predictive biomarker and desensitizer of immunotherapy responses in patients with non-small cell lung cancer. *BMC Med.* **20**, 187 (2022).
482. Loriot, Y. *et al.* Plasma proteomics identifies leukemia inhibitory factor (LIF) as a novel predictive biomarker of immune-checkpoint blockade resistance. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **32**, 1381–1390 (2021).
483. Vredevoogd, D. W. *et al.* Augmenting Immunotherapy Impact by Lowering Tumor TNF Cytotoxicity Threshold. *Cell* **178**, 585-599.e15 (2019).
484. Grasso, C. S. *et al.* Conserved Interferon- γ Signaling Drives Clinical Response to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Melanoma. *Cancer Cell* S1535610820304165 (2020) doi:10.1016/j.ccell.2020.08.005.
485. Mehta, A. *et al.* Plasma proteomic biomarkers identify non-responders and reveal biological insights about the tumor microenvironment in melanoma patients after PD1 blockade. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.02.02.478819> (2022) doi:10.1101/2022.02.02.478819.
486. Cristescu, R. *et al.* Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science* **362**, eaar3593 (2018).
487. Garlanda, C. & Mantovani, A. Interleukin-1 in tumor progression, therapy, and prevention. *Cancer Cell* **39**, 1023–1027 (2021).
488. Johnson, D. H. *et al.* Infliximab associated with faster symptom resolution compared with corticosteroids alone for the management of immune-related enterocolitis. *J. Immunother. Cancer* **6**, 103 (2018).
489. Lesage, C. *et al.* Incidence and Clinical Impact of Anti-TNF α Treatment of Severe Immune Checkpoint Inhibitor-induced Colitis in Advanced Melanoma: The Mecolit Survey. *J Immunother* **42**, 5 (2019).
490. Badran, Y. R. *et al.* Concurrent therapy with immune checkpoint inhibitors and TNF α blockade in patients with gastrointestinal immune-related adverse events. *J. Immunother. Cancer* **7**, 226 (2019).
491. Verheijden, R. J. *et al.* Association of Anti-TNF with Decreased Survival in Steroid Refractory Ipilimumab and Anti-PD1-Treated Patients in the Dutch Melanoma Treatment Registry. *Clin. Cancer Res.* **26**, 2268–2274 (2020).

492. Weber, J. S. & Postow, M. A. TNF-alpha Blockade in Checkpoint Inhibition: The Good, the Bad or the Ugly? *Clin. Cancer Res.* clincanres.0387.2020 (2020) doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-0387.
493. Klebanoff, C. A. *et al.* Central memory self/tumor-reactive CD8⁺ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 9571–9576 (2005).
494. European Medicines Agency. Infliximab - Résumé des caractéristiques du produit - https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/remicade-epar-product-information_fr.pdf; Consulté le 17/08/23.
495. European Medicines Agency. Certolizumab - Résumé des caractéristiques du produit - https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/cimzia-epar-product-information_fr.pdf; Consulté le 17/08/23.
496. Melmed, G. Y., Targan, S. R., Yasothan, U., Hanicq, D. & Kirkpatrick, P. Certolizumab pegol. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 641–642 (2008).
497. Nesbitt, A. *et al.* Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): In vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor α agents: *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 1323–1332 (2007).
498. Mitoma, H. *et al.* Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF- α . *Gastroenterology* **128**, 376–392 (2005).
499. Vos, A. C. W. *et al.* Anti-Tumor Necrosis Factor- α Antibodies Induce Regulatory Macrophages in an Fc Region-Dependent Manner. *Gastroenterology* **140**, 221-230.e3 (2011).
500. Presti, M. *et al.* The effects of targeted immune-regulatory strategies on tumor-specific T-cell responses in vitro. *Cancer Immunol. Immunother.* **70**, 1771–1776 (2021).
501. Mitoma, H., Horiuchi, T., Tsukamoto, H. & Ueda, N. Molecular mechanisms of action of anti-TNF- α agents – Comparison among therapeutic TNF- α antagonists. *Cytokine* **101**, 56–63 (2018).
502. Palframan, R., Airey, M., Moore, A., Vugler, A. & Nesbitt, A. Use of biofluorescence imaging to compare the distribution of certolizumab pegol, adalimumab, and infliximab in the inflamed paws of mice with collagen-induced arthritis. *J. Immunol. Methods* **348**, 36–41 (2009).
503. van Schouwenburg, P. A., Rispens, T. & Wolbink, G. J. Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **9**, 164–172 (2013).
504. Atrekhany, K.-S. N. *et al.* Intrinsic TNFR2 signaling in T regulatory cells provides protection in CNS autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 13051–13056 (2018).
505. Kim, E. Y., Teh, S.-J., Yang, J., Chow, M. T. & Teh, H.-S. TNFR2-deficient memory CD8 T cells provide superior protection against tumor cell growth. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 6051–6057 (2009).
506. Pritzl, C. J. *et al.* IKK2/NF κ B signaling controls lung resident CD8⁺ T cell memory during influenza infection. *Nat. Commun.* **14**, 4331 (2023).
507. Simpson, T. R. *et al.* Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J. Exp. Med.* **210**, 1695–1710 (2013).
508. Lax, B. M. *et al.* Both intratumoral regulatory T cell depletion and CTLA-4 antagonism are required for maximum efficacy of anti-CTLA-4 antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **120**, e2300895120 (2023).
509. Gao, J. *et al.* VISTA is an inhibitory immune checkpoint that is increased after ipilimumab therapy in patients with prostate cancer. *Nat. Med.* **23**, 551–555 (2017).

510. Koyama, S. *et al.* Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat. Commun.* **7**, 10501 (2016).
511. Fu, J. *et al.* CD4⁺ T cell exhaustion leads to adoptive transfer therapy failure which can be prevented by immune checkpoint blockade. *Am. J. Cancer Res.* **10**, 4234–4250 (2020).
512. Stoeckius, M. *et al.* Cell Hashing with barcoded antibodies enables multiplexing and doublet detection for single cell genomics. *Genome Biol.* **19**, 224 (2018).
513. Qu, Y., Zhao, G. & Li, H. Forward and Reverse Signaling Mediated by Transmembrane Tumor Necrosis Factor-Alpha and TNF Receptor 2: Potential Roles in an Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **8**, 1675 (2017).
514. Szondy, Z. & Pallai, A. Transmembrane TNF-alpha reverse signaling leading to TGF-beta production is selectively activated by TNF targeting molecules: Therapeutic implications. *Pharmacol. Res.* **115**, 124–132 (2017).
515. Overdijk, M. B. *et al.* Crosstalk between human IgG isotypes and murine effector cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 3430–3438 (2012).
516. Kang, T. H. & Jung, S. T. Boosting therapeutic potency of antibodies by taming Fc domain functions. *Exp. Mol. Med.* **51**, 1–9 (2019).
517. Bruhns, P. & Jönsson, F. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol. Rev.* **268**, 25–51 (2015).
518. Schubert, M. *et al.* Perturbation-response genes reveal signaling footprints in cancer gene expression. *Nat. Commun.* **9**, 20 (2018).