



HAL
open science

Impact de l'hépatocyte growth factor sur les lymphocytes T régulateurs dans le cancer gastrique

Juliette Palle

► **To cite this version:**

Juliette Palle. Impact de l'hépatocyte growth factor sur les lymphocytes T régulateurs dans le cancer gastrique. Immunologie. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5142 . tel-04888134

HAL Id: tel-04888134

<https://theses.hal.science/tel-04888134v1>

Submitted on 15 Jan 2025

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.

Université Paris Cité

École doctorale Bio Sorbonne Paris cité (ED 562)

Centre de recherche cardiovasculaire PARCC (INSERM U970)

Impact de l'Hépatocyte Growth Factor sur les lymphocytes T régulateurs dans le cancer gastrique

Par Juliette PALLE

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par Magali TERME
Présentée et soutenue publiquement
le 17 octobre 2023

Devant un jury composé de :

Pr Rosine GUIMBAUD (PU-PH)
Dr Christine MENETRIER-CAUX (DR)
Pr Eric TARTOUR (PU-PH)
Pr Jean Pierre COUTY (PU)
Dr Simon PERNOT
Dr Magali TERME (MCU)

Rapportrice
Rapportrice
Examineur
Examineur
Examineur
Directrice

Université de Toulouse
Université de Lyon 1
Université Paris Cité
Université Paris Cité
Institut Bergonié
Université Paris Cité

Table des matières

RESUME	4
MOTS CLES	5
ABSTRACT	6
REMERCIEMENTS	8
PRINCIPALES ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION	11
CHAPITRE I. CANCER DE L'ESTOMAC	11
I. EPIDEMIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUE	11
II. CLASSIFICATIONS	12
III. PRINCIPES GENERAUX DE TRAITEMENT	15
CHAPITRE II. VOIE DE SIGNALISATION HGF/MET : DESCRIPTION ET RÔLES PHYSIOLOGIQUES	18
I. HEPATOCYTE GROWTH FACTOR : GENERALITES, STRUCTURE, REGULATION	18
II. RECEPTEUR CMET : GENERALITES, STRUCTURE.	20
III. AXE HGF/CMET : ACTIVATION, REGULATION EN SITUATION PHYSIOLOGIQUE.	21
IV. ROLES DE LA VOIE HGF/MET EN SITUATION PHYSIOLOGIQUE	25
CHAPITRE III. VOIE HGF/MET EN SITUATION TUMORALE	31
I. ROLES DE LA VOIE HGF/MET EN SITUATION TUMORALE	31
II. MECANISMES DE L'ACTIVATION DE LA VOIE HGF/MET EN SITUATION TUMORALE	36
III. IMPACT CLINIQUE	44
CHAPITRE IV. RÔLES DU SYSTEME IMMUNITAIRE EN CONTEXTE TUMORAL	56
I. HISTORIQUE ET CONCEPT D'IMMUNOSURVEILLANCE	57
II. REPONSE IMMUNITAIRE ANTI TUMORALE : PRINCIPAUX ACTEURS	62
III. MECANISMES D'ECHAPPEMENT TUMORAL AU SYSTEME IMMUNITAIRE	81

CHAPITRE V. IMPACT IMMUNOMODULATEUR DE L'AXE HGF/MET	97
I. IMPACT DE L'AXE HGF/MET SUR LES CELLULES IMMUNITAIRES	97
II. IMPLICATIONS EN SITUATION TUMORALE	103
OBJECTIFS	109
RESULTATS	111
ARTICLE PUBLIE DANS CANCERS (NOVEMBRE 2021)	111
DISCUSSION	134
EXPRESSION DE CMET SUR LES MONOCYTES CIRCULANTS DES PATIENTS ATTEINTS DE CANCER	134
I. ROLE FONCTIONNEL DES MONOCYTES EXPRIMANT LE CMET	135
II. MECANISMES D'EXPRESSION DU CMET SUR LES MONOCYTES CIRCULANTS	136
III. ROLE PRONOSTIQUE DE L'EXPRESSION DE CMET PAR LES MONOCYTES	139
IV. CORRELATION AVEC L'EXPRESSION DU CMET PAR LES MONOCYTES INTRA TUMORAUX	140
IMPACT DE L'HGF SUR L'INDUCTION DE TREGS IN VITRO	141
I. IMPACT DE L'HGF SUR LES MONOCYTES <i>IN VITRO</i>	141
II. IMPACT DES CD DIFFERENCIEES EN PRESENCE D'HGF SUR LES TREGS <i>IN VITRO</i>	142
III. REPRODUCTIBILITE <i>IN VIVO</i>	143
IMPACT DE L'HGF SUR L'ACCUMULATION DE TREGS IN VIVO	145
I. MECANISMES DE L'ACCUMULATION DE TREGS INDUITE PAR L'AXE HGF/MET DANS LE CG	145
II. INTERPRETATION DES RESULTATS DE L'ESSAI MEGA	149
ROLE IMMUNOMODULATEUR DE L'AXE HGF/MET EN SITUATION TUMORALE : IMPACT THERAPEUTIQUE	152
I. ROLE DE LA VOIE HGF/MET DANS LA RESISTANCE A L'IMMUNOTHERAPIE	153
II. COMBINAISONS ANTIHGF/MET ET IMMUNOTHERAPIE	153
CONCLUSION	156
ANNEXE	157
REVUE PUBLIEE DANS FRONTIERS IN IMMUNOLOGY (2021)	157
BIBLIOGRAPHIE	167
TABLE DES ILLUSTRATIONS	200

TITRE

Impact de l'Hepatocyte Growth Factor sur les lymphocytes T régulateurs dans le cancer gastrique.

RESUME

La compréhension des mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire représente un des enjeux clé de la recherche actuelle en oncologie. La découverte de l'expression de molécules de co-stimulation inhibitrices par les cellules tumorales a ainsi permis le développement des inhibiteurs de checkpoint immunitaires, constituant une révolution thérapeutique majeure dans la prise en charge des cancers. Au-delà des molécules de co-stimulation inhibitrices, de multiples mécanismes permettant à la tumeur d'échapper au système immunitaire ont été décrits. Parmi ces mécanismes, la capacité des cellules tumorales à induire l'accumulation de lymphocytes T régulateurs (Tregs) a été démontrée dans de nombreux cancers, notamment dans le cancer gastrique. Différents phénomènes peuvent être à l'origine de cette accumulation. Dans le laboratoire plusieurs travaux ont ainsi montré que le VEGF-A, molécule pro-angiogénique, était capable d'induire l'accumulation de Tregs en situation de cancer. L'Hepatocyte Growth Factor (HGF) est un facteur de croissance dont le rôle pro-tumoral a été démontré dans de nombreux cancers, via son action sur la réplication et la migration cellulaire mais aussi via un rôle pro-angiogénique. La voie HGF/cMET est ainsi suractivée dans plusieurs localisations tumorales, notamment dans le cancer gastrique. Cependant l'impact de cette voie de signalisation sur le système immunitaire et notamment sur l'accumulation de Tregs a très peu été étudié dans le contexte du cancer.

L'objectif de ce travail était ainsi d'étudier l'impact immunomodulateur de l'HGF dans le cancer gastrique. Dans un premier temps, nous avons observé que cMET (récepteur de l'HGF) est exprimé sur les monocytes circulants des patients atteints de cancer gastrique.

Nous avons étudié les corrélations entre l'expression monocyttaire de cMET et les paramètres clinico-biologiques des patients et nous avons observé qu'une expression élevée de cMET sur les monocytes circulants était associée à un phénotype agressif de la maladie, notamment à un grade tumoral peu différencié et à la présence de métastases. De plus, l'expression de cMET par les monocytes des patients était associée à un pronostic plus défavorable.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'impact *in vitro* de l'HGF sur les monocytes de patients atteints de cancer gastrique. Nous avons observé que les cellules dendritiques dérivées de monocytes de patients et différenciées en présence d'HGF adoptent un phénotype régulateur avec une plus faible expression de molécules de co-stimulation telles que CD86 et HLA-DR, des capacités de maturation altérées et une capacité accrue à produire de l'interleukine-10 et à induire la différenciation et la prolifération des Tregs *in vitro*. Enfin, nous avons étudié *in vivo* l'impact d'un anticorps monoclonal anti-HGF (le rilotumumab) sur l'accumulation de Tregs. Dans l'essai MEGA-ACCORD20-PRODIGE17, des patients atteints de cancer gastrique métastatique ont été randomisés pour recevoir un traitement par chimiothérapie seule, associée au rilotumumab, ou associée à un anticorps anti-EGFR. Nous avons observé que le traitement par rilotumumab était associé à une diminution des Tregs circulants chez les patients atteints de cancer gastrique.

Ainsi, nous avons identifié que l'HGF était capable d'induire l'accumulation de Tregs via les monocytes exprimant cMET dans le sang périphérique des patients atteints de cancer gastrique. Ce travail fournit des arguments en faveur d'une utilisation alternative potentielle des thérapies ciblées HGF/cMET basée sur leurs propriétés immunomodulatrices qui pourraient conduire au développement de nouvelles associations thérapeutiques chez les patients atteints de cancer, par exemple avec les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire.

MOTS CLES

cancer gastrique ; hepatocyte growth factor ; lymphocytes T régulateurs ; monocytes ; cellules dendritiques ; échappement immunitaire ; angiogénèse

TITLE

Impact of Hepatocyte Growth Factor on regulatory T cells in gastric cancer

ABSTRACT

Understanding the mechanisms of tumor escape from the immune system is one of the key issues in current oncology research. The discovery of the expression of inhibitory co-stimulatory molecules by tumor cells has led to the development of immune checkpoint inhibitors, representing a major therapeutic revolution in cancer management. In addition to inhibitory co-stimulatory molecules, multiple mechanisms enabling tumors to evade the immune system have been described.

Among these mechanisms, the ability of tumor cells to induce the accumulation of regulatory T lymphocytes (Tregs) has been demonstrated in many cancers, notably gastric cancer. This accumulation may be due to a number of different factors. In the laboratory, several studies have shown that VEGF-A, a pro-angiogenic molecule, is capable of inducing the accumulation of Tregs in cancer. Hepatocyte Growth Factor (HGF) is a growth factor whose pro-tumoral role has been demonstrated in many cancers, via its action on cell replication and migration, but also via a pro-angiogenic impact. The HGF/cMET pathway is thus over-activated in several tumor sites, notably gastric cancer. However, the impact of this signaling pathway on the immune system, and in particular on the accumulation of Tregs, has been little studied in the context of cancer. The aim of this study was to investigate the immunomodulatory impact of HGF in gastric cancer.

First, we observed that cMET (the cellular receptor of HGF) is expressed on circulating monocytes from gastric cancer patients. We investigated correlations between cMET monocyte expression and patients' clinico-biological parameters, and observed that high cMET expression on circulating monocytes was associated with an aggressive disease

phenotype, including poorly differentiated tumor grade and the presence of metastases. Furthermore, cMET expression in patients' monocytes was associated with a poorer prognosis.

Then, we studied the *in vitro* impact of HGF on monocytes from gastric cancer patients. We observed that dendritic cells derived from patient monocytes and differentiated in the presence of HGF adopt a regulatory phenotype with lower expression of co-stimulatory molecules such as CD86 and HLA-DR, altered maturation capacities and an enhanced ability to produce interleukin-10 and to induce Treg differentiation and proliferation *in vitro*. Finally, we studied *in vivo* the impact of an anti-HGF monoclonal antibody (rilotumumab) on Treg accumulation. In the MEGA-ACCORD20-PRODIGE17 trial, patients with metastatic gastric cancer were randomized to receive chemotherapy alone, combined with rilotumumab, or combined with an anti-EGFR antibody. We observed that treatment with rilotumumab was associated with a decrease in circulating Tregs in gastric cancer patients. Thus, we identified that HGF was able to induce the accumulation of Tregs via cMET-expressing monocytes in the peripheral blood of gastric cancer patients. This work provides arguments for the potential alternative use of HGF/cMET targeted therapies based on their immunomodulatory properties, which could lead to the development of new therapeutic combinations in cancer patients, for example with immune checkpoint inhibitors.

KEY WORDS

gastric cancer ; hepatocyte growth factor ; regulatory t cells ; monocytes ; dendritic cells, immune escape ; angiogenesis

REMERCIEMENTS

Au Docteur Magali Terme, pour ton encadrement rigoureux et bienveillant depuis le Master. Merci de m'avoir transmis le goût pour la recherche scientifique et l'immunologie. Merci pour ta disponibilité et ta patience au cours de ces années et pour m'avoir aidé à naviguer entre les congés maternités, les plannings hospitaliers et les pandémies pour mener à bien ce projet. J'espère avoir répondu à tes attentes et que nous continuerons à travailler ensemble encore longtemps.

Au Professeur Eric Tartour, d'avoir accepté de présider ce jury et de m'avoir accueillie dans votre laboratoire. Ces années de recherche passées au sein de l'équipe ont transformé ma pratique médicale et je vous en remercie infiniment.

Au Professeur Rosine Guimbaud et au Docteur Christine Ménétrier-Caux qui me font l'honneur d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et d'apporter votre regard expert sur ce travail.

Aux membres du jury :

Professeur Jean-Pierre Couty, d'avoir accepté d'évaluer cette thèse et d'y apporter votre expertise en immuno-oncologie.

Docteur Simon Pernot dont j'ai suivi les pas à l'HEGP et au laboratoire, merci d'avoir accepté de faire partie du jury.

Au Professeur Julien Taïeb, de m'avoir accueillie dans le service d'oncologie digestive pendant ces trois années de clinicat aussi intenses que passionnantes.

Au Professeur Aziz Zaanan. J'ai énormément appris à tes côtés, depuis la thèse d'exercice de médecine jusqu'aux discussions dans le service au lit du patient. Merci pour m'avoir fait confiance et m'avoir encadrée dans tous ces projets avec rigueur, rigueur, rigueur et bienveillance. J'espère que nous continuerons à échanger et à collaborer dans les années futures.

A tous les membres de l'équipe 10 et du PARCC avec qui j'ai eu la chance de travailler : Corinne, Thi, Nadine (merci pour l'hébergement dans le L2 !), Marion, Isabelle, Alice, Ikuan, Camille. Merci à Alexandra et Laure qui ont pleinement participé à ce travail et à Morgane pour ton aide précieuse, je te souhaite tout le succès que tu mérites dans tes projets.

Aux patients qui ont accepté de participer à ce travail avec enthousiasme et intérêt.

Aux médecins du service d'oncologie digestive de l'HEGP : Jeanne, Céline, Claire, Lorenzo, Jean Nicolas, Insaf, Bruno, Géraldine. Merci pour tout ce que vous m'avez appris chacun à votre manière et toujours dans la bonne humeur. Merci également aux infirmier.e.s et aux internes qui m'ont aidé à prélever les patients avec bonne volonté.

A Widad, Emilie H et Emilie M, mes co-cheffes qui ont été et resteront bien plus que des collègues. Merci pour votre compréhension et votre soutien lors de mes absences pour travailler cette thèse.

A mes ami.e.s, particulièrement à Morgane et Ségo pour tous nos échanges sur l'équation doctorante+médecin+maman (la solution reste à écrire !).

A mes parents, ma famille, ma belle famille dont la présence au quotidien a été indispensable à l'aboutissement de ce projet.

A Adrien, mon premier soutien et ma première source d'inspiration. Merci d'être toujours là dans les moments de doute. Merci d'être un exemple de confiance, de sérénité et de détermination.

A Théo et Liv, mes deux trésors.

PRINCIPALES ABREVIATIONS

ADK : Adénocarcinome
CCR : cancer colorectal
CD : Cellules dendritiques
CG : Cancer gastrique
CHC : Carcinome hépato cellulaire
cMET : Mesenchymal Epithelial Transition Factor Receptor
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPBNPC : Cancer Bronchique non à petites cellules
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-associated protein 4
EBV : Epstein Barr Virus
EGF-R : Epithelial Growth Factor Receptor
EMT : Transition Epithelio-mésenchymateuse
HAI : Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor
HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HGF-A : Hepatocyte Growth Factor Activator
IHC : Immunohistochimie
ITK : Inhibiteur de tyrosine kinase
LB : Lymphocytes B
LT : Lymphocytes T
LTreg : Lymphocytes T régulateurs
MDSC : Myeloid derived Suppressor Cell
MET : Micro environnement tumoral
MSI : Instabilité des microsatellites
NK : Cellules natural killer
PD-1 : Programmed cell death 1
PD-L1 : Programmed cell death Ligand 1
TAM : Macrophages associés aux tumeurs
TAN : Neutrophiles associés aux tumeurs
TC : Thérapies ciblées
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

INTRODUCTION

CHAPITRE I. CANCER DE L'ESTOMAC

I. Epidémiologie et facteurs de risque

A. Epidémiologie

L'adénocarcinome (ADK) de l'estomac, développé à partir de l'épithélium glandulaire, est la forme histologique la plus fréquente des cancers gastriques représentant 90% des patients. D'autres types histologiques de cancers de l'estomac existent tels que les cancers neuro-endocrines, les tumeurs stromales ou encore les lymphomes et représentent des formes plus rares qui ne seront pas abordées dans ce travail. Au niveau mondial, l'ADK gastrique est le 4^{ème} cancer en terme d'incidence chez les hommes et le 7^{ème} chez les femmes ¹. Il existe cependant une grande disparité de répartition mondiale, avec des régions de forte incidence notamment en Asie de l'est où il occupe le premier rang au Japon ² et le deuxième rang en Chine ³. En France, l'incidence de l'ADK gastrique est en diminution depuis les 30 dernières années et est possiblement parvenue à un plateau puisque le nombre de nouveaux cas annuel était de 6550 en 2012 et 6557 en 2018. Cette diminution pourrait s'expliquer par un meilleur contrôle des facteurs de risques (cf partie correspondante).

L'ADK gastrique est une maladie au pronostic sombre, représentant au niveau mondial la 4^{ème} cause de mortalité par cancer chez l'homme et la 5^{ème} chez la femme. En France, la mortalité par cancer liée à l'ADK gastrique se classe au 7^{ème} rang chez l'homme et au 10^{ème} rang chez la femme. Ce taux a diminué de moitié sur les 30 dernières années. Son pronostic est cependant très variable selon le stade auquel il est diagnostiqué. En effet, si le taux de survie à 5 ans peut atteindre 60% pour les formes localisées opérables, il n'est que de 2% pour les maladies

avancées, regroupant les tumeurs localement avancées non opérables et les tumeurs métastatiques non accessibles à un traitement chirurgical.

B. Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risque de l'ADK gastrique sont reconnus : l'infection par *Helicobacter pylori*⁴, un antécédent personnel de gastrite atrophique auto-immune (gastrite de Biermer), des antécédents familiaux de cancer de l'estomac, la consommation d'alcool, la consommation de tabac, une alimentation riche en sel, l'infection par l'Epstein Barr Virus (EBV), et un antécédent personnel ancien de gastrectomie partielle.

Il existe également plusieurs facteurs de prédisposition génétique, notamment le syndrome Lynch, associé à des cancers présentant une instabilité des micro-satellites (MSI), et les mutations germinales du gène *CDH1* résultant en une perte de fonction de la E-Cadhérine⁵. Ces formes héréditaires représentent 1 à 3% des cas d'ADK gastrique.

II. Classifications

L'estomac est divisé en plusieurs segments dont le cardia (ou jonction oeso-gastrique, JOG), le fundus, le corps gastrique, l'antrum et le pylore, différenciés par des démarcations anatomiques (Figure 1.) et/ou leurs caractéristiques histologiques. Les ADK du cardia se distinguent des autres localisations gastriques par des facteurs de risques particuliers, tels que l'obésité et le reflux gastro-oesophagien^{6 7}, des caractéristiques histologiques propres⁸ et des comportements évolutifs différents, notamment au stade métastatique où des lésions secondaires pulmonaires et cérébrales sont plus fréquemment rencontrées.⁹

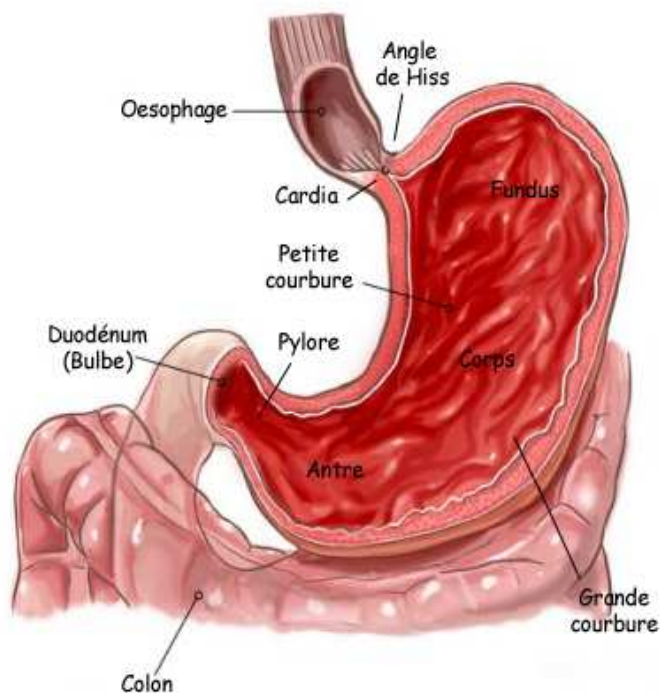


Figure 1. Anatomie de l'estomac

Plusieurs classifications histologiques des ADK gastriques sont utilisées. La classification de Lauren différencie les ADK de type intestinal, représentant le type le plus fréquent ¹⁰, diffus et indéterminé. La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) plus récente, a classé les ADK gastriques mais également plusieurs autres types de tumeurs gastriques moins fréquentes. Elle différencie ainsi les ADK tubulaires, papillaires, mucineux, mixtes, et les ADK peu cohésifs avec cellules en bagues à chaton. Ce dernier type, assimilé aux formes diffuses de la classification de Lauren, correspond à une entité particulière avec un pronostic péjoratif ^{11 12}. Ces ADK sont souvent associés à un aspect macroscopique particulier appelé « linite » gastrique caractérisé par une paroi épaisse rigide et blanchâtre, alors que les autres formes adoptent plus souvent des formes bourgeonnantes ou ulcérées.

Récemment, les progrès du séquençage de l'ADN à haut débit ont permis l'apparition de classifications moléculaires définissant de nouveaux sous-groupes d'ADK gastrique. Le groupe du Cancer Genome Atlas (TCGA) a ainsi classé les ADK du cardia et du corps gastrique en 4 groupes ayant les mêmes caractéristiques moléculaires : les tumeurs associées à l'EBV, les tumeurs MSI, les tumeurs génétiquement stables et les tumeurs avec instabilité chromosomique ¹³. Une autre classification réalisée par le Asian Cancer Research Group (ACRG) a identifié 4 sous-groupes d'ADK gastriques et de la JOG : les tumeurs MSI, les tumeurs sans instabilité micro-satellitaire (MSS) ayant un phénotype de transition épithélio-mésenchymateuse, les tumeurs MSS avec mutation de la protéine P53 et les tumeurs MSS sans mutation de la protéine P53 ¹⁴. Contrairement à la classification du TCGA, les sous-groupes définis par l'ACRG semblent avoir des pronostics différents, le phénotype MSI correspondant au meilleur pronostic et le phénotype MSS avec transition épithélio-mésenchymateuse correspondant au pronostic le plus péjoratif. Hormis le statut MSI/MSS, ces nouvelles classifications ne sont cependant pas utilisées en routine clinique.

Enfin comme pour les autres ADK, deux autres facteurs sont utilisés en pratique clinique pour évaluer le pronostic et guider le traitement : le degré de différenciation des cellules tumorales (bien, moyen ou peu différencié : les ADK bien différenciés ayant un meilleur pronostic) et l'envahissement loco-régional déterminé selon la classification TNM. Cette classification repose sur l'extension de la tumeur au niveau local (T), au niveau des ganglions loco-régionaux (N) et à distance (M). Elle différencie ainsi les tumeurs localisées, les tumeurs localement avancées et les tumeurs métastatiques ayant des pronostics et des stratégies thérapeutiques spécifiques.

III. Principes généraux de traitement

A. Formes localisées

Une résection endoscopique peut être réalisée pour certains ADK diagnostiqués à un stade superficiel limité à la muqueuse ou à la sous-muqueuse et sans envahissement ganglionnaire.

Ce groupe représente une très faible proportion des patients, estimée à 5% dans une étude parue en 2016 ¹⁵

Pour les cancers localisés ne répondant pas aux critères de tumeurs superficielles (envahissement dépassant la sous-muqueuse), ou pour les cancers localement avancés présentant une atteinte des ganglions drainants, le traitement repose sur la chirurgie encadrée par une chimiothérapie « péri-opératoire ». Différents types de gastrectomie (partielle ou totale) sont indiqués en fonction de la localisation anatomique de la tumeur et sont toujours associés à une résection des ganglions loco-régionaux (curage ganglionnaire). La réalisation d'une chimiothérapie « péri-opératoire » a montré notamment une diminution significative des récurrences locales et à distance. Elle est ainsi indiquée pour tous les cancers gastriques opérés. Différents protocoles de chimiothérapie ont été étudiés dans cette indication et le standard thérapeutique repose depuis 2019 sur un triplet de chimiothérapie associant une fluoropyrimidine, de l'oxaliplatine et du docetaxel (protocole FLOT) ¹⁶.

B. Formes avancées

Pour les cancers métastatiques ou pour les cancers localement avancés non opérables du fait d'une extension régionale trop importante (par exemple envahissant les organes de voisinage) ou du fait de comorbidités trop importantes chez le patient, le traitement repose sur la

chimiothérapie systémique palliative, pouvant être associée à des thérapies ciblées ou à de l'immunothérapie chez certains patients.

1. Chimiothérapie

Plusieurs molécules de chimiothérapie sont efficaces dans le cancer de l'estomac même si elles ne sont plus toutes utilisées à l'heure actuelle : les anthracyclines (Epirubicine), les taxanes (paclitaxel, docetaxel), le fluorouracile (5FU2 ou Capecitabine), les sels de platines (Oxaliplatine, Cisplatine) et l'irinotecan, et plus récemment la triflirudine/tipiracil (TTFP).

Le standard thérapeutique actuel repose en première ligne sur une bi-chimiothérapie associant une fluoropyrimidine et un sel de platine (FOLFOX, 5FU-Cisplatine). En deuxième ligne et troisième ligne, chez les patients étant en assez bon état général pour recevoir une chimiothérapie, plusieurs options thérapeutiques existent (mono ou bi-chimiothérapie).

Ces protocoles de chimiothérapie peuvent être associés, pour certains patients à des thérapies ciblées ou à de l'immunothérapie.

2. Thérapies ciblées

On regroupe sous le nom de thérapies ciblées toutes les molécules à visée anti-tumorale dont l'effet n'est pas lié à une action directe sur l'ADN et le cycle de réplication cellulaire. Ces drogues peuvent appartenir à différentes classes thérapeutiques, tels que les anticorps monoclonaux ou les inhibiteurs de tyrosine kinase, et vont avoir une (ou plusieurs) cibles présentées par la cellule tumorale ou par le micro-environnement tumoral. Tout comme la chimiothérapie cytotoxique classique, leur action anti-tumorale peut passer par l'arrêt du

cycle cellulaire mais peut aussi avoir d'autres modalités directes ou indirectes telles que des modifications du micro-environnement tumoral.

Dans le cancer gastrique, deux thérapies ciblées sont aujourd'hui validées par les autorités de santé en France : le trastuzumab, anticorps monoclonal ciblant le récepteur Human Epidermal growth factor Receptor 2 (HER2), indiqué depuis 2016 en 1^{ère} ligne en association à la chimiothérapie pour les cancers gastriques ayant une surexpression d'HER2, et le ramucirumab, anticorps monoclonal ciblant le récepteur Vascular Endothelial growth Factor Receptor 2 (VEGFR-2), indiqué en 2^{ème} ligne depuis 2015.

Ces thérapies ciblées ont notamment été développées devant la mise en évidence d'une implication forte de certaines voies de signalisation dans l'initiation et la croissance tumorale. Ainsi des molécules dirigées contre l'axe HGF/MET ont été créées pour le traitement de plusieurs cancers et notamment du cancer gastrique.

3. Immunothérapie

Récemment, l'association d'un anticorps monoclonal anti PD-1, le nivolumab, à la chimiothérapie de première ligne est devenu le standard thérapeutique chez les patients ayant une surexpression de PD-L1 par les cellules tumorales et du micro environnement tumoral.

CHAPITRE II. VOIE DE SIGNALISATION HGF/MET : DESCRIPTION ET RÔLES PHYSIOLOGIQUES

I. Hepatocyte Growth Factor : généralités, structure, régulation

L'Hepatocyte Growth Factor (HGF), aussi connu sous le nom de Scatter Factor (SF), a été décrit pour la première fois dans les années 1980 comme une protéine dérivée des fibroblastes capable d'induire la migration des cellules épithéliales¹⁷ et la prolifération des hépatocytes¹⁸. Principalement produite et sécrétée par les cellules stromales, l'HGF est une protéine de haut poids moléculaire (71KDa) appartenant à la famille des peptidases S1 et à la sous-famille du plasminogène. A la différence des autres membres de cette famille, l'HGF est dépourvu d'activité protéase^{19 20}. Elle est encodée par le gène *HGF* situé sur le chromosome 7 et composé de 20 exons²¹.

L'HGF est constitué 726 acides aminés répartis en 6 domaines : un domaine N-terminal (N), 4 domaines Kringle (K1-K4), et un domaine Serine Protease Homology (SPH)²² et est synthétisé sous une forme monocaténaire inactive (Pro-HGF). L'activation du Pro-HGF en HGF nécessite un clivage protéolytique au niveau d'un site trypsine-like situé après le domaine K4, résultant en un hétérodimère composé d'une chaîne α (comprenant le domaine N et les domaines K1 à K4) et d'une chaîne β (comprenant le domaine SPH) reliées par un pont disulfure (Figure 1)^{23 24}.

Cette activation protéolytique est effectuée par des sérines protéases qui peuvent être classées en deux grands types : des sérines protéases sériques comme l'HGF activator (HGF-A), le facteur XIIa et le facteur XIa, et des sérines protéases membranaires telles que la

matriptase, l'Hepsin et la protéine Human Airway trypsin-like protease (HAT)²⁵. Ces protéases activatrices sont régulées par un inhibiteur des sérines protéases : l'HGF-A inhibitor (HAI) dont il existe deux types (HAI de type 1 : HAI-1 et HAI de type 2 : HAI-2), tous deux capables d'inhiber l'HGF-A mais aussi les sérines protéases membranaires telles que la matriptase et l'Hepsin ²⁵. Les protéases activatrices de l'HGF, et leur inhibition par l'HAI-1 et 2 comptent ainsi parmi les éléments déterminants de la régulation de la voie HGF en situation physiologique, mais également en contexte pathologique et notamment tumoral (cf partie correspondante).

Plusieurs formes tronquées de l'HGF ont été isolées, correspondant à des variants d'épissage alternatifs. Le variant HGF/NK2 (comprenant le domaine N-terminal et le domaine K2) a été décrit comme une forme dépourvue d'activité mitogénique intrinsèque et capable d'inhiber l'effet prolifératif de l'HGF in vitro. HGF/NK2 est également capable de se lier de manière compétitive au récepteur cMET, et peut ainsi être considéré comme un antagoniste de l'HGF ²⁶. A l'inverse, le variant HGF/NK1 (comprenant le domaine N-terminal et le domaine K1), décrit plus tardivement, représente une isoforme de l'HGF possédant des propriétés agonistes partielles in vivo ^{27 28}.

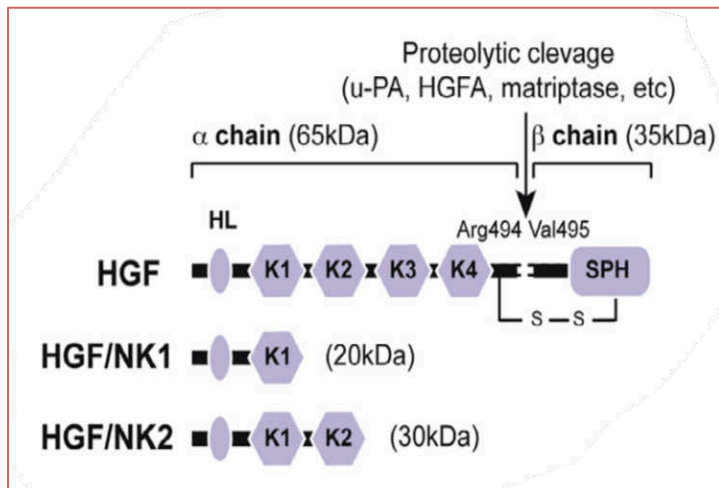


Figure 2. Structure de l'HGF et de ses variants naturels HGF/NK1 et HGF/NK2.

Le Pro-HGF inactif est clivé par différentes protéases dans le milieu extra-cellulaire. L'HGF mature actif est composé de deux chaînes reliées par un pont disulfure HL : hairpin loop ; K : Kringle domain ; SPH : serine protease homology

D'après Ilanguraman et al. Cytokine (2016)

II. Récepteur cMET : généralités, structure.

Le récepteur cMET est un récepteur transmembranaire à activité Tyrosine Kinase codé par le gène *MET*, identifié en 1984 comme proto-oncogène à partir d'une lignée humaine d'ostéosarcome transformée par un agent carcinogène chimique^{29 30}. Exprimé principalement par les cellules épithéliales, mais aussi par les neurones, les hépatocytes et les cellules hématopoïétiques, il est composé de plusieurs domaines : une portion extra cellulaire comportant un domaine Semaphorin (SEMA), un domaine plexin-semaphorin-integrine (PSI) et 4 domaines Immunoglobulin-Plexin Transcription Factor (IPT 1-4), une portion transmembranaire, et une portion intra-cellulaire comportant un domaine juxta-membranaire, un domaine Tyrosine Kinase (KD), et un domaine C-terminal. Comme l'HGF, cMET est initialement produit sous forme d'un précurseur monomérique inactif, dont

l'activation nécessite un clivage protéolytique par une protéase (Furin protéase). La forme mature du cMET est ainsi constituée d'un hétérodimère comportant une chaîne alpha courte et une chaîne beta, reliées par un pont disulfure (Figure 2.).

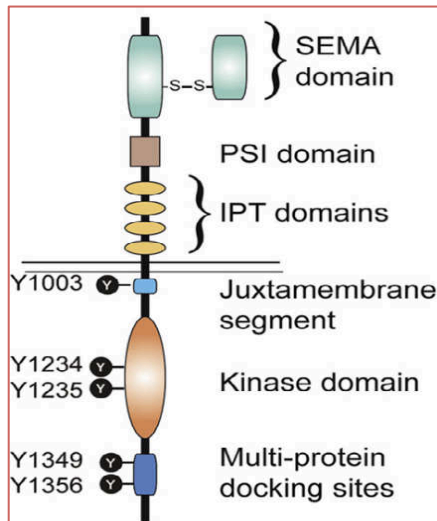


Figure 3. Structure du récepteur cMET

Le récepteur cMet est synthétisé sous la forme d'un précurseur inactif. Après clivage protéolytique la forme mature active est composée d'un hétérodimère relié par un pont disulfure.

D'après Ilanguraman et al. Cytokine (2016)

III. Axe HGF/cMET : activation, régulation en situation physiologique.

Initialement décrit de manière indépendante, cMET a été identifié comme le récepteur de l'HGF en 1991. Sécrété par les cellules stromales, l'HGF est capable de se lier au récepteur cMET exprimé par les cellules épithéliales adjacentes, activant ainsi une cascade de signalisation de manière essentiellement paracrine. L'HGF possède deux sites de liaison au cMET : un domaine de haute affinité situé dans sa portion N-terminale et les premiers domaines Kringle, se liant aux domaines IPT3 et IPT4 de cMET, et un domaine de basse affinité situé dans le domaine SPH, se liant au domaine SEMA de cMET³¹.

La liaison de l'HGF au cMET induit une homo-dimérisation et une auto-transphosphorylation des résidus Y1003, situé dans le domaine juxta-membranaire, Y1234 et

Y1235, situés dans le domaine KD, induisant à leur tour la phosphorylation des résidus Y1349 et Y1356 situés dans le domaine C-terminal. Cette phosphorylation de Y1349/Y1356 va permettre le recrutement de protéines intra-cellulaires adaptatrices et de molécules de signalisation, notamment : growth-factor receptor-Bound Protein 2 (GRB2), GRB2-associated protein 1 (GAB1), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), SRC, phospholipase C- γ (PLC γ) et SHC. Ces interactions induisent l'activation de nombreuses voies de signalisation incluant la voie ERK/JNK/MAPK, la voie PI3K/AKT/mTOR, la voie PI3K/AKT/NF- κ B ou encore la voie Src/FAK^{32 33 34}. L'intensité et la durabilité de l'activation de la voie HGF/cMET sont modulées par le recrutement de protéines de signalisation accessoires capables d'amplifier et de maintenir le signal d'activation, et de la présence de corécepteurs. Notamment, parmi ces protéines accessoires la protéine GAB1 est capable de se lier au récepteur cMET soit de manière directe via un site de liaison spécifique (MET binding site, MBS), soit de manière indirecte via la protéine GRB2³⁵³⁶. Après phosphorylation, GAB1 peut servir de plateforme de signalisation accessoire via le recrutement de protéines effectrices telles que la PI3K, la protéine SHC et la PLC γ , permettant ainsi l'amplification du signal d'activation. Parmi les corécepteurs, CD44v6 pourrait également jouer un rôle important dans l'amplification du signal via le recrutement de la protéine son of sevenless (SOS) permettant l'activation de la voie RAS^{37 38}. D'autres corécepteurs comme l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, et la Plexin B ont été décrits comme facteurs d'amplification et de maintien de l'activation du récepteur cMET par l'HGF^{39 40}. Les différentes voies de signalisation activées par la liaison HGF/cMET sont représentées dans la Figure 4.

En situation physiologique, une régulation négative de la voie HGF/MET est mise en place en réponse à son activation, intervenant à plusieurs niveaux :

- *Dégradation lysosomale* : suite à la dimérisation du cMET, la phosphorylation du résidu Y1003 du domaine juxta-membranaire va induire le recrutement d'une ubiquitine-protéine ligase (CBL) résultant en une mono-ubiquitylation du récepteur à plusieurs sites, et en son endocytose via le système des clathrines^{41 42 43}. cMET est ensuite adressé au lysosome où il va subir une dégradation protéolytique⁴³.
- *Clivage protéolytique* de la portion extra-cellulaire du cMET par des métalloprotéinases de la famille ADAM. Ce clivage va induire la formation d'un fragment soluble extra-cellulaire N-terminal et d'un fragment cytoplasmique ancré à la membrane⁴⁴ qui va être clivé puis dégradé par le protéasome⁴⁵. Ce fragment soluble du cMET est capable de séquestrer l'HGF et de se lier avec la forme non tronquée sans induire de signalisation, jouant ainsi un rôle antagoniste à l'activation de la voie HGF/cMET⁴⁶.
- *Diminution de l'activité tyrosine-kinase* liée à la phosphorylation du résidu S985 situé dans le domaine juxta-membranaire⁴⁷.

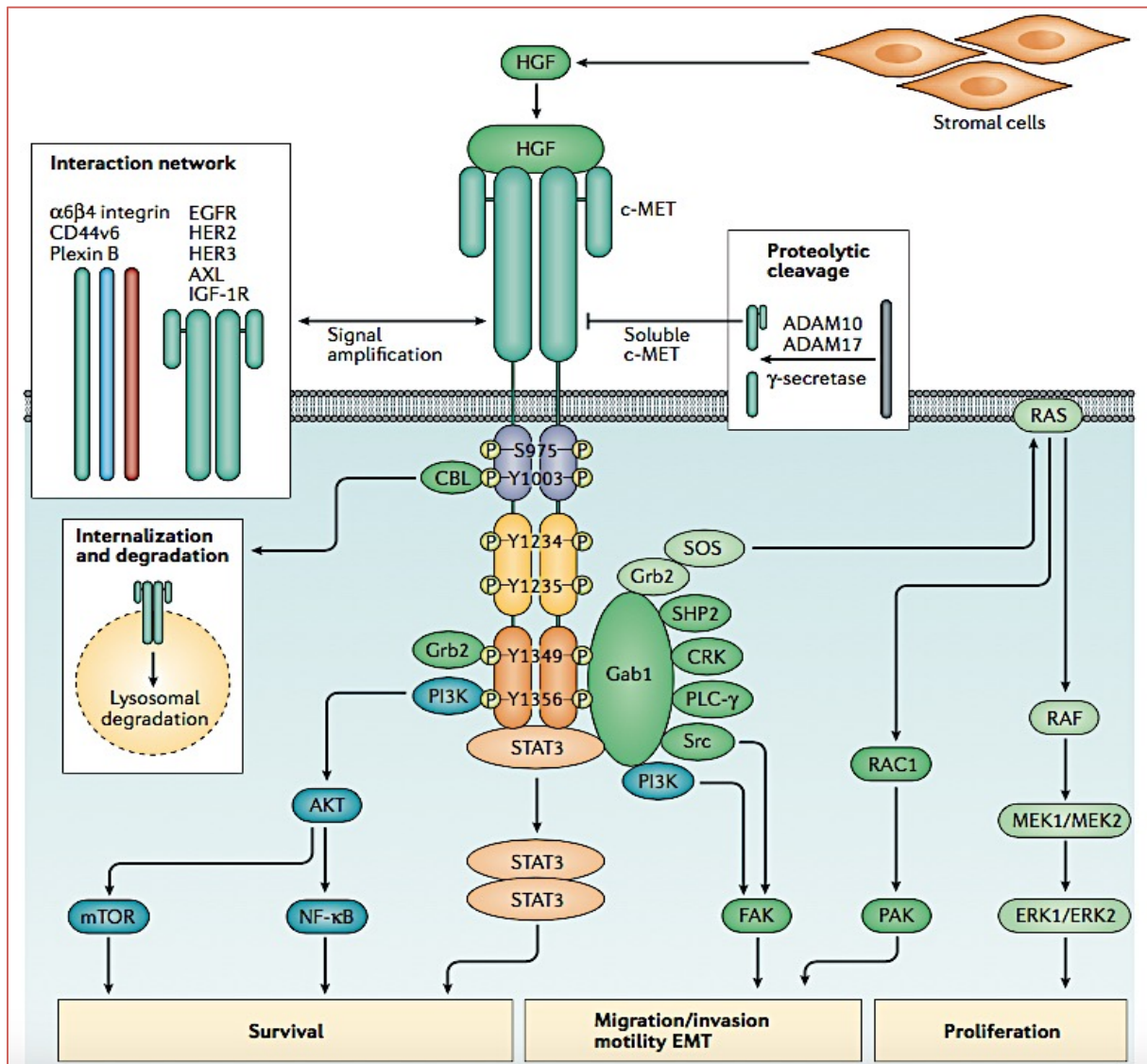


Figure 4. Voie de signalisation HGF/MET : acteurs, interactions et mécanismes de régulation.

La liaison de l'HGF induit la dimérisation du récepteur cMet et sa trans-autophosphorylation, induisant le recrutement de plusieurs protéines adaptatrices et l'activation de plusieurs voies de signalisation notamment la voie GRB2-SOS-RAS-MAPK, la voie PI3K/AKT et la voie STAT. Plusieurs co-récepteurs tels que l'intégrine $\alpha6\beta4$, le CD44v6 ou encore la Plexine B peuvent amplifier le signal d'activation et ainsi renforcer et maintenir la signalisation HGF/MET. L'axe HGF/MET est régulé négativement par clivage protéolytique du récepteur cMET via des membres de la famille ADAM et la γ -secretase, résultant en une forme soluble du cMET inactive, capable de séquestrer l'HGF. cMET peut être internalisé et dégradé par voie lysosomale.

D'après Bradley et al. Nature Reviews (2017)

IV. Rôles de la voie HGF/MET en situation physiologique

A. Rôles de la voie HGF/MET au cours de l'embryogenèse

1. Signalisation HGF/MET au cours du développement embryonnaire

Le rôle essentiel de la voie HGF/MET dans les différents stades du développement embryonnaire a été mis en évidence par des expériences de knock-in/knock-out des gènes *HGF* et *MET* réalisées chez la souris dans les années 1990^{48 49 50}. Il a ainsi premièrement été montré que les embryons *HGF*^{-/-} et *MET*^{-/-} présentent un phénotype identique, suggérant ainsi qu'au stade embryonnaire HGF est le seul ligand fonctionnel de cMET et inversement. L'inactivation génétique des co-récepteurs du cMET, comme le CD44 entraîne un phénotype différent, non létal, suggérant ainsi un rôle non essentiel au cours du développement^{51 52}. A l'inverse, les embryons de souris ayant une inactivation de *Gab* (codant pour la protéine de signalisation accessoire GAB1) présentent des déficits similaires à ceux des souris *MET*^{-/-} confirmant le rôle essentiel de cette protéine dans la signalisation HGF/MET y compris au cours du développement⁵³.

L'expression des gènes *MET* et *HGF* présente une évolution dynamique au cours du développement embryonnaire, le cMET est exprimé par les cellules épithéliales de nombreux organes, et l'HGF est produit par les cellules mésenchymateuses situées à proximité, suggérant la faible capacité de l'HGF à diffuser à distance⁵⁴.

2. Rôles de l'axe HGF/cMET dans l'organogénèse

Le premier rôle de la voie HGF/MET à avoir été mis en évidence au cours du développement embryonnaire est sa fonction essentielle dans la survie et la prolifération des

hépatocytes et des cellules du trophoblaste placentaire. L'inactivation complète de *HGF* et/ou de *MET* entraîne en effet une létalité embryonnaire in utero liée à une insuffisance du développement placentaire ⁴⁹. Les embryons de souris *HGF*^{-/-} ou *MET*^{-/-} présentent par ailleurs un foie hypotrophique secondairement à une diminution de la prolifération, et à une augmentation de l'apoptose des hépatocytes ⁵⁰.

Dans plusieurs études réalisées in vitro et in vivo, la voie HGF/cMET semble jouer également un rôle important dans la formation de plusieurs organes, notamment par sa participation à la tubulogénèse des épithéliums branchés du rein, de la glande mammaire et du poumon ^{55 56 57}. Ce phénomène complexe nécessite l'interaction de plusieurs types et fonctions cellulaires, telles que la prolifération, la migration et la survie, dans lesquelles sont impliquées l'axe HGF/MET.

3. Rôle dans le développement musculaire

L'axe HGF/MET semble jouer un rôle prépondérant dans le développement des muscles squelettiques. L'inactivation d'*HGF* ou de *MET* au stade embryonnaire chez la souris induit une absence complète de formation de certains groupes musculaires ⁴⁸. Ce rôle semble être particulièrement lié à l'implication de l'axe HGF/MET dans le phénomène de détachement et de migration de cellules précurseurs de certains groupes musculaires vers leur territoire de développement final. Ce phénomène, aussi appelé délamination, présente de nombreuses similarités avec celui de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). ^{48 58 59}

4. Rôle de l'axe HGF/cMET dans la formation du système nerveux

HGF et cMET sont tous les deux exprimés par différents types cellulaires impliqués dans le développement du système nerveux central et périphérique ⁶⁰. Il a ainsi notamment été montré que l'HGF jouait un rôle de facteur chimioattractant pour la croissance axonale de certains types de neurones ⁶¹ et était également impliqué dans la prolifération des précurseurs oligodendrocytaires et dans leur différenciation en oligodendrocytes ⁶².

B. Rôles de la voie HGF/MET au cours de la vie adulte

1. Réponses cellulaires à l'activation de la voie HGF/MET

- *Prolifération cellulaire.* L'augmentation de la prolifération des hépatocytes a été l'un des premiers rôles de l'HGF, décrit d'abord *in vitro* ^{18 21 22} puis *in vivo* ⁶³. Cet effet mitogène semble impliquer particulièrement la voie ERK/MAPK via la signalisation par la protéine Gab1 ^{64 36} et a également été observé dans d'autres organes tels que le rein ⁶⁵ et le poumon ^{66 67}.

- *Invasion et migration cellulaire.* L'autre grand rôle de l'HGF décrit initialement est sa capacité à induire la migration et l'invasion des cellules épithéliales, à partir d'expériences réalisées *in vitro* sur des matrices de collagène de lignées de cellules épithéliales MDCK ^{68 69}. Après adjonction d'HGF recombinant humain, les cellules MDCK, à l'origine adhérentes, sont capables de se détacher via un phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse, et de migrer le long de la surface de collagène, mais aussi d'envahir la matrice en profondeur. La promotion de la motilité et de l'invasion cellulaire est liée à l'activation de plusieurs voies de

signalisation situées en aval du récepteur MET. Notamment la protéine RAS semble jouer un rôle prépondérant via l'activation de la voie des MAPK et la voie PI3K^{70 71 72}.

- *Suppression de l'apoptose.* L'effet anti-apoptotique de l'activation de la voie HGF/MET a initialement été démontré dans des modèles d'hépatite fulminante réalisés *in vitro* et *in vivo* chez la souris^{73 74}, puis plus tardivement chez l'homme par l'administration d'anticorps anti-FAS sur des cultures d'hépatocytes humains⁷⁵. Au-delà des hépatocytes et des maladies du foie, ce rôle de protection contre l'apoptose a également été démontré sur l'épithélium de nombreux organes tels que le rein⁷⁶, le poumon⁷⁷, le cœur⁷⁸ mais également sur d'autres types tissulaires tels que les cellules gliales⁷⁹ et les cellules photo-réceptrices de la rétine⁸⁰. Parmi les voies de signalisation impliquées lors de l'activation HGF/MET, la protéine Gab1 semble jouer un rôle prépondérant dans ce rôle anti-apoptotique via l'activation de la voie PI3K^{81 82}.

2. Rôle de la voie HGF/MET dans la protection et la réparation tissulaire

De nombreux travaux ont montré que la voie HGF/MET joue un rôle important dans la protection et la réparation tissulaire en réponse à une agression aigüe ou chronique via une action sur la prolifération, la migration et la survie cellulaire. Plusieurs observations décrivent ainsi une augmentation de l'expression tissulaire d'HGF et de cMET ainsi que du taux d'HGF plasmatique en réponse à une lésion du foie, du rein ou du cœur dans différents modèles pathologiques^{83 78 84}. Chez des souris génétiquement modifiées dont les hépatocytes présentent une inactivation de *MET*, il a été montré une hypersensibilité à des agressions

tissulaires y compris mineures, aboutissant notamment à une diminution du renouvellement hépatocytaire, à une inflammation persistante et à une augmentation de la fibrose hépatique^{85 86 87}. Ce rôle hépato-protecteur semble être impliqué dans la réponse face à lésions aiguës mais également dans des processus pathologiques chroniques tels que la cirrhose⁸⁷. Similairement, des souris présentant une inactivation sélective de *MET* dans l'épithélium rénal ou cutané présentent une diminution de la régénération tissulaire dans différents modèles pathologiques de néphropathie interstitielle ou de rejet aigu ou chronique de transplantation cardiaque^{88 89}.

Cet impact sur la protection et la réparation tissulaire fait intervenir les fonctions cellulaires de migration, de prolifération et de protection contre l'apoptose activées par la voie HGF/MET décrites ci-dessus, mais également d'autres processus complexes tels que la protection contre la fibrose. Ce phénomène est impliqué dans de nombreuses pathologies chroniques telles que la cirrhose, certaines néphropathies ou encore certaines pathologies cardiaques ou respiratoires. Il a ainsi été montré chez l'animal que l'administration d'HGF endogène ou exogène permettait de réduire la fibrose dans plusieurs modèles de pathologies chroniques^{90 91 92}. Cet effet de protection contre la fibrose de la voie HGF/MET semble faire intervenir certaines métalloprotéases (MMP), telles que la MMP-9, impliquées dans la dégradation de la matrice extra cellulaire^{93 94 95}.

La voie HGF/MET joue donc un rôle fondamental en situation physiologique et face à certaines maladies, au cours desquelles son action va être contrôlée. En cas de dérégulation, l'activation de l'axe HGF/MET, et ses conséquences moléculaires et cellulaires, peuvent au contraire

devenir pathologiques et participer à des phénomènes délétères telles que la progression tumorale.

CHAPITRE III. VOIE HGF/MET EN SITUATION TUMORALE

I. Rôles de la voie HGF/MET en situation tumorale

A. Croissance tumorale et survie cellulaire

Une des premières preuves directes du rôle pro-oncogénique de la voie HGF/MET a été apportée par des expériences réalisées chez des souris transgéniques présentant une surexpression de cMET par les hépatocytes. Cette surexpression de cMET, et l'hyperactivation consécutive de la voie HGF/MET, entraînait une transformation des hépatocytes en cellules tumorales présentant des caractéristiques histologiques typiques de carcinome hépatocellulaire, des capacités prolifératives accrues, et une résistance à l'apoptose⁹⁶. Dans de nombreux autres modèles murins, une hyperactivation de la voie HGF/MET spécifique au sein de certains tissus était associée au développement de cancers tels que des mélanomes, des rhabdomyosarcomes ou des carcinomes mammaires^{97 98}.

B. Invasion tumorale et métastases

L'implication de la voie HGF/MET dans la capacité d'invasion et de dissémination tumorale à distance a été apportée pour la première fois en 1995 par l'analyse comparative de tissu colorectal sain, de tumeurs primitives colorectales et de métastases hépatiques synchrones de cancer colorectal issus d'un même patient. Comparativement au tissu sain, une augmentation de l'expression de *MET* était retrouvée dans 50% des tumeurs colorectales et dans 70% des métastases hépatiques.⁹⁹ Ces résultats ont été reproduits dans une autre étude réalisée chez des patients atteints de cancer colorectal montrant que l'expression de cMET (sous forme d'ARNm et sous forme protéique) par les métastases hépatiques était plus élevée que celle de

la tumeur colorectale primitive ¹⁰⁰. Dans cette étude, les auteurs ont aussi montré par des expériences réalisées à partir d'organoïdes dérivées de métastases hépatiques de cancer colorectal que la stimulation par l'HGF augmentait la capacité de migration des cellules tumorales et qu'une inhibition de la voie HGF/MET (par interférence ARN) entraînait une diminution de la capacité de prolifération et de migration des cellules tumorales ¹⁰⁰. L'implication directe de la voie HGF/MET dans la migration et la dissémination tumorale n'est pas seulement restreinte aux cancers colorectaux. Plusieurs modèles expérimentaux étudiant d'autres localisations tumorales primitives et secondaires, notamment de carcinome hépatocellulaire ¹⁰¹, de cancer du rein ^{102 103}, de cancer de la thyroïde ¹⁰⁴ ont démontré le rôle pro-métastatique de l'activation de la voie HGF/MET. Dans ces études, ce rôle semblait être particulièrement lié à l'activation de l'axe HGF/MET par l'hypoxie tumorale.

Dans le contexte spécifique du cancer gastrique, le rôle de la voie HGF/MET dans la dissémination tumorale a été mis en évidence par de nombreuses observations. *In vitro* l'activation de cMET (autocrine, ou par administration exogène d'HGF) sur des lignées cellulaires humaines de cancer gastrique, est associée à une activation de l'EMT, une inhibition de l'anoïkis (forme d'apoptose observée chez certaines cellules après une rupture avec leur environnement), et une augmentation des capacités d'invasion et de migration à distance ¹⁰⁵. Dans une autre étude, l'inactivation de *MET* dans une lignée cellulaire de CG par un système d'interférence ARN (lentivirus) induisait une diminution de l'expression protéique de cMET et était associé à une diminution de la prolifération cellulaire et de ses capacités de dissémination dans le péritoine ¹⁰⁶. La stimulation *in vitro* de lignées de cancer gastrique par de l'HGF induit une augmentation de l'expression de plusieurs proto-oncogènes tels que *BAD*

(Bcl-2 associated agonist of cell death) impliqué dans la résistance à l'apoptose, *Jun B* et *LCN2* (lipocalin-2), impliqués dans l'invasion et la prolifération cellulaire via la voie NFκB¹⁰⁷. Dans cette étude, l'exposition à l'HGF induisait une diminution de l'expression de l'E-Cadhérine par les cellules tumorales et une augmentation de l'expression de l'uPA, sérine protéase impliquée dans la migration cellulaire.

L'action pro-tumorale de la voie HGF/MET dans le cancer gastrique semble être notamment liée à son impact sur l'EMT. En effet, *in vitro* l'exposition de lignées de cancer gastrique au CXCL12 induit une diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux (tels que l'E-cadhérine) et une augmentation de marqueurs mésenchymateux telle que la vimentine et du facteur de transcription ZEB1, et ce via son interaction avec le CXCR4. Dans cette étude, l'activation de l'EMT était associée à une phosphorylation de cMET. De plus, le blocage de cMET inhibait l'EMT. *In vivo*, il existait une corrélation positive entre l'expression intratumorale de cMET et de CXCR4. De plus la co-expression à la fois de cMET et de CXCR4 par la tumeur est associée à un moins bon pronostic¹⁰⁸. Dans une autre étude, l'HGF était capable d'induire l'expression d'héparanase (HPA), une endoglucuronidase capable notamment de favoriser l'EMT, par des lignées cellulaires de CG. Cette expression d'HPA par l'HGF était associée à une augmentation des capacités de migration à distance des cellules tumorales *in vitro*¹⁰⁹.

C. Reprogrammation métabolique

La reprogrammation métabolique constitue une des propriétés clés caractérisant la cellule tumorale, et comprend les nombreux changements permettant à celle-ci de survivre dans un

environnement avec des apports en nutriments limités ¹¹⁰. L'implication de l'activation de la voie HGF/MET dans la reprogrammation métabolique tumorale a été démontrée notamment dans des modèles de carcinome hépato cellulaire ¹¹¹, de cancer pancréatique ¹¹² et de glioblastome ¹¹³.

D. Cellules souches tumorales

Depuis les années 2010, de plus en plus d'études suggèrent que certaines cellules tumorales possèdent des propriétés spécifiques aux cellules souches avec notamment des capacités de réplication, d'auto-renouvellement et de différenciation. Ces cellules ont ainsi été définies comme « cellules souches tumorales » et possèdent des capacités hautement tumorigéniques. ¹¹⁴ L'ensemble des cellules souches tumorales, parfois regroupées sous le terme de « niche tumorale », constitue un véritable réservoir pour l'initiation et la progression tumorale. L'implication de la voie HGF/MET dans l'initiation et le maintien de cette niche tumorale a été suggérée par plusieurs études notamment dans le cancer colorectal, le cancer du pancréas, le cancer du sein ou encore le glioblastome. Plusieurs marqueurs cellulaires, tels que le CD133 ou le CD44 ont été décrits comme associés aux cellules souches tumorales ¹¹⁵. Dans des modèles de carcinome hépato cellulaire, il a été montré que cMET était impliqué dans la modulation de l'expression du CD44s, isoforme du CD44, par la cellule tumorale, lui conférant des propriétés de cellules souches tumorales via une voie de signalisation MET-PI3K-AKT. ¹¹⁶

E. Angiogenèse

Les liens entre angiogenèse et axe HGF/MET ont été largement étudiés et l'impact pro-angiogénique de cette voie est aujourd'hui bien démontré^{117 118 119}.

Différents mécanismes sous tendant le rôle pro-angiogénique de cette voie ont été décrits en situation tumorale. L'activation de la voie HGF/MET a ainsi été associée à une augmentation de la production de VEGF par les cellules tumorales¹²⁰, une diminution de la production de Thrombospondin-1 (TSP-1, facteur anti-angiogénique inhibant la prolifération des cellules endothéliales et induisant leur apoptose)¹²¹ et à une augmentation de cytokines pro-angiogéniques telles que l'IL-8¹²². Plusieurs études ont également montré que l'HGF possède une activité pro-angiogénique directe, notamment par l'induction de la prolifération des cellules endothéliales^{123 124}. Ainsi dans de nombreuses études, il a été montré que l'activation de la voie HGF/MET peut être responsable d'une résistance primaire ou secondaire aux traitements anti-angiogéniques ciblant la voie du VEGF/VEGF-R^{125 126 127 128} et des combinaisons thérapeutiques associant des traitements ciblant la voie VEGF/VEGF-R. Ainsi, de nombreux traitements inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant à la fois la voie MET et la voie du VEGFR et/ou d'autres voies impliquées dans l'angiogenèse ont été développés ces dernières années avec des résultats encourageants dans des phase I/II. En 2023, seul le Crizotinib (ciblant cMET, ALK, RON, AXL et TIE2) et le Cabozantinib (ciblant cMET, VEGFR-2, c-RET, c-KIT, FLT3 et TIE2) disposent d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France, respectivement dans le cancer du poumon et dans les cancers du rein, du foie et de la thyroïde.

II. Mécanismes de l'activation de la voie HGF/MET en situation tumorale

De multiples mécanismes pouvant entraîner une activation de l'axe HGF/MET en situation tumorale ont été décrits.

A. Augmentation de l'expression de l'HGF

1. Régulation de l'activation du pro-HGF en HGF

(a) Rôle de l'HGF-A

Comme décrit ci-dessus, l'activation du précurseur de l'HGF, biologiquement inactif, dépend d'un clivage protéolytique réalisé par plusieurs sérines protéases dont la principale est l'HGF-A. L'HGF-A, produit et sécrété principalement par les hépatocytes mais aussi par les cellules de l'épithélium intestinal, rénal ¹²⁹ et du système nerveux central ¹³⁰, est retrouvé sous forme circulante inactive (zymogène) dans le plasma ¹³¹. En réponse à une agression tissulaire telle que l'inflammation, l'HGF-A est activé localement par un clivage protéolytique médié notamment par la thrombine ¹³¹, permettant ainsi d'activer spécifiquement l'HGF au sein du tissu lésé.

En situation de cancer, une forte expression de thrombine au sein de la tumeur est fréquemment retrouvée¹³², pouvant ainsi mener à une hyperactivation de l'HGF via une augmentation de l'activité de l'HGF-A. D'autres activateurs de l'HGF-A comme les Human Kallikrein 1-Related Peptidase KLK4 et KLK5 sont également retrouvés dans le microenvironnement tumoral ¹³³. In vitro, une surexpression de KLK5 induite dans une lignée tumorale humaine de cancer du pancréas (SUIT-2) est associée à une activation du pro-HGF en HGF, une phosphorylation de Met et à un phénotype tumoral agressif ¹³³. Au-delà des

activateurs de l'HGF-A, une surexpression directe de l'HGF-A par la tumeur a également été démontrée *in vivo* et *in vitro* dans de nombreux types de cancers^{134 135 136} et une augmentation du taux d'HGF-A activé circulant a été observée chez des patients atteints de myélome et de cancer de prostate^{137 138}. *In vitro*, une inactivation de l'HGF-A par un anticorps neutralisant était associée à une suppression de l'activation du pro-HGF en HGF dans des modèles humains de cancer du côlon, de lymphome et de myélome^{139 136}. Enfin, dans des expériences réalisées sur des lignées humaines de cancer du pancréas il a été montré que l'hypoxie était capable d'induire une surexpression d'HGF-A par les cellules tumorales, résultant en l'activation de la voie HGF/MET¹⁴⁰.

(b) Rôle de l'HAI

L'HAI-1 et 2 sont deux protéines transmembranaires capables d'inhiber l'HGF-A mais aussi d'autres protéines activatrices de l'HGF telles que la matriptase et l'Hepsin. L'HAI-1 est exprimé en situation physiologique à la surface des cellules épithéliales de nombreux organes (notamment : tractus digestif et biliaire, pancréas, rein, utérus)¹⁴¹. Le rôle anti-tumoral de l'HAI-1 a été suggéré par plusieurs études. Notamment il a été montré qu'une diminution de l'expression de l'HAI-1 par les cellules tumorales était observée de nombreux cancers, et était associée à un pronostic péjoratif chez des patients atteints de cancers digestifs, de la prostate, du sein ou encore de l'endomètre et de l'ovaire^{131 142 143 138}. *In vitro*, une inactivation de l'HAI-1 dans une lignée humaine de cancer du pancréas (lignée SUI-2) induisait une augmentation des capacités d'invasion tumorale¹⁴⁴ qui était associée à une hyperactivation de la voie HGF/MET¹⁴⁵. De plus, sur des lignées humaines de cancer du sein, une surexpression d'HAI-1

par des fibroblastes humains induite par rétrovirus, ou l'administration d'HAI-1 recombinant, induisaient une diminution de la production d'HGF, et étaient associées à une diminution des capacités d'invasion métastatique des cellules tumorales ¹⁴⁶. Une diminution de l'HAI-2 a également été observée dans de nombreux types de cancers et identifiée comme facteur de progression tumorale ^{147 148 149 150}. Cette diminution semble le plus fréquemment liée à une hyperméthylation du promoteur du gène codant pour l'HAI-2 : *SPINT2* ^{148 149}. Cependant il existe peu de données démontrant un lien direct entre cette diminution de l'HAI-2 et une hyperactivation de la voie HGF/MET dans le contexte spécifique du cancer.

2. Augmentation de l'expression de l'HGF : autres mécanismes

- *Rôle des facteurs de croissance* : Plusieurs facteurs de croissance tels que le Platelet Derived Growth Factor (PDGF) et le Fibroblast Growth Factor (FGF), cytokines telle que l'interleukine-1 (IL-1), et chimiokines telle que le CCL20 sont capables d'augmenter la production de l'HGF y compris en situation tumorale ^{151 152 153}.

- *Activation autocrine* : Une expression d'HGF par les cellules tumorales exprimant le récepteur MET est également fréquemment retrouvée, augmentant la concentration d'HGF dans le micro environnement et permettant non seulement l'activation paracrine, mais aussi une activation autocrine de cette voie de signalisation,

- *Mutations* : Le promoteur du gène *HGF* contient une séquence répétée de 30 désoxyadénosines appelée Deoxyadenosine Tract Element (DATE). Cette séquence occupe une fonction inhibitrice pour la transcription du gène *HGF*. Plusieurs mutations tronquantes

siégeant dans cette séquence DATE ont été décrites en situation tumorale, aboutissant à une perte de son rôle suppresseur et à une hyperexpression d'HGF.

B. Activation non canonique de la voie HGF/MET

De nombreux mécanismes d'activation non canonique de la voie HGF/MET en situation tumorale ont été décrits :

1. Activation par la Des- γ -Carboxy-Prothrombine (DCP)

La DCP est un précurseur de la Prothrombine produit par les cellules hépatocytaires tumorales dans le contexte du carcinome hépato-cellulaire (CHC), dépourvu de toute activité pro ou anti-coagulante¹⁵⁴. L'association entre DCP et CHC a été démontrée par de nombreuses études. Une élévation du taux plasmatique de DCP est retrouvée chez 40 à 80% des patients atteints de CHC selon les publications et est considérée comme biomarqueur diagnostique spécifique de CHC par certains auteurs^{155 156 157}, bien qu'une élévation de la DCP ait également été rapportée dans d'autres cas de cancers, notamment chez des patients atteints de cancer gastrique métastatique au niveau hépatique¹⁵⁸. L'élévation du taux de DCP pourrait également être associé à un pronostic défavorable chez les patients atteints de CHC¹⁵⁹. Plusieurs mécanismes sous-tendent le rôle pro-tumoral de la DCP dans le CHC. Parmi eux, il a été montré *in vitro* que la DCP était capable d'induire une phosphorylation du récepteur MET, permettant une activation de la voie HGF/MET mais aussi d'autres voies de signalisation telles que la voie de l'EGF-R et la voie ERK¹⁶⁰. *In vivo*, une co-expression de la DCP et de cMET est

fréquemment observée au sein du tissu tumoral dans le contexte du CHC. Cette co-expression semble être associée à un pronostic oncologique défavorable ¹⁶¹.

2. Interaction avec d'autres voies/Transactivation

Une coexpression de cMET et de l'Epithelial Growth Factor Receptor (EGF-R) est retrouvée dans de nombreux cancers, notamment dans les cancers pulmonaires ¹⁰⁴. Dans plusieurs études, cette co-expression cMET/EGFR par la cellule tumorale pourrait entraîner une hyperactivation de voies de signalisations communes sous-jacentes telles que la voie ERK/MAPK ou la voie PI3K/AKT.

D'autres récepteurs tyrosine kinase co-exprimés par les cellules tumorales, tels que le Récepteur d'Origine Nantais (RON), et le Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) peuvent être responsables d'une transactivation du récepteur cMET ¹⁶², permettant ainsi l'activation de la voie MET indépendamment de la liaison de l'HGF sur son récepteur.

3. Hyperexpression de cMET

Plusieurs mécanismes responsables d'une hyperexpression du gène *MET* et/ou du récepteur cMET ont été décrits :

- *Rôle de l'hypoxie* : dans plusieurs modèles tumoraux, il a été montré que l'hypoxie était capable d'induire une hyperexpression de cMET (au niveau protéique et de l'ARNm) via l'expression de HIF-1alpha ^{163 164}.

- *Augmentation des facteurs de transcription de MET* : notamment de la famille des protéines Ets et Sp1 ¹⁶⁵

- *Diminution de l'expression des microARN* : plusieurs microARN sont impliqués dans l'inhibition de la transcription de *MET* (tels que la famille miR-34, miR-340, mi-R 148a). Une diminution de l'expression de ces microARN a été décrite dans différents cancers, entraînant une augmentation de la transcription de *MET* et une hyperexpression du récepteur cMET à la surface des cellules tumorales.¹⁶⁶

4. Amplifications et mutations de *MET*

Une amplification et/ou une augmentation du nombre de copies (copy number gain, CNG) de *MET* ont été observées dans de nombreuses localisations tumorales telles que les cancers bronchiques non à petite cellules¹⁶⁷, les cancers gastriques^{168 169}, les cancers du sein¹⁷⁰ et les cancers rénaux¹⁷¹. Il existe une grande disparité de prévalence des amplifications et CNG de *MET* selon les études en fonction des techniques utilisées et des seuils de détection. Par exemple, pour les cancers gastriques, une amplification de *MET* est décrite dans 1 à 11% des cas lorsqu'elle est détectée en FISH, et jusqu'à 30% des cas en utilisant des tests basés sur PCR^{172 169}.

Plusieurs mutations de *MET* responsables d'une hyperactivation de la voie HGF/MET ont été rapportées. Parmi elles, les plus étudiées sont les mutations touchant l'exon 14, codant pour le domaine juxta-membranaire du récepteur contenant un résidu tyrosine impliqué dans la dégradation de celui-ci via le système des ubiquitine-ligases et l'adressage au protéasome. Ainsi, plusieurs mutations de l'exon 14 aboutissant à une perte de cette région régulatrice fondamentale ont été décrites en situation tumorale, notamment dans les cancers bronchiques où leur prévalence est de 3 à 5%^{173 174}. D'autres mutations touchant le domaine

tyrosine kinase et aboutissant à une activation constitutionnelle du récepteur ont également été décrites dans les carcinomes hépato-cellulaires, les cancers gastriques et les cancers ORL

175

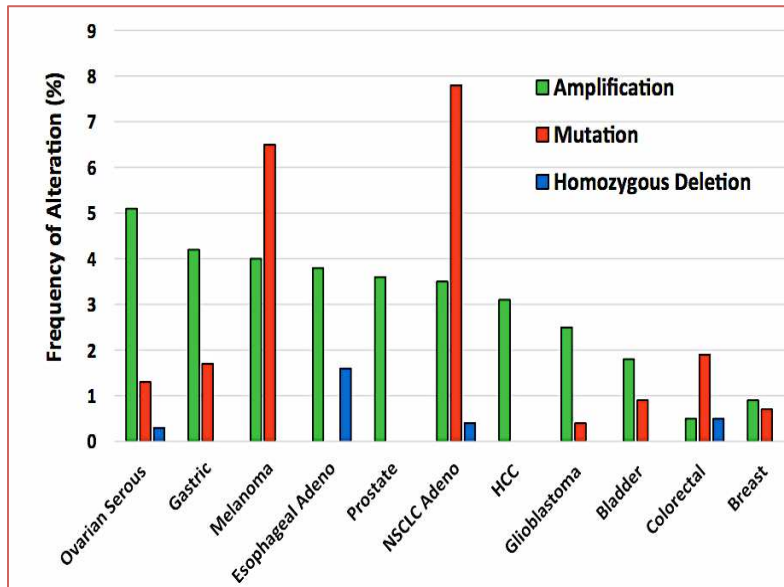


Figure 5. Fréquence des altérations de *MET* dans différents cancers.

Des altérations de *MET* sont retrouvées dans de nombreux cancers, les amplifications étant l'anomalie la plus fréquemment retrouvée. Adeno : adénocarcinome ; NSCLC : cancer bronchique non à petite cellules ; HCC : carcinome hépato-cellulaire

D'après les données du TCGA 2015

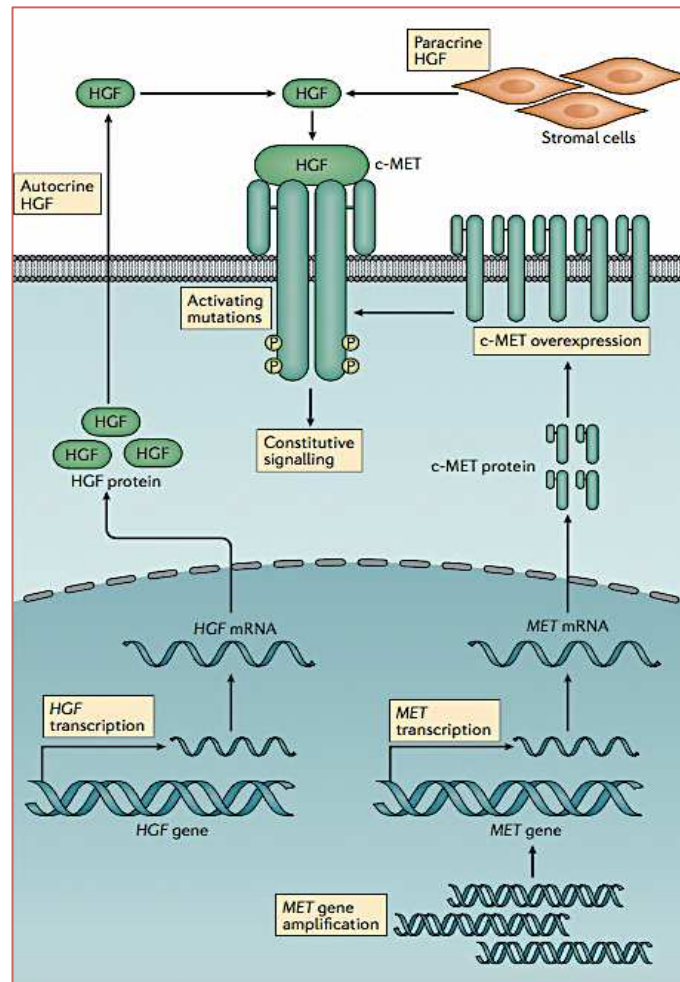


Figure 6. Dérégulation de l'axe HGF/MET en situation tumorale.

Différents mécanismes moléculaires peuvent induire une hyperactivation de la voie HGF/MET en contexte de cancer : amplifications de *MET* ; mutations de *MET* incluant les mutations induisant une délétion de l'exon 14 impliqué dans la dégradation du récepteur cMET, hyperexpression de l'ARNm de cMET lié : à une activation de sa transcription par l'hypoxie et l'activation de HIF, une perte de régulation par les miRNA, une activation de sa transcription par les facteurs de transcription Ets et Sp1. L'augmentation de la transcription de l'ARNm d'HGF peut être liée à des mutations dans la région régulatrice du promoteur du gène *HGF* (région DATE). L'hyperactivation de la voie HGF/MET peut être liée à une sécrétion autocrine ou à une augmentation de la sécrétion paracrine d'HGF.

D'après Bradley et al. Nature Reviews. (2017)

III. Impact clinique

A. Rôle pronostique

L'élévation de l'HGF circulant représente un facteur pronostique indépendant péjoratif en situation métastatique dans les cancers gastriques mais aussi dans les CBNPC, dans les cancers du col utérin, dans les tumeurs cérébrales et dans le mélanome¹⁷⁶. Par ailleurs, en cas de cancer de la prostate localisé, il a été montré qu'un taux pré-opératoire d'HGF circulant élevé représente un facteur prédictif d'invasion métastatique ganglionnaire et était associé à des rechutes plus précoces après la chirurgie¹⁷⁷. Similairement dans le cancer colorectal, une augmentation de l'HGF circulant est associée à une diminution de la survie chez les patients avec un cancer localisé de stade II ou III¹⁷⁸.

Chez les patients atteints de CG, le taux d'HGF circulant est augmenté comparativement aux sujets sains, y compris à un stade précoce de la maladie^{179 180 181}. Une étude réalisée chez des patients atteints de CG a également montré que le taux d'HGF circulant était corrélé au taux d'HGF intra tumoral¹⁸².

L'expression intra tumorale de cMET peut être évaluée en immunohistochimie selon différentes méthodes (IHC classique, Tissue Micro Array). Elle est en général principalement détectée au niveau du cytoplasme des cellules tumorales, mais peut être retrouvée aussi au niveau membranaire. De nombreuses études ont montré que la surexpression intra tumorale de cMET, les gains de copie de *MET* et les amplifications de *MET* étaient associées à un pronostic défavorable dans de multiples localisations tumorales telles que les cancers du poumon (cancers bronchiques non à petites cellules - CBNPC), les cancers du sein, les cancers

colorectaux, les cancers gastro-oesophagiens, les cancer de la sphère ORL, les cancers du pancréas, les cancers du rein, les CHC et les cancers du col utérin¹⁷⁶.

Dans le CG, il existe une très grande variabilité du niveau d'expression intra tumorale de cMET selon les études en fonction de la méthode de détection utilisée, du seuil de positivité etc. (Tableau 1). Une surexpression de cMET semble plus fréquemment retrouvée dans les ADK de type intestinal (selon la classification de Lauren décrite ci-dessus) et les ADK bien différenciés^{183 184}. Cependant des associations avec des ADK de type diffus (ou linitiques) ont également été décrites¹⁸⁵.

La valeur pronostique péjorative de la surexpression tumorale de cMET dans le cancer gastrique a été montrée par de nombreuses études, décrivant notamment des associations avec : l'envahissement ganglionnaire à distance, la présence de métastases, un plus fort taux de récurrence après traitement chirurgical et une moins bonne survie globale. Dans une méta-analyse portant sur 14 études et incluant plus de 2000 cas de cancers gastriques de différents stades, une surexpression de cMET était associée de façon significative à une diminution de la survie globale indépendamment de la méthode de détection et du stade de la maladie (localisé/localement avancé/métastatique)¹⁸⁶.

Une surexpression de cMET par les cellules tumorales est aussi retrouvée au sein des métastases notamment péritonéales¹⁰⁶.

Tout comme la surexpression protéique, la prévalence des altérations géniques de *MET* dans le CG est également variable selon les études et selon les techniques utilisées (FISH, RT-PCR) (Tableau 2) : des mutations de *MET* sont ainsi retrouvées chez 2 à 5% des patients¹⁸⁷ (parmi lesquelles des mutations de l'exon 14 retrouvées de façon plus fréquente dans les cancers

pulmonaires) et des amplifications dans 3 à 7% des cas ¹⁸⁸. Selon la plupart des auteurs, ces amplifications sont liées à un mauvais pronostic.

La faible prévalence d'altérations géniques (mutations ou amplifications) de *MET* retrouvée dans le CG suggère ainsi que la surexpression protéique de cMET soit liée à d'autres mécanismes (cf paragraphe correspondant), tels qu'une diminution de la dégradation, une diminution de la régulation par les miARN, même si peu de données existent dans ce contexte spécifique.

	<i>n</i>	Definition of overexpression	%	Relation to clinicopathological factors	Relation to survival	Ref.
Usual IHC	495	2+/3+, > 10%	22	Intestinal type, recurrence	Worse ³	[14]
	170	Cytoplasmic, 2+/3+	13	ND	ND	[38]
	121	≥ 5%	66	N, stage	Worse	[20]
	114	> 30%	74	NA	Worse ³	[30]
	98	Intensity and extensity scoring system	59	N, M	Worse	[25]
	50		78	NA	NA	[28]
	38	2+/3+, ≥ 25%	63	Intestinal type	ND	[22]
	94 ¹	≥ 50%	50	NA	NA	[24]
	121 ²	Any staining	98	Liver metastasis	ND	[29]
	TMA	438	Membranous, 2+/3+, > 10%	24	T, N, M, stage, intestinal type	Worse
436		Intensity and extensity scoring system	44	T, N, M, diffuse type	Worse ^{3,4}	[13]
215		Cytoplasmic, > 10%	69	NA	NA	[27]
212		2+/3+	12	ND	Worse ³	[32]
182		Intensity and extensity scoring system	66	N, intestinal type, differentiated type	Worse	[19]
163		Cytoplasmic 2+/3+ ≥ 10%, and positive > 75%	4	ND	Worse ³	[31]
124		Cytoplasmic, 3+	71	T, stage, intestinal type	ND	[23]
114		Intensity and extensity scoring system	82	N, stage	Worse	[26]
35			43	ND	Likely worse	[18]

¹Limited to diffuse or mixed type; ²Only stage IV; ³An independent prognostic factor on multivariate analysis; ⁴Only IHC3+. IHC: Immunohistochemistry; TMA; Tissue micro array; T: Tumor invasion depth; N: Lymph-node metastasis; M: Distant metastasis; ND: Not described; NA: Not associated.

Tableau 1. Prévalence et association entre expression intra tumorale de cMET en immunohistochimie et paramètres clinico-histologiques dans le cancer gastrique

D'après Inokuchi et al. *World Journal of GastroIntestinal Oncology* (2015)

	<i>n</i>	Definition of positive expression	%	Relation to clinicopathological factors	Relation to survival	Ref.
FISH	460 ¹	GA	2.2	Stage	Worse	[39]
	196	GA	6.1	ND	Worse	[32]
	170	GA or HP	15 (GA7.1 HP7.6)	ND	ND	[38]
SISH	381	GA or HP	19 (GA3.4, HP16)	Intestinal (HP), M (GA), stage (GA)	Worse ² (GA)	[12]
RT-PCR	472	> 4 copies	21	NA	Worse ²	[33]
	266	> 4 copies	1.5	NA	NA	[40]
	216	≥ 5 copies	10	Unknown	Worse ²	[41]
	128	≥ 4 copies	30	T, stage	Worse ²	[42]
	45	≥ 7 copies	7	ND	Worse	[18]
SNP array	193	GA	4	ND	ND	[44]
	100	GA	3	ND	ND	[43]
Polymorphism analysis	34 (tumor)	Any alterations	59	T, N, M	ND	[47]
	34 (serum)	Any alterations	41	N, M	ND	[47]

¹Esophagogastric adenocarcinoma; ²An independent prognostic factor on multivariate analysis. FISH: Fluorescence *in situ* hybridization; SISH: Silver *in situ* hybridization; RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction; SNP: Single nucleotide polymorphism; GA: Gene amplification; HP: High polysomy; ND: Not described; NA: Not associated; T: Tumor invasion depth; N: Lymph-node metastasis; M: Distant metastasis.

Tableau 2. Prévalence et association entre altérations moléculaires de MET et paramètres clinico-histologiques dans le cancer gastrique

D'après Inokuchi et al. *World Journal of GastroIntestinal Oncology* (2015)

B. Rôle dans la résistance aux traitements anti-tumoraux

Au-delà de son rôle direct pro-tumoral de la voie HGF/MET, l'activation de cette voie est également impliquée dans la résistance aux agents anticancéreux, notamment à la chimiothérapie et aux thérapies ciblées^{189 190}. Deux grands mécanismes pouvant expliquer ce phénomène ont été décrits :

- *Transition épithélio-mésenchymateuse*. La transition épithélio-mésenchymateuse peut être induite par la chimiothérapie, la radiothérapie ou certaines thérapies ciblées comme les anti-angiogéniques via l'expression de chimiokines et de cytokines telles que l'IL-6 et le CXCL12 et de facteurs de croissance tels que l'HGF et le TGF-beta¹⁹¹. Ainsi dans le cancer pulmonaire, l'inhibition de la voie HGF/MET par le crizotinib (ITK) induisait un blocage de l'EMT et une re-sensibilisation des cellules tumorales à la chimiothérapie¹⁹².

- *Interactions avec d'autres voies de signalisation*. Dans de nombreux cancers, des interactions entre la voie HGF/MET et la voie de l'EGF-R et du VEGFR ont été associés à des résistances acquises aux thérapies ciblant l'EGF-R ou le VEGF-R. Il a aussi été montré que MET et des membres de la famille HER peuvent réciproquement compenser leur perte d'expression par l'activation de voies de signalisation redondantes, indépendante de la liaison du ligand sur leur récepteur. Ainsi dans les CG présentant une amplification de HER2, l'activation de la voie HGF/MET et la co-amplification de *MET* est associé à une résistance aux thérapies dirigées contre HER2^{193 194}. Une étude a d'ailleurs rapporté le cas d'un patient ayant un CG métastatique avec une co-amplification de *ERBB2* et de *MET* et ayant résisté à toutes les

lignes de traitement y compris anti-HER2 seul et qui présentait une réponse tumorale après un traitement concomitant par anti-HER2 et ITK ciblant MET (crizotinib) ¹⁹⁵. Par ailleurs, Apicella et al. ont montré dans des expériences réalisées *in vivo* chez la souris que les cellules tumorales exposées de manière prolongée aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR présentaient un « shift » métabolique caractérisé par une augmentation de la glycolyse et une production augmentée de lactate. Dans cette étude, l'accumulation de lactate par les fibroblastes associés au cancer (CAF) était capable de stimuler la production d'HGF par ces cellules et ainsi l'activation de la voie HGF/MET des cellules tumorales, induisant une résistance secondaire au traitement ¹⁹⁶. Cette modification métabolique est également impliquée dans le recrutement de cellules immunosuppressives tels que les lymphocytes T régulateurs (Tregs), pouvant ainsi contribuer à la progression tumorale.

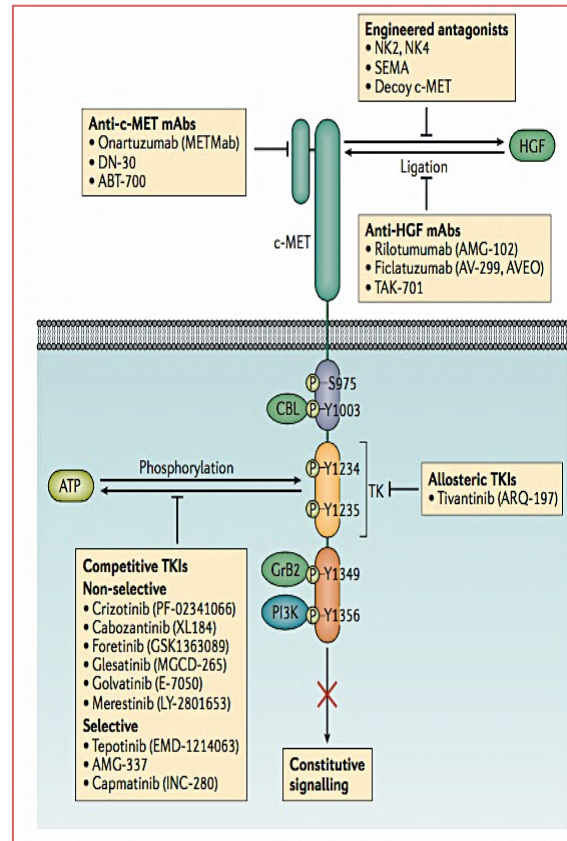
C. Thérapies ciblant la voie HGF/MET dans le cancer

De nombreuses molécules ont été développées à ce jour ciblant la voie HGF/MET, dont certaines ayant été étudiées dans des essais cliniques de phase II et III portant sur le cancer de l'estomac. Ces molécules peuvent être séparées en 2 grandes classes : les anticorps monoclonaux dirigés contre l'HGF ou contre cMET, qui vont neutraliser ou entrer en compétition avec l'HGF, inhiber la dimérisation de cMET et/ou induire sa dégradation, et les inhibiteurs de tyrosine kinase, qui vont inhiber l'activité catalytique de cMET.

Figure 7. Thérapies ciblées dirigées contre la voie HGF/MET ayant fait l'objet d'essais cliniques.

Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été développées pour cibler la voie HGF/MET dans différents types de cancer : les anticorps monoclonaux anti-cMET et anti-HGF, et les inhibiteurs de tyrosine kinase sélectifs et non sélectifs.

D'après Bradley et al. Nature Reviews (2017)



1. Anticorps monoclonaux

Plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre l'HGF (rilotumumab, ficlitzumab) ont montré des signaux d'efficacité dans des essais de phase I et II portant sur plusieurs types de cancers notamment les cancers du rein et les cancers de prostate. L'onartuzumab est un anticorps dirigé contre le domaine semaphorin de cMET ayant montré des résultats prometteurs en association à l'erlotinib chez les patients ayant une surexpression tumorale de cMET lors d'un essai de phase II portant sur les cancers pulmonaires¹⁹⁷. Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés par un essai de phase III (MetLung) portant sur la même population. Dans le CG, malgré des signaux d'efficacité prometteurs, aucun anticorps monoclonal anti-HGF ou anti-MET n'a démontré de bénéfice clinique significatif lors d'essais de phase II et III, présentés dans le Tableau 3.

Table 1 | Overview of phase II randomized clinical trials with HGF/c-MET pathway inhibitors in gastro-oesophageal cancer

Study	Setting	Study treatment	c-MET stratification	End points and exploratory analyses
Iveson <i>et al.</i> (2014) ²⁷ ; n=121	First-line treatment of unresectable locally advanced or metastatic GC/GEJ	ECX+placebo versus ECX+7.5 mg/kg rilotumumab (R1) versus ECX+15 mg/kg rilotumumab (R2)	<ul style="list-style-type: none"> c-MET⁺: ≥25% membrane staining at any intensity; c-MET⁻: <25% membrane staining at any intensity following IHC with the anti-MET4 mAb 	Median PFS 4.2 months in the placebo group versus 6.8 months in R1 (P=0.009) 5.1 months in R2 (P=0.16) and 5.7 months in R1+R2 (P=0.016); MET assessable in 77% of patients (91/118); median PFS 4.4 months in the c-MET ⁻ placebo subgroup versus 6.8 months in the R1+R2 c-MET ⁺ subgroup, HR 0.46, 95% CI 0.25–0.85; median OS 5.7 months in the c-MET ⁻ placebo subgroup versus 10.6 months in the R1+R2 c-MET ⁺ subgroup, HR 0.46, 95% CI 0.24–0.87
MEGA; Malka <i>et al.</i> (2015) ²⁸ ; n=162	First-line treatment of HER2 ⁻ , advanced-stage GC/GEJ cancer	mFOLFOX6 + placebo versus mFOLFOX6 + 10 mg/kg rilotumumab versus mFOLFOX6 + panitumumab	<ul style="list-style-type: none"> 1+: weak intensity 2+: moderate intensity 3+: strong intensity QS defined as % stained cells of a specific intensity, from 0 to 300 (300 indicating 100% of cells with strong intensity) following IHC with the CONFIRM SP44 anti-MET rabbit mAb 	PFS rate at 4 months: 71% in placebo group, 63% in the rilotumumab group, 63% in the panitumumab group
Shah <i>et al.</i> (2015) ¹³¹ ; n=123	First-line treatment of HER2 ⁻ , metastatic GC/GEJ cancer	mFOLFOX6 + placebo versus mFOLFOX6 + onartuzumab	<ul style="list-style-type: none"> c-MET⁺ scores 2+/3+ 2+: ≥50% of tumour cells with at least moderate staining but <50% with strong staining intensity 3+: ≥50% of tumour cells with strong staining intensity following IHC with the CONFIRM SP44 anti-MET rabbit mAb 	Median PFS 6.97 months in the placebo group versus 6.77 months in the onartuzumab group, HR 1.08, 95% CI 0.71–1.63; median PFS 6.77 months in patients in the placebo group with c-MET scores of 2+/3+ versus 5.95 months in those receiving onartuzumab, HR 1.38, 95% CI 0.6–3.2

CI, confidence interval; CX, cisplatin and capecitabine; ECX, epirubicin, cisplatin and capecitabine; GC, gastric cancer; GEJ, gastro-oesophageal junction; HR, hazard ratio; IHC, immunohistochemistry; ITT, Intention to treat; mAb, monoclonal antibody; mFOLFOX6, 5-fluorouracil, oxaliplatin and folinic acid; OS, overall survival; PFS, progression-free survival; QS, Quick score.

Table 2 | Overview of data from phase III randomized trials of HGF/c-MET pathway inhibitors in gastro-oesophageal cancer

Study	Setting	Study treatment	c-MET stratification	End points and exploratory analyses
RILOMET-1*; Cunningham <i>et al.</i> (2015) ²⁵ ; n=609	First-line treatment of HER2 ⁻ , c-MET ⁺ unresectable, locally advanced or metastatic GC/GEJ cancer	ECX + placebo versus ECX + 15 mg/kg rilotumumab	<ul style="list-style-type: none"> c-MET⁺: ≥25% membrane staining at any intensity c-MET⁻: <25% membrane staining following IHC with the MET4 mAb 	Median OS 11.5 months in the placebo group versus 9.6 months in the rilotumumab group, P=0.021; median OS in patients with 25–44% c-MET expression 12.4 months versus 10.2 months in placebo versus rilotumumab groups; median OS in patients with 45–79% c-MET expression 10.4 months versus 8.1 months; median OS in patients with ≥80% c-MET expression, 11.1 months versus 10.7 months
RILOMET-2; Doi <i>et al.</i> (2015) ²⁸ ; n~450	First-line treatment of HER2 ⁻ , c-MET ⁺ unresectable, locally advanced or metastatic GC/GEJ cancer	CX + placebo versus CX + 15 mg/kg rilotumumab	NR	NR
METGastric (YO28322); Shah <i>et al.</i> (2016) ²⁶ ; n=562	First-line treatment of HER2 ⁻ , c-MET ⁺ , metastatic GC/GEJ cancer	mFOLFOX6 + placebo versus mFOLFOX6 + onartuzumab	<p>Patients stratified by c-MET⁺ scores:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1+: ≥50% of tumour cells with weak or stronger staining but <50% with moderate or higher intensity staining; 2+: ≥50% of tumour cells with moderate or higher intensity staining but <50% with strong intensity staining; 3+: ≥50% of tumour cells with strong staining intensity following IHC with the CONFIRM SP44 anti-MET rabbit mAb 	<ul style="list-style-type: none"> OS in the ITT group 11.3 months in the placebo group versus 11.0 months in the onartuzumab group, P=0.24; OS in patients with c-MET⁺ scores of 2+ or 3+ 9.7 months in the placebo group versus 11 months in the onartuzumab group, P=0.062

CI, confidence interval; CX, cisplatin and capecitabine; ECX, epirubicin, cisplatin and capecitabine; GC, gastric cancer; GEJ, gastro-oesophageal junction; IHC, immunohistochemistry; ITT, Intention to treat; mAb, monoclonal antibody; mFOLFOX6, 5-fluorouracil, folinic acid and oxaliplatin; NR, not reported; OS, overall survival; PFS, progression-free survival. *Study terminated early owing to an imbalance in incidences of mortality in the control and treatment arms.

Tableau 3 . Essais cliniques de phase II (au dessus) et de phase III (en dessous) ayant évalué l'efficacité des thérapies ciblées anti HGF/MET dans le cancer gastrique.

D'après Bradley *et al.* Nature Reviews (2017)

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce manque d'efficacité. Premièrement le critère de sélection des patients basé sur l'expression intra tumorale de cMET évaluée par IHC, qui ne semble pas être un critère permettant d'identifier les tumeurs répondant à ces thérapies ciblées pour plusieurs raisons. D'une part l'absence de critères spécifiques de la positivité de l'hyperexpression en IHC ainsi que les inconvénients classiques liés à cette technique : faux positifs, hétérogénéité intra-tumorale qui pourraient induire une sélection à tort de patients non répondeurs. D'autre part l'hyperexpression protéique de cMET pourrait ne pas forcément traduire une addiction oncogénique de la tumeur à cette voie de signalisation, mais plutôt être le reflet d'activation de voies alternatives. D'autres biomarqueurs, seuls ou en combinaison, pourraient donc être nécessaires pour sélectionner les patients : telles que les amplifications de *MET*, les mutations de *MET* (notamment entraînant une délétion de l'exon 14) ou encore l'expression de l'ARN de *MET* détectée par hybridation in situ. Ainsi, dans une étude réalisée *in vitro* sur des lignées de CG et *in vivo* dans des modèles murins, le traitement par un anticorps anti-cMET (ABT-700) induisait une régression des tumeurs ayant une amplification de *MET*¹⁹⁸. Une autre hypothèse pouvant expliquer les résultats négatifs de ces essais cliniques est l'impact des thérapies ciblées (TC) anti HGF/MET sur les autres éléments du MET et notamment sur le système immunitaire. L'effet anti-tumoral de ces TC pourrait en effet être contrebalancé par l'effet pro-tumoral observé par l'inhibition de cMET sur les neutrophiles¹⁹⁹. Enfin, étant donné les cross-talk de la voie HGF/MET avec de nombreux autres axes de signalisation, l'absence d'efficacité des AC monoclonaux ciblés pourrait s'expliquer par l'activation de voies alternatives, suggérant la

nécessité de combiner plusieurs thérapies ciblées. A ce jour, à notre connaissance, un seul essai thérapeutique est actuellement en cours pour évaluer l'efficacité d'un anticorps bi-spécifique anti-cMET et anti-EGFR chez des patients atteints de cancer (notamment gastrique) présentant une mutation oncogénique de l'EGFR et/ou une mutation de l'exon 14 de *MET* (NCT04868877)

2. Inhibiteurs de tyrosine kinase

Ces dernières années ont vu naître de nombreuses molécules inhibant l'activité catalytique de cMET. Ces ITK peuvent être sélectifs pour le domaine kinase de cMet ou non sélectifs et inhiber également d'autres cibles. Actuellement plusieurs ITK ciblant cMet sont ainsi utilisés en pratique clinique en France et dans le monde :

- Le Crizotinib : ITK non sélectif, inhibant également ALK, RON, AXL et TIE2. Il est indiqué en France dans le cancer du poumon ALK positif ou ROS1 positif.
- Le Cabozantinib ITK non sélectif inhibant également le VEGFR-2, c-RET, c-KIT, FLT3 et TIE2. Il est indiqué en France dans le cancer du rein (en monothérapie ou en association au nivolumab), dans le carcinome hépatocellulaire et dans le carcinome thyroïdien.
- Le Tepotinib : ITK sélectif de cMET, indiqué en France dans le cancer pulmonaire ayant une mutation de l'exon 14 de *MET*.
- Le Capmatinib : ITK sélectif de cMET, indiqué en France dans le cancer pulmonaire ayant une mutation de l'exon 14 de *MET*.
- Le Savolitinib : ITK sélectif de cMET, récemment approuvé en Chine dans le cancer pulmonaire avec mutation de l'exon 14 de *MET*. Non approuvé en France.

Dans le CG, aucun ITK sélectif ou non sélectif de cMET ne dispose actuellement d'une indication, bien que de plus en plus d'études aient montré des signaux d'efficacité intéressants de ces molécules. Plusieurs case-reports ou essais précoces ont suggéré une efficacité du Cabozantinib pour les CG présentant une amplification de *MET*^{200 188}. L'AMG 337, ITK sélectif de cMET, a été évalué en monothérapie dans un essai de phase II ayant inclus 45 patients atteints de CG présentant une amplification de *MET* et ayant reçu au moins une ligne de traitement. Dans cet essai le taux de réponse était de 18% et le taux de stabilité était de 36%²⁰¹. Dans le programmes AcSé (Accès Sécurisé à des thérapies innovantes), qui est un programme de recherche français visant à ouvrir les indications de prescription des médicaments innovants à d'autres cancers en basant la stratégie thérapeutique sur le profil biologique de la tumeur et non pas sur l'organe d'origine, 35 patients atteints de cancer oesogastrique présentant une amplification de *MET* ont été traités par Crizotinib avec des résultats encourageants, notamment un taux de réponse tumorale de 33%²⁰². Dans l'essai coréen VIKTORY, 20 patients présentant un CG avancé avec une amplification de *MET*, et ayant reçu au moins une ligne de chimiothérapie, ont été traités par savolitinib en monothérapie avec un taux de réponse tumorale de 50%²⁰³. Dans cet essai, le nombre de copies de *MET* était positivement corrélé à la réponse tumorale et à la durée de la survie sans progression. De manière intéressante, les patients qui présentaient une co-amplification d'autres gènes codant pour des récepteurs de tyrosine kinase concurrents ne bénéficiaient pas du traitement par savolitinib. Par ailleurs, dans une autre étude chinoise de phase Ia/Ib récente portant sur l'efficacité du savolitinib dans le CG avancé, une réponse tumorale n'était observée que chez les patients ayant une amplification de *MET* alors que les tumeurs non

amplifiées ne présentaient aucune réponse, même lorsqu'elles présentaient une surexpression de cMET²⁰⁴. Ces résultats suggèrent donc l'importance des critères de sélection pour déterminer les patients susceptibles de répondre à ce type de TC.

Plusieurs essais de phase I et II sont actuellement en cours pour évaluer l'efficacité d'ITK ciblant MET dans le CG porteurs d'une altération de *MET* (amplification et/ou mutation de l'exon 14), en monothérapie (NCT04923932 ; NCT03993873) ou en association à la chimiothérapie (NCT05439993), à d'autres thérapies ciblées (NCT04868877) ou à de l'immunothérapie (NCT05620628).

CHAPITRE IV. RÔLES DU SYSTEME IMMUNITAIRE EN CONTEXTE TUMORAL

La tumorigenèse est un phénomène progressif au cours duquel la cellule normale acquiert un certain nombre de modifications aboutissant à une dérégulation de sa croissance et au développement d'une tumeur. En 2000, Hanahan et Weinberg établissaient 6 caractéristiques fondamentales (ou « hallmarks ») propres aux cellules tumorales permettant la tumorigenèse: l'auto-suffisance en signaux de prolifération, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la prolifération, la capacité d'invasion et de dissémination à distance, la capacité anormale de réplication et de division, la capacité à induire la formation de néo-vaisseaux sanguins (angiogénèse) et l'échappement aux processus de mort cellulaire (apoptose)²⁰⁵.

Dans ces 6 « hallmarks », Hanahan et Weinberg décrivaient les caractéristiques intrinsèques à la cellule tumorale, souvent liées à l'acquisition d'anomalies génétiques, mais ne prenaient pas (ou peu) en compte les interactions avec son environnement. En effet, une tumeur n'est pas constituée de cellules tumorales identiques et isolées, mais plutôt d'un ensemble hétérogène et complexe de cellules tumorales, de cellules non tumorales, telles que les cellules immunitaires ou les fibroblastes, de nutriments, d'agents infectieux tels que des bactéries ou des virus, formant le MET. Il est bien démontré aujourd'hui que la tumorigenèse ne dépend pas uniquement des altérations moléculaires et cellulaires propres à la cellule tumorale mais aussi de ses interactions au sein du MET. Ainsi, de nouvelles caractéristiques prenant en compte le rôle du MET ont été ajoutées au 6 hallmarks initiaux, notamment la

capacité d'échapper au système immunitaire. La découverte de ce phénomène et des mécanismes qui le sous-tendent a constitué une des avancées majeures dans la compréhension de la biologie du cancer.

I. Historique et concept d'immunosurveillance

Il aura fallu plusieurs décennies de controverses scientifiques pour que le rôle du système immunitaire dans le contrôle et la croissance tumorale soit clairement établi.

Pourtant, dès la fin du XIX^{ème} siècle, William Coley avait observé une régression tumorale chez certains patients atteints de cancer et présentant une infection bactérienne aiguë. A partir de ces observations, ce chirurgien développa un vaccin à partir de bactéries inactivées, appelé toxine de Coley, induisant une réponse inflammatoire importante et se traduisant notamment par une fièvre élevée. L'inoculation de ce vaccin était associée à une régression de la tumeur chez certains patients, atteints pour la plupart de sarcomes mais aussi d'autres types tumoraux. Ainsi William Coley fut le premier à établir un lien entre contrôle tumoral et réponse immunitaire. Cependant devant l'essor de la chimiothérapie et de la radiothérapie, cette piste de recherche en cancérologie fut abandonnée. Au début du XX^{ème} siècle Paul Ehrlich, scientifique allemand, formulait l'hypothèse que le système immunitaire pouvait empêcher le développement des carcinomes et c'est finalement en 1957 que Sir MacFarlane Burnet et Lewis Thomas nomment pour la première fois le concept d'« immunosurveillance anti-tumorale ». Ils décrivent ainsi que les cellules immunitaires sont capables de reconnaître et de détruire les cellules tumorales, via la reconnaissance d'antigènes spécifiques exprimés par les cellules tumorales.

Ce concept fut remis en question par des travaux réalisés dans les années 1970 portant sur des souris athymiques (ou souris « nude ») immunodéficientes. Il a en effet été observé par plusieurs équipes que l'incidence des tumeurs, spontanées ou induites par un agent carcinogène, n'était pas plus élevée chez ces souris nude que chez des souris immunocompétentes, contredisant donc le rôle de contrôle et de suppression tumorale du système immunitaire. Mais en 1990, les progrès en immunologie remettent en lumière la notion d'immunosurveillance anti-tumorale. En effet, il est alors établi que les souris nude athymiques, considérées jusqu'alors comme immunodéficientes, conservent en fait certaines populations de cellules immunitaires comme les cellules natural killer (cellules NK), les lymphocytes B (LB), et certaines populations de lymphocytes T (LT). Plusieurs travaux réalisés chez la souris confirment alors l'importance particulière des cellules NK, des LT cytotoxiques et de l'interféron γ pour le contrôle tumoral. Notamment, il a été montré que les souris transgéniques RAG2 (-/-), déficientes en LT et en LB et/ou STAT1 (-/-) insensibles aux interférons de type 1 et 2 développaient plus de tumeurs, spontanées ou secondaires à l'administration d'un agent carcinogène, que des souris contrôle immunocompétentes²⁰⁶

Chez l'Homme, après la formulation des premières hypothèses scientifiques décrites ci-dessus, l'implication du système immunitaire dans le contrôle tumoral a d'abord été mis en évidence par l'augmentation de l'incidence des cancers observée dans des cohortes épidémiologiques de patients immunodéprimés, notamment chez des patients atteints de Syndrome d'Immunodéficience Acquis (SIDA) lié au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) ou chez des patients transplantés d'organe nécessitant un traitement

immunosuppresseur au long cours. Cette augmentation semble être particulièrement liée à des agents viraux (notamment : cancers ORL, digestifs ou gynécologiques liés au Human Papilloma Virus-HPV, sarcome de Kaposi lié au Human Herpes Virus de type 8-HHV8) mais est également observée pour des cancers non viro-induits tels que les mélanomes ou les cancers du côlon²⁰⁷.

Plus tard, de nombreux travaux ont confirmé chez l'Homme le rôle majeur des LT dans le contrôle de la croissance tumorale observé chez les souris RAG2^{-/-}. Notamment, il a été montré dans de nombreuses localisations tumorales (mélanome, cancer colorectal, cancer de l'ovaire, cancer du sein...) que l'infiltration de la tumeur par les LT était associée à un meilleur pronostic que lorsque les tumeurs étaient peu infiltrées.

Cells	CD8 ⁺ CD45RO ⁺ T cells
Melanoma	Good ¹⁰³⁻¹⁰⁶
Head and neck cancers	Good ^{90,109,110}
Breast cancer	Good ¹¹¹⁻¹¹⁴
Bladder cancer	Good ^{110,119}
Ovarian cancer	Good ¹²⁰⁻¹²²
Oesophageal cancer	Good ^{126,127}
Colorectal cancer	Good ^{5,6,20,55,56,63,79,130-140}
Renal cell carcinoma	• Good ¹⁵ • Poor ¹⁵
Prostatic adenocarcinoma	Good ¹⁵¹⁻¹⁵³
Lung carcinoma	• Good ^{13,154-157} • None ¹⁵⁵
Pancreatic cancer	Good ¹⁶⁵
Cervical cancer	
Anal squamous cell carcinoma	
Brain cancer	
Hepatocellular carcinoma	• Good ^{167,168} • Poor ²⁰
Gastric cancer	
Medulloblastoma	
Merkel cell carcinoma	Good ¹⁷⁴
Urothelial cell carcinoma	Good ¹¹⁹

Figure 8. Rôle pronostique de l'infiltration en lymphocytes T CD8⁺ dans différents cancers.

Dans la majorité des cancers, l'infiltration en lymphocytes T CD8⁺ effecteurs/mémoires (CD8⁺ CD45RO⁺) est associée à un bon pronostic.

D'après Fridman et al. Nature Reviews Cancer (2012)

Dans des travaux réalisés par l'équipe française de Pagès et Galon, l'infiltration tumorale en LT CD8⁺ et CD3⁺ quantifiée au sein de la tumeur et au front d'invasion tumorale (Immunoscore[®]) avait une valeur pronostique supérieure à la classification anatomopathologique pour prédire le risque de récurrence de tumeurs coliques localisées opérées²⁰⁸.

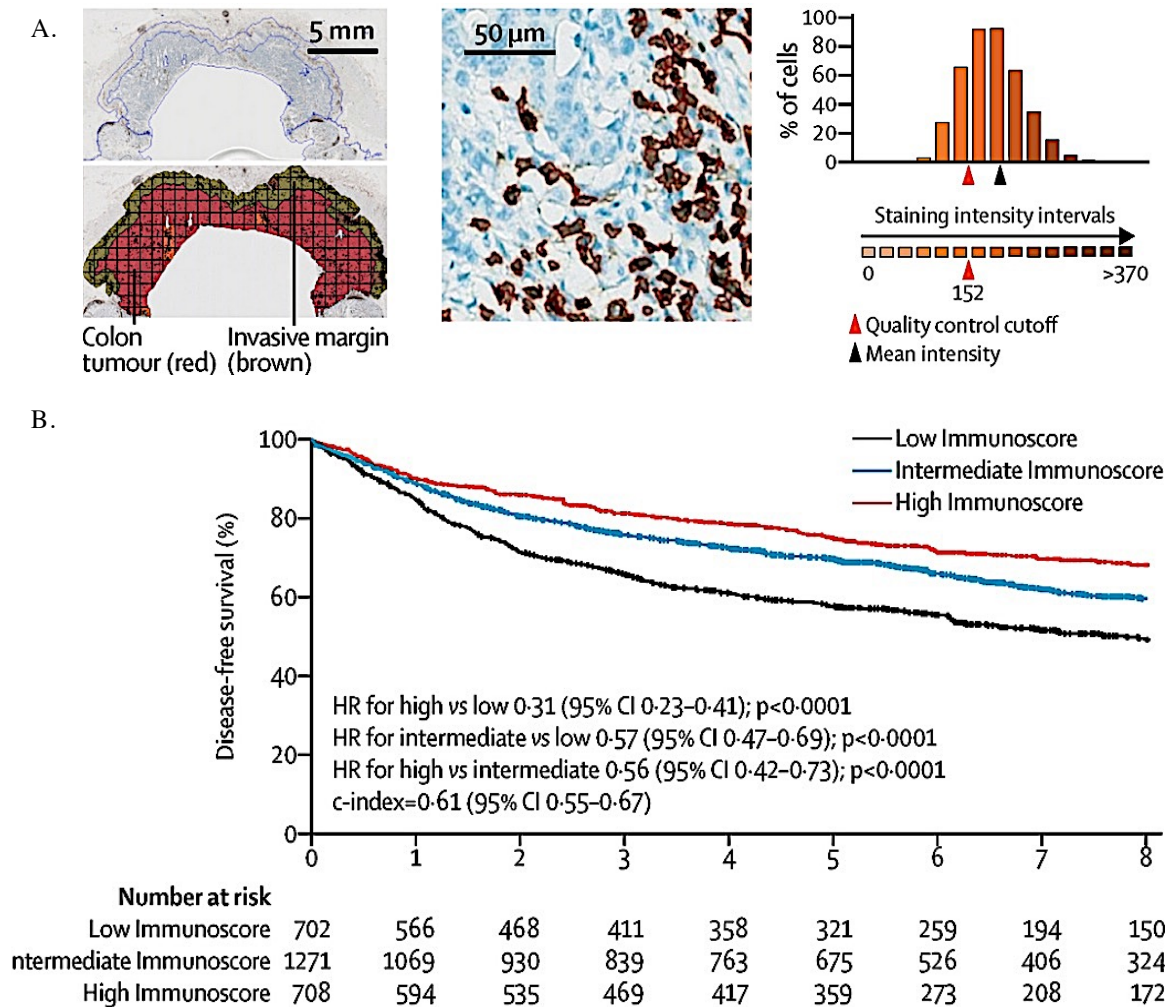


Figure 9. Immunoscore[®] et risque de récurrence après chirurgie dans le cancer colorectal.

L'immunoscore est une méthode d'évaluation digitale de l'infiltration lymphocytaire tumorale mise au point dans le cancer colorectal.

A. La densité en lymphocytes TCD8⁺ et CD3⁺ est évaluée au sein de la tumeur et au front d'invasion tumoral par mesure automatisée de l'intensité du marquage immunohistochimique, résultant en un score (faible, intermédiaire ou élevé).

B. Un immunoscore élevé est associé à une meilleure survie sans maladie après chirurgie du cancer colorectal, et ce indépendamment des autres paramètres cliniques et histologiques notamment du statut MSI.

D'après Pagès et al. The Lancet (2018)

Les données accumulées chez la souris et chez l'Homme confirment donc le rôle clé du système immunitaire, notamment des LT, dans la protection contre le développement des tumeurs.

II. Réponse immunitaire anti tumorale : principaux acteurs

Au-delà des LT cytotoxiques, la valeur pronostique de l'infiltration tumorale par différentes populations cellulaires immunitaires et dans différentes localisations tumorales a été étudiée par de nombreuses équipes. Il a ainsi pu être mis en évidence qu'à l'inverse des lymphocytes T cytotoxiques, certaines classes de cellules immunitaires telles que certains types de macrophages (macrophages M2, décrits ci-après) étaient associées à un mauvais pronostic lorsqu'elles étaient retrouvées en forte quantité au sein de la tumeur. Pour d'autres populations ce rôle pronostic peut être différent selon les études et selon les localisations tumorales.

Il apparaît donc que le rôle du système immunitaire n'est pas limité à une simple reconnaissance et élimination de la cellule tumorale par les cellules T effectrices lors de l'initiation du cancer, mais qu'il s'agit d'interactions bien plus complexes et dynamiques, faisant intervenir l'ensemble des acteurs de l'immunité innée et adaptative.



Figure 10. Impact pronostique de l'infiltrat immunitaire intra-tumoral dans différents cancers.

L'impact pronostique de l'infiltrat immunitaire intra-tumoral varie selon le type de population étudiée et peut être différent en fonction de la localisation tumorale. Cette figure représente la valeur pronostique des différentes populations immunitaires (vert foncé : fortement positive, vert clair : faiblement positive, rouge foncé : fortement négative, rouge clair : faiblement négative) dans différents cancers selon les données issues de plus de 200 études. La taille des cercles correspond au nombre de patients inclus dans les études. CD8⁺ T cells : LT CD8⁺, TLS : structures lymphoïdes tertiaires ; T_{reg} cell : lymphocytes T régulateurs ; M : macrophages CD68⁺ ; M1 : macrophages M1 ; M2 : macrophages M2.

D'après Fridman et al. Nature Reviews Cancer (2012)

A. Acteurs de la réponse immunitaire innée

1. Cellules Natural Killer

Les cellules natural killer (NK) sont des acteurs de la réponse immunitaire non spécifique qui expriment deux types de récepteurs : les récepteurs activateurs (notamment le NKG2D), et les récepteurs inhibiteurs cytotoxiques (dont certains killer inhibitory receptor : KIR). Les récepteurs activateurs peuvent lier différents ligands surexprimés par la cellule en réponse à

un stress cellulaire. A l'inverse, les récepteurs inhibiteurs reconnaissent des molécules exprimées de manière physiologique et ubiquitaire sur les cellules normales, en particulier les molécules du CMH-I. La reconnaissance de ces molécules inhibitrices représente ainsi un des mécanismes garantissant la tolérance immunitaire envers les cellules du soi. L'activation des cellules NK peut donc être liée soit à la présence de signaux activateurs à la surface cellulaire, soit à l'absence de signaux inhibiteurs (aussi appelé signal de « soi-manquant), soit encore à la balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs. L'activation des cellules NK va entraîner une action cytolytique pro-apoptotique directe via le système perforine-granzymes, et par l'activation des voies FAS-FAS-L et TRAIL-TRAIL-R. Elles peuvent également avoir une action cytolytique indirecte via la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et la production d'interferon gamma induisant notamment l'activation des LT CD4+ et CD8+.

En situation de cancer, les cellules NK jouent un rôle anti-tumoral majeur. Les cellules NK circulantes peuvent être recrutées au niveau de la tumeur par la sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires du MET ²⁰⁹. Une fois dans le MET, les cellules NK peuvent s'activer en fonction des signaux activateurs et inhibiteurs reçus, et ainsi induire une cytotoxicité directe sur la cellule tumorale. Leur activation va également entraîner la production de cytokines telles que l'IFN γ et le TNF, ayant un effet pro-apoptotique et anti-prolifératif direct sur les cellules tumorales, en plus de leur effet pro-inflammatoire et de renforcement de la réponse immunitaire notamment CD8+ ²¹⁰.

2. Macrophages

Les macrophages sont des cellules phagocytaires de l'immunité innée présentes dans la plupart des tissus normaux et impliquées dans de nombreux processus en situation physiologique telles que le développement et l'homéostasie tissulaire, l'élimination des débris cellulaires et l'élimination des pathogènes ²¹¹. Les macrophages tissulaires sont issus, pour une grande partie, des monocytes circulants. Même s'ils ont un progéniteur myéloïde commun ²¹², ils représentent une population cellulaire hétérogène et hautement plastique. En effet, de nombreuses sous-populations de macrophages tissulaires ont été décrites, présentant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles différentes. Ces sous-populations sont généralement divisées en deux grandes catégories : les macrophages de type M1 et les macrophages de type M2 ²¹³. La polarisation M1 est liée à l'exposition à certains facteurs de croissance et cytokines tels que le GM-CSF, l'IFN γ ou le TNF α . Les macrophages M1 vont exercer leur fonction de phagocytose, mais aussi promouvoir une réponse pro-inflammatoire de type Th1 via la sécrétion de cytokines telles que le TNF α , l'IL1 β et l'IL12, et induire le recrutement de cellules Th1 via la sécrétion de chimiokines telles que CXCL9 et CXCL10 ²¹⁴.

La polarisation des macrophages de type M2 survient en présence de facteurs de croissance tels que le M-CSF et le TGF β , ou d'interleukines telles que l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 ²¹⁵. En situation physiologique, les macrophages M2 sont impliqués notamment dans les processus de cicatrisation et de réparation tissulaire et dans la régulation de la réponse immunitaire. Différentes sous-populations de macrophages M2 sont décrites ayant des spécificités propres (M2a, M2b et M2c) ^{216 217}.

En situation de cancer, les monocytes circulants et les macrophages tissulaires résidents peuvent être recrutés par la tumeur via la production de chimiokines par la cellule tumorale et les autres cellules immunitaires du micro environnement^{218 219 214}. Les macrophages associés aux tumeurs (Tumor Associated Macrophages – TAMs) représentent une sous population de macrophages à part entière. Longtemps assimilés à des macrophages M2, il est à présent bien démontré que des TAMs M1-like et M2-like peuvent coexister au sein de la tumeur et qu'il existe une plasticité entre les deux phénotypes, une même cellule pouvant passer de l'un à l'autre selon les modifications de l'environnement dans lequel elle se trouve²²⁰. Il a ainsi été montré que les TAMs présentent des signatures géniques communes aux macrophages M1 et M2. Par leur capacité à phagocyter la cellule tumorale et à induire une réponse pro-inflammatoire, les TAMs M1-like sont généralement associés à un rôle de protection anti-tumorale²²¹. A l'inverse les TAMs M2-like sont associés à de nombreuses propriétés pro-tumorales telles que la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, la dissémination métastatique, ou encore une suppression de la réponse immunitaire²²². Les TAMs M2-like sont dans la plupart des localisations tumorales associés à un mauvais pronostic.

3. Monocytes

Les monocytes sont des cellules phagocytaires mononuclées retrouvées dans la circulation sanguine et capable de migrer dans les tissus à l'état physiologique et en réponse à une agression, jouant ainsi un rôle fondamental dans l'homéostasie tissulaire²²³. Bien qu'issus d'un progéniteur commun, les monocytes représentent une population cellulaire hétérogène possédant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles différentes.

Hétérogénéité monocytaire et caractérisation

Les monocytes humains expriment de façon universelle le CMH de classe II, l'HLA-DR, le CD11b et le CD86. Depuis les années 2000, trois grandes sous populations de monocytes sont classiquement reconnues : les monocytes classiques (CD14⁺ CD16⁻), les monocytes intermédiaires (CD14⁺ CD16⁺) et les monocytes non classiques (CD14^{int} CD16⁺) ²²⁴. Cependant, l'évolution des techniques d'analyse, notamment l'apparition de la cytométrie de masse et du séquençage ARN Single Cell, a permis de mettre en évidence chez la souris et chez l'Homme de nouvelles sous-populations monocytaires minoritaires ^{225 226}. D'avantage de données sont nécessaires pour caractériser ces nouvelles sous populations notamment d'un point de vue fonctionnel.

Origine des monocytes

Les monocytes retrouvés dans la circulation sont issus d'un progéniteur commun identifié chez l'Homme dans la moelle osseuse et dans le sang de cordon ombilical ²²⁷. Ce progéniteur monocytaire commun (common monocyte progenitor –cMoP) est un progéniteur unipotent qui exprime le CD117 et le CD64 dont la production est régulée par l'expression séquentielle de facteurs de transcription tels que PU.1, IRF8 et KLF4 ²²⁸. Les différentes sous populations monocytaires sont ensuite générées à partir des cMoPs. Schématiquement les cMoPs se différencient d'abord en monocytes classiques dans la moelle osseuse puis en monocytes non classiques dans la circulation sanguine, les monocytes intermédiaires représentant un état transitionnel entre ces deux populations ²²⁹. Cependant des travaux récents suggèrent que certains monocytes non classiques pourraient être différenciés directement à partir d'un

progéniteur spécifique, non identifié à ce jour ²³⁰. Après leur différenciation, la sortie des monocytes classiques de la moelle et leur migration vers les ganglions lymphatiques et les tissus est médiée par l'expression du CCR2 et de ses ligands CCL2, CCL7 et CCL12. Une fois dans la circulation sanguine, la demi-vie des monocytes classiques est de 1 jour alors que celle des monocytes non classiques est de 7 jours ²³¹. Les monocytes peuvent être retrouvés dans certains tissus notamment la peau, les poumons et les ganglions lymphatiques ainsi que dans les tumeurs humaines. Cependant lors de leur arrivée au sein des tissus une grande partie des monocytes vont se différencier en macrophages ou en CD (qui seraient préférentiellement issues des monocytes classiques), sous l'effet notamment de facteurs de croissance tels que le CSF-1 et le GM-CSF et de facteurs de transcription tels que IRF4 et MAFB.

Rôles en situation physiologique

Les monocytes classiques sont recrutés préférentiellement au sein des tissus en cas d'inflammation ou de lésion où ils vont se différencier en macrophages et en cellules dendritiques. Ils jouent également un rôle direct via la phagocytose et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs anti-microbiens ^{232 233}.

Les monocytes non classiques ont une fonction principale de surveillance en « patrouillant » dans la circulation sanguine. Ils absorbent les débris cellulaires issus des cellules endothéliales et repèrent les cellules endothéliales endommagées présentant des signaux anormaux. En cas de détection de tel signal, les monocytes non classiques vont favoriser le recrutement de neutrophiles via l'expression de TLR7, qui vont éliminer la cellule endommagée ²³⁴. Lors d'une inflammation ou d'une agression tissulaire, ils sont également capables de quitter la

circulation sanguine pour migrer vers le tissu lésé, bien qu'en proportion moindre par rapport aux monocytes classiques. Au sein du tissu, certains monocytes non classiques seraient capables de se différencier en macrophages, qui présenteraient cependant un phénotype particulier anti-inflammatoire ²³⁵ et seraient donc d'avantage impliqués dans la réparation tissulaire.

Les monocytes intermédiaires représentent une population hétérogène dont l'étude est rendue complexe notamment par les différentes définitions selon les études et les techniques utilisées (phénotypiques, profil génomique). Plusieurs travaux suggèrent ainsi que les monocytes intermédiaires représentent en réalité plusieurs sous populations qui pourraient avoir des propriétés fonctionnelles différentes. Les monocytes intermédiaires semblent être particulièrement impliqués dans l'angiogenèse via l'expression de plusieurs marqueurs de surface pro-angiogéniques tels que VEGFR-2 et Tie-2. Il a été également observé que seule cette population monocyttaire était capable de proliférer et de se regrouper en cluster après stimulation par le VEGF ²³⁶.

Rôles en situation tumorale

Les monocytes peuvent être recrutés par la tumeur tout au long de la croissance tumorale, de la phase précoce au stade de dissémination métastatique. Ce recrutement semble essentiellement médié par le CCL2, produit par la tumeur en quantité croissante au cours de la progression tumorale.

Les monocytes peuvent avoir une action anti-tumorale directe via la phagocytose et la production de cytokines induisant l'apoptose ou indirecte par la cytotoxicité médiée par les

anticorps ²³⁷ ²³⁸. Il a notamment été montré *in vitro* que les monocytes exposés à l'IFN- γ produisent la protéine TRAIL et sont capables d'induire la mort de la cellule tumorale ²³⁹.

Les monocytes peuvent également agir sur différentes cellules immunitaires :

- Impact sur les cellules NK : Les monocytes, pourraient également avoir un effet anti-tumoral via le recrutement au sein de la tumeur primitive ou métastatique de cellules NK. Ce rôle semble spécifique aux monocytes non classiques via l'expression de chimiokines telles que CCL3 CCL4 et CCL5 ²⁴⁰.
- Impact sur les LT CD8+ Les monocytes peuvent également jouer un rôle pro-tumoral, notamment via l'inhibition de l'accumulation des LT CD8⁺. En effet le recrutement de monocytes au sein de la tumeur semble être négativement corrélé à l'infiltrat tumoral en lymphocytes T CD8⁺ : dans des modèles murins de tumeurs du pancréas, du foie et de mélanome l'inhibition de CCR2 était associée à une diminution de l'accumulation de monocytes intra tumoraux, une augmentation des LTCD8⁺ intra tumoraux et une inhibition de la croissance tumorale ²⁴¹. Dans cette étude, aucun effet anti-tumoral secondaire à l'inhibition de CCR2 n'était observé chez les souris déficientes en LT CD8⁺. Chez l'Homme, il a été observé *in vivo* que l'expression de CCL2 par des tumeurs du foie était négativement corrélée au nombre de lymphocytes T CD8⁺ intra tumoraux ²⁴¹. Chez des patients atteints de cancer du pancréas, une forte infiltration en LT CD8⁺ et une faible expression intra tumorale de CCR2 sont associées à une meilleure survie ²⁴².
- Recrutement de Tregs Un autre mécanisme conférant un rôle pro-tumoral aux monocytes est le recrutement de cellules immunosuppressives tels que les Tregs. En effet in a été montré que les monocytes intra tumoraux sont capables de se différencier en cellules

myéloïdes suppressives (MDSC) produisant du CCL5, impliqué dans le recrutement de Tregs²⁴³. La co-existence de Tregs et monocytes pourrait ainsi potentialiser l'impact immunosuppresseur de ces deux populations cellulaires : en effet, les Tregs sont capables de produire des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 qui pourraient moduler la différenciation des monocytes intra tumoraux en TAM pro tumoraux²⁴⁴. Cet effet pro-tumoral des monocytes via l'induction de Tregs semble particulièrement imputé aux monocytes classiques. A l'inverse, une équipe a montré que les monocytes non classiques étaient capables d'avoir un effet cytotoxique médié par les anticorps sur les Tregs *in vitro*²⁴⁵.

- Impact sur l'angiogenèse Au-delà des cellules tumorales et des cellules immunitaires, les monocytes intra tumoraux sont capables de moduler d'autres éléments du MET. Ainsi plusieurs études ont montré que les monocytes pouvaient avoir un rôle pro-angiogénique en situation tumorale. Chez des patients atteints de cancer du rein, les monocytes périphériques produisaient davantage de VEGF, et avaient donc un rôle pro-angiogénique plus important, comparés aux monocytes de volontaires sains²⁴⁶. De plus, certains monocytes (parmi les monocytes intermédiaires et non classiques) expriment le récepteur à l'angiopoïétine Tie2 et sont capables de promouvoir l'angiogenèse via la production de facteurs tels que le VEGF et le TNF α ^{247 248 249}.
- Différenciation en TAM et en cellules dendritiques. Une fois au sein de la tumeur, les monocytes issus de la circulation périphérique peuvent se différencier en tumor associated macrophages (TAMs) ou en CD (appelées monocyte-derived dendritic cells : mono-DC). La cinétique précise de la différenciation des monocytes en TAM est complexe

et n'est que partiellement élucidée. Dans le cancer du sein, les monocytes classiques exprimant CCR2 acquièrent des marqueurs associés au TAM (tels que CD11c, MHCII, V-CAM1) 5 jours après leur arrivée dans la tumeur²⁵⁰. Les TAMs dérivés des monocytes sont généralement reconnus comme pro-tumoraux M2-like tels que décrits plus tôt. Les CD issues des monocytes (mono-DC) représentent une population minoritaire au sein des cellules myéloïdes infiltrant les tumeurs. Les propriétés des DC intra tumorales sont décrites dans le chapitre correspondant.

Les stimuli et mécanismes qui sous-tendent le devenir du monocyte après sa migration au sein du tissu en situation physiologique ou en situation tumorale (différenciation en macrophage ou en CD, persistance en tant que monocyte, ou apoptose) ne sont pas complètement élucidés.

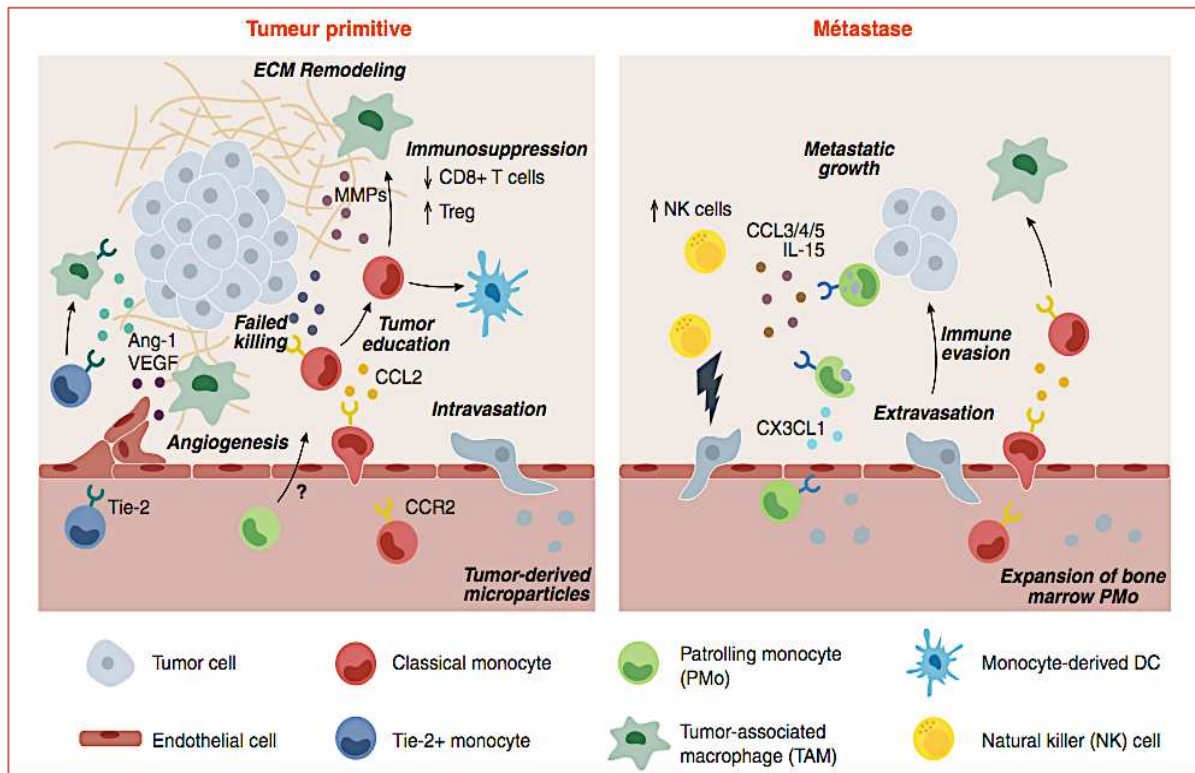


Figure 11. Rôles des différentes populations monocytaires en situation tumorale.

En réponse à la sécrétion intra tumorale de CCL2, les monocytes classiques CCR2+ peuvent extravaser de la circulation sanguine vers le site primitif et les lésions métastatiques. Au sein de la tumeur, les monocytes classiques sont capables de produire des facteurs tumoricides, mais sont également reprogrammés par le microenvironnement tumoral pour limiter leur cytotoxicité. Ils peuvent ainsi se différencier en TAMs ou en CD sous l'effet de différents stimuli. Les TAMs dérivés des monocytes facilitent la tumorigenèse par plusieurs mécanismes : immunosuppression (inhibition du recrutement/de l'activation des cellules T CD8+ et recrutement de Treg), remodelage de la matrice extra cellulaire, stimulation de l'angiogenèse et intravasation des cellules tumorales. Les monocytes Tie-2+ sont également capables de stimuler l'angiogenèse tumorale au sein de la tumeur primitive. Les monocytes non classiques (PMo) peuvent être recrutés au sein des métastases via l'axe CX3CL1/CX3CR1, où ils produisent des chimiokines qui stimulent le recrutement de cellules NK cytotoxiques jouant ainsi un rôle anti-tumoral.

D'après Olingy et al. J Leukoc Biol (2019)

B. Acteurs de la réponse immunitaire acquise

1. Cellules dendritiques

Rôle en situation physiologique

Les CD sont des cellules présentatrices d'antigène « professionnelles » capables d'initier, de coordonner et de réguler la réponse immunitaire adaptative. Les CD humaines sont caractérisées par l'expression du CD11c et du CMH-II, et peuvent exprimer d'autres marqueurs caractérisant différentes sous populations ²⁵¹. On distingue deux grands stades de maturation au cours desquels les CD vont avoir des propriétés fonctionnelles et phénotypiques différentes : le stade immature et le stade mature.

Au stade immature, les CD sont retrouvées dans tous les tissus périphériques où elles jouent un rôle de sentinelle ²⁵². Leur fonction principale est alors la capture antigénique assurée par plusieurs mécanismes : la macropinocytose, l'endocytose induite par la reconnaissance de structures communes à différents pathogènes (Pathogen Associated Molecular Pattern – PAMP) ou libérées lors de lésions tissulaires (Damage Associated Molecular Pattern – PAMP) ; et la phagocytose ²⁵³. Une fois l'antigène capté, la CD va migrer vers les organes lymphoïdes secondaires et entamer sa maturation qui s'accompagne de plusieurs phénomènes : l'apprêtement de l'antigène et la formation de complexes CMH/peptide, l'expression de molécules de co-stimulation activatrices telles que B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) ou CD40. Au contact de la CD mature, le LTCD4+ va en effet pouvoir polariser sa différenciation en différents types de LT helper (Th) et le LT CD8+ va se différencier en LT cytotoxique. Ce phénomène de différenciation représente un processus complexe qui peut être influencé par les cytokines présentes au sein du tissu d'origine de la CD, de son état de maturation et du

type de stimuli ayant entraîné l'activation de la CD. Au stade mature, la CD a donc acquis une fonction de présentation antigénique et une capacité à induire une réponse cellulaire T spécifique, mais présente des capacités de captation antigénique et d'endocytose réduites ²⁵⁴.

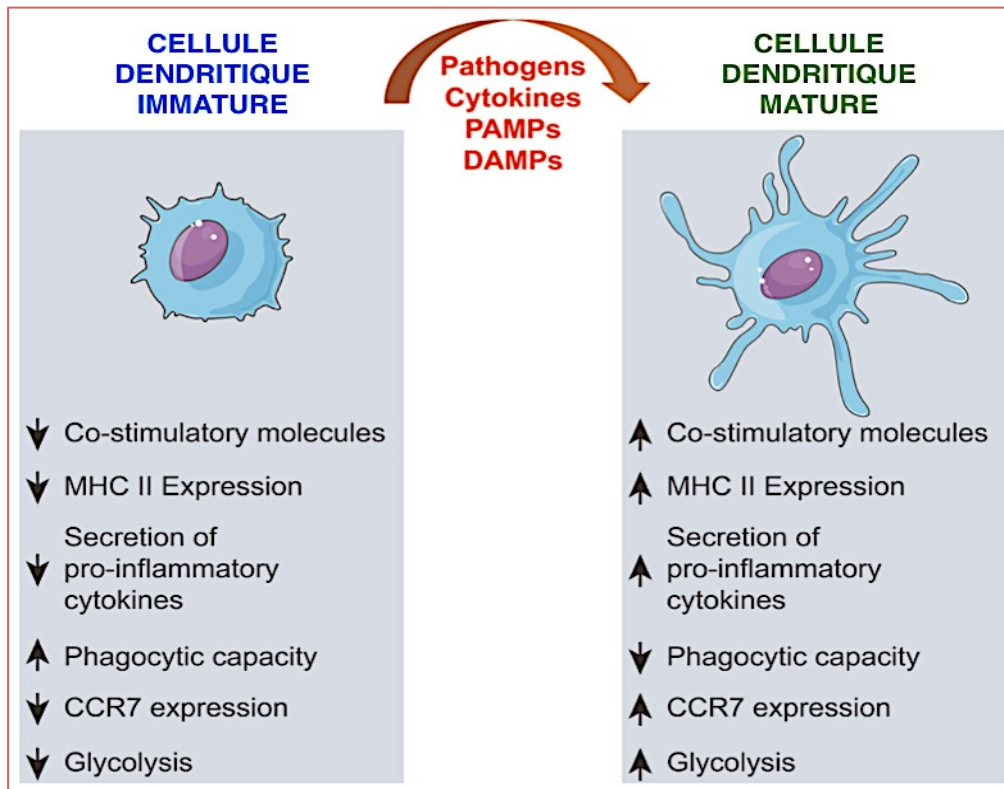


Figure 12. Maturation des cellules dendritiques.

Différents signaux extra cellulaires peuvent déclencher l'activation et la maturation des cellules dendritiques. Les CD matures sont caractérisées par une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation et du CMH-II, une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, une diminution des capacités de phagocytose et un métabolisme cellulaire modifié.

D'après Patente et al. Frontiers in Immunology (2019)

Les CD ont également un rôle fondamental dans la régulation de la réponse immunitaire. En effet, au cours de leur surveillance, les CD immatures vont capter des fragments apoptotiques

cellulaires « normaux » issus du renouvellement tissulaire physiologique. Ces fragments vont être internalisés et apprêtés par la CD mais n'induisent pas sa maturation. Ces antigènes vont donc être présentés sans signaux de co-stimulation, induisant l'anergie ou l'apoptose des LT ou encore leur différenciation en Treg^{255 256 257}. Ces CD parfois appelées « tolérogènes » jouent donc un rôle essentiel dans la tolérance immunitaire. Elles peuvent être caractérisées par une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation activatrices (telles que CD80, CD86) et de cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de l'expression de molécules inhibitrices (telles que PD-L1 et CTLA-4) et de cytokines anti-inflammatoires (telles que l'IL-10)^{258 259}.

Hétérogénéité des cellules dendritiques

Au-delà de leur stade de maturation, plusieurs sous types de CD ont été décrits qui peuvent être donc divisées en deux grandes catégories : les CD classiques (cDC) comprenant les cDC de type 1 (cDC1) et les cDC de type 2 (cDC2), et les CD plasmacytoïdes (pDC)²⁶⁰.

-Les cDC1 sont retrouvées dans la circulation sanguine, ainsi que dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes²⁶¹. Cette population est caractérisée par l'expression du CD141, du récepteur de chemokine XCR1 et de la molécule d'adhésion cellulaire CADM1. Les cDC1 sont capables d'effectuer la cross-présentation, d'induire une réponse cellulaire CD8+ efficace, et semblent donc particulièrement impliquées dans la réponse immunitaire anti virale et anti tumorale.

- Les cDC2 constituent un sous-type hétérogène retrouvé dans la circulation sanguine, dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes. Elles sont caractérisées par l'expression du SIRPα et du CD1c, et peuvent exprimer d'autres marqueurs selon leur localisation tissulaire²⁶². Les cDC2

sont particulièrement impliquées dans la réponse aux agents pathogènes extra-cellulaires ou allergènes via l'induction d'une réponse LT CD4+ médiée par la présentation antigénique par le CMH-II. Elles sont ainsi capables d'induire des réponses cellulaires Th1, Th2 et Th17^{263 264}. Elles jouent ainsi également un rôle clé dans la régulation et la tolérance immunitaire. Il a en par exemple été montré que les cDC2 étaient capables d'induire des Tregs dans le système digestif, et étaient nécessaires pour maintenir la tolérance immunitaire au sein du tissu hépatique²⁶⁵.

- Les pDC constituent une population de CD dont le précurseur direct est distinct de celui des cDC. D'un point de vue phénotypique, elles sont caractérisées par l'absence d'expression du CD11c, et l'expression du CD123, du CD303 et du CD304. Les pDC sont particulièrement impliquées dans la réponse immunitaire anti virale et produisent des taux élevés d'interferon alpha et beta après stimulation TLR7/9²⁶⁶.

Rôles en situation tumorale

L'accumulation des CD au sein du microenvironnement tumoral est liée à la production de facteurs de croissance et de chimiokines induisant leur recrutement, leur différenciation et/ou leur expansion. Les cellules NK semblent particulièrement impliquées dans le recrutement et la différenciation des CD intra tumorales^{267 268}. Elles sont en effet la source principale de FMT-like tyrosine kinase-3 ligans (FLT3-L) qui va permettre la différenciation des précurseurs de CD en cDC1. Elles peuvent également sécréter du XCL1 et CCL5, deux chimiokines capables d'induire le recrutement des CD et en particulier des cDC1²⁶⁹.

Les CD différenciées et/ou recrutées vont ainsi capter et internaliser les antigènes tumoraux. Différents signaux vont également renforcer l'activation et la maturation de la CD comme la présence de taux élevés d'interferon de type I dans le MET, ou encore la reconnaissance de signaux de danger (DAMPs)²⁷⁰. Les antigènes tumoraux vont alors être apprêtés pour être présentés par la CD mature aux LT CD4+ et CD8+ via le CMHI et II dans les ganglions drainants. Les LT CD4+ et CD8+ spécifiques activés vont à leur tour migrer au site tumoral afin de détruire les cellules présentant les antigènes tumoraux.

Au-delà de leur rôle de présentation antigénique au sein des organes lymphoïdes secondaires, les CD intra tumorales vont également jouer un rôle localement en produisant des chimiokines impliquées dans le recrutement des LT ou en re-stimulant des LTCD8+ spécifiques²⁷¹.

Le rôle spécifique des cDC2 en situation tumorale semble moins clair, probablement lié au fait que cette population est en réalité plus hétérogène.

Par leur capacité à produire de l'IFN-I et à amplifier la réponse immunitaire, les pDC jouent un rôle anti-tumoral important. Cependant certains auteurs suggèrent qu'elles pourraient également être impliquées dans la tolérance et la suppression immunitaire en contexte de cancer.

En utilisant des techniques de séquençage single cell, une sous population de CD intra tumorales (DC3) a été récemment mise en évidence dans de multiples types tumoraux, suggérant un rôle important de cette sous population dans le contexte du cancer²⁷². Les DC3 partagent des propriétés phénotypiques communes avec les cDC1 et les cDC2 mais présentent un profil transcriptomique différent, caractérisé par l'expression de marqueurs de

maturation/activation mais aussi de marqueurs immuno-régulateurs. Fonctionnellement, les DC3 pourraient avoir un rôle spécifique dans l'induction et le maintien des TRM.

2. Lymphocytes T CD4+

Généralités

Les LT CD4+ sont dits lymphocytes T auxiliaires (ou « helpers ») : ils n'agissent pas directement sur leur cible mais vont soutenir l'action d'autres types cellulaires, notamment des LT CD8+ et des LB. Ils constituent une population fortement hétérogène constituée de différentes sous populations aux caractéristiques et fonctionnalités différentes. En effet, au moment de son activation le LT CD4+ naïf va s'engager dans une voie de différenciation (ou polarisation). Cette différenciation est modulée par l'environnement cytokinique, lui-même dépendant du type de cellule présentatrice d'antigène activant le LT CD4+, des cellules de l'immunité innée activées et du type de pathogène reconnu, ou encore d'autres facteurs du MET. Selon leur polarisation, les LT CD4+ vont ainsi acquérir des phénotypes et des fonctions différentes dans la réponse immunitaire physiologique et anti-tumorale. Trois grandes sous populations sont classiquement décrites : les Th1, les Th2 et les Th17, même si d'autres ont été plus récemment identifiées. Les LT CD4+ peuvent également se différencier en cellules immunosuppressives : les Tregs qui seront abordés dans un chapitre à part.

LT CD4+ Th1

La polarisation Th1 est médiée par la production d'IL-12 et d'IFN-g, induisant l'activation de voies de signalisation STAT1 et STAT3 et le facteur de transcription Tbet. Les Th1 sont

impliqués dans l'activation des macrophages, l'induction de l'activité cytolytique des LT CD8+ et des NK, l'activation des CD et la génération des LT mémoires^{273 274}.

En situation de cancer, les Th1 ont un rôle anti-tumoral et leur présence au sein de la tumeur est associée à un meilleur pronostic dans de nombreuses localisations²⁷⁵.

LT CD4+ Th2

La polarisation Th2 est induite par l'IL-4, et implique l'activation de la voie de signalisation STAT6 et du facteur de transcription GATA3. Les Th2 sécrètent de l'IL4, de l'IL6, de l'IL9, de l'IL-10 et de l'IL-13. Les LT CD4+ Th2 sont particulièrement impliqués dans les réponses anti-parasitaires (helminthes) et les allergies.

En situation de cancer, les Th2 semblent jouer un rôle plutôt pro-tumoral notamment par la sécrétion de cytokines telles que l'IL-10 capables d'altérer la maturation des CD et d'induire des Tregs²⁷⁶.

LT CD4+ Th17

La polarisation Th17 est médiée par l'IL-6, le TGFbeta et l'IL-23, induisant l'activation des facteurs de transcription STAT3 et RORγt²⁷⁷. Les Th17 produisent de l'IL-17, de l'IL-22 et de l'IL-23 et sont notamment impliqués dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles. La réponse cellulaire Th17 a premièrement été identifiée dans le contexte des maladies auto-immunes mais semble également jouer un rôle important en situation tumorale. Les Th17 sont retrouvés dans de nombreux types de cancer où ils peuvent jouer à la fois un rôle pro et anti tumoral²⁷⁸.

3. Lymphocytes T CD8+

Les LT CD8+ sont des cellules capables de cytotoxicité directe. Après activation par la cellule présentatrice d'antigène, les LT CD8+ vont se différencier en LT CD8+ effecteurs cytotoxiques et aller lyser la cellule pathologique par le système perforine/granzyme ou par le système FAS/FAS-L. Une fois le pathogène éliminé, la majorité des LT CD8+ effecteurs meurent, mais une minorité vont persister et se différencier en LT mémoires qui vont acquérir une capacité de survie à long terme. Comme décrit précédemment, les LT CD8+ effecteurs jouent un rôle anti-tumoral majeur aujourd'hui largement démontré. L'infiltrat tumoral en LT CD8+ est ainsi un facteur pronostic majeur dans de nombreux cancers ²⁷⁵.

III. Mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire

L'accumulation des connaissances sur les rôles complexes des différentes cellules immunitaires dans l'initiation et de la progression tumorale a conduit à l'élargissement du concept d'immunosurveillance précédemment décrit, à celui d' « Immunoediting », tenant compte des modifications d'interactions qui s'opèrent entre la cellule tumorale et la réponse immunitaire au cours du temps ²⁷⁹. Selon ce concept, la progression tumorale s'effectue selon 3 phases :

- **Phase d'élimination** : La croissance tumorale, et les modifications engendrées sur son micro-environnement tissulaire, vont induire le recrutement et l'activation des différents acteurs de l'immunité innée et acquise tels que décrit ci dessus. Si elle est

suffisamment efficace, la réponse immunitaire peut parvenir à éradiquer complètement la tumeur.

- **Phase d'équilibre :** Dans certains cas, la réponse immunitaire ne parvient pas à éliminer la totalité des cellules tumorales. Il peut alors être observé une phase d'équilibre durant laquelle le système immunitaire parvient à exercer une pression suffisante pour contenir la croissance de la tumeur, sans pouvoir l'éradiquer totalement.
- **Phase d'échappement :** Au cours de la phase d'équilibre, les cellules tumorales non éliminées par la réponse immunitaire vont être sélectionnées. Au fil du temps, ces cellules vont acquérir des propriétés leur permettant de résister aux cellules immunitaires par différents mécanismes. Cet échappement au contrôle du système immunitaire permet la progression et la dissémination de la tumeur.

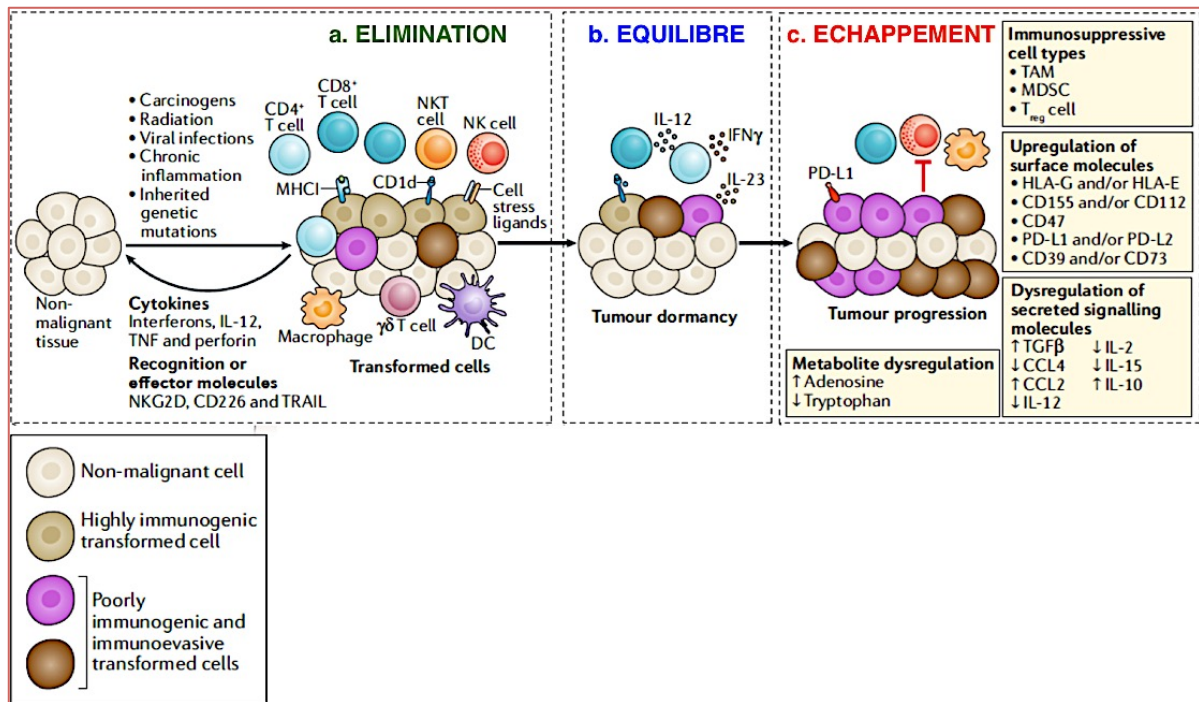


Figure 13. Les 3 phases de l'Immunoediting.

a. Durant la phase d'élimination, les cellules de l'immunité innée et adaptative coopèrent afin de repérer et détruire les cellules tumorales hautement immunogènes, avant que celles-ci ne forment une tumeur cliniquement décelable. **b.** Durant la phase d'équilibre, la tumeur est capable de résister au système immunitaire qui exerce cependant une pression suffisante pour empêcher sa croissance. Durant cette phase, l'immunogénicité tumorale diminue peu à peu sous la pression de sélection du système immunitaire. **c.** Les cellules tumorales peu immunogènes peuvent échapper à la surveillance du système immunitaire et proliférer. Différents mécanismes d'échappement se mettent en place durant cette phase, dont l'infiltration intratumorale de cellules immunosuppressives: macrophages associés au tumeur (TAM), cellules myéloïdes suppressives (MDSC), lymphocytes T régulateurs (Treg), mais aussi l'expression de molécules de co-stimulation inhibitrices et la sécrétion de cytokines immunosuppressives (TGFβ, IL-10).

D'après Dunn et al. Immunity (2004)

A. Diminution de l'immunogénicité des cellules tumorales

1. Perte d'expression antigénique

L'efficacité de la réponse cellulaire T effectrice anti tumorale est dépendante de la présence d'antigènes exprimés à la surface de la cellule tumorale.

L'absence d'expression de ces antigènes tumoraux à leur surface permet ainsi aux cellules tumorales de ne pas être reconnues par les LT effecteurs. Plusieurs mécanismes aboutissant à cette absence d'expression ont été décrits^{280 281} :

- mutations impactant le processus d'apprêtement de l'antigène tumoral sur le CMH
- diminution ou perte d'expression du CMH de classe I pouvant être secondaire à des mutations (notamment mutation du gène de la B2microglobuline)
- modifications de la régulation épigénétique de l'expression du CMH I.

2. Résistance à l'apoptose

Les cellules tumorales sont sensibles à l'apoptose médiée par les voies FAS/FAS-L et DR5/TRAIL. Plusieurs mécanismes permettant aux cellules tumorales d'échapper à l'apoptose ont été décrits tels que l'augmentation d'expression de molécules anti-apoptotiques (FLIP et BCL-XL)^{282 283}, l'expression de formes inactives des récepteurs de mort TRAIL et FAS-L ou encore la perte de l'expression de FAS²⁸⁴. A l'inverse certaines cellules tumorales vont acquérir ou augmenter leurs propriétés pro-apoptotiques par l'expression de FAS-L qui va se lier au récepteur FAS exprimé par le LT CD8+ et induire la mort de ce dernier, ou encore par la production de FAS-L soluble induisant l'apoptose des cellules de voisinage exprimant FAS.

B. Modification du micro-environnement tumoral

1. Production de cytokines immunosuppressives

Les cellules tumorales peuvent produire des cytokines immunosuppressives qui vont inhiber l'action des cellules effectrices et favoriser le recrutement et/ou l'activité de cellules immunorégulatrices.

- Le TGFbeta : Il limite la production d'IL-12 ainsi que son action sur la prolifération des LT. Il empêche également la sécrétion d'IFN γ par les LT cytotoxiques et les cellules NK. Enfin, le TGFbeta joue un rôle essentiel dans la différenciation et la prolifération de LTh17 et de Tregs^{285 286}.

- L'IL-10 est l'autre cytokine immunosuppressive majeure retrouvée dans le MET. Sa production est en partie induite par le TGFbeta, et exerce un rétrocontrôle positif en augmentant à son tour la production de ce dernier²⁸⁷. Ses fonctions suppressives sont liées à plusieurs mécanismes : inhibition de la présentation des antigènes tumoraux, inhibition de l'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 et du CMHII. L'IL-10 limite également la sécrétion d'IL-12 et d'IFN γ par les LT²⁸⁸.

2. Blocage de la maturation des cellules dendritiques

Le nombre et les propriétés des CD circulantes peuvent être modifiées en situation de cancer. Ainsi les patients porteurs de mélanomes ou de cancer du col utérin avaient moins de CD circulantes en comparaison à des sujets sains^{289 290}. Cette baisse semblait particulièrement toucher les pDC même si les cDC étaient également diminuées.

Mais c'est surtout par un impact sur leur maturation que la tumeur est capable de détourner la fonction des DC dans son intérêt. Dans une étude réalisée chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC), les DC circulantes présentaient une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation et une diminution de leur capacité à stimuler des LT allogéniques. Similairement les mo-DC (générées à partir de monocytes circulants) issues de patients atteints de LLC présentaient une diminution de l'expression des molécules impliquées dans la présentation antigénique et l'activation lymphocytaire telles que l'HLA-DR, CD80, CD83, CD86 et CD40 et présentaient une capacité diminuée à induire la prolifération des LT CD4⁺ et CD8⁺ ²⁹¹. Ces observations ont été reproduites dans d'autres localisations tumorales telles que le cancer colorectal et le cancer du col utérin ^{292 290}. De manière intéressante, certains auteurs ont montré que lorsqu'elles étaient exposées au surnageant de culture de cellules tumorales, les mo-DC de sujets sains adoptaient un phénotype et des propriétés similaires à celles retrouvées chez les patients atteints de cancer ^{293 294}. De plus, dans une étude réalisée chez un patient porteur d'une tumeur du rein, les mo-DC avaient une capacité réduite à induire la prolifération des LT allogéniques et une capacité augmentée à induire des Tregs comparés à des sujets sains²⁹⁵. Trois mois après la résection chirurgicale de la tumeur, les mo-DC issues de ce même patient retrouvaient des propriétés fonctionnelles similaires à celles des volontaires sains ²⁹⁵. Ces données suggèrent ainsi que la présence de la tumeur était la cause de la dysfonctionnalité des mo-DC observées chez ce patient. Il a plus tard été montré que plusieurs facteurs tels que l'IL-10, le TGFbeta ou encore le VEGF produit par les cellules tumorales étaient capables d'induire un blocage de maturation des DC ^{293 296}

²⁹⁷.

3. Recrutement/induction de cellules immunosuppressives

(a) Cellules myéloïdes immunosuppressives

(i) MDSC

Les Myeloïd-derived Suppressor Cells (MDSC) sont des cellules caractérisées chez l'Homme par l'expression du CD33, l'absence d'expression de marqueur de lignée (lin-) et l'absence ou la faible expression de molécules de CMH de classe II (HLA-DR -/low). 2 types de MDSC sont classiquement décrites : les MDSC monocytiques qui expriment le CD14, et les MDSC granulocytiques, morphologiquement et phénotypiquement proches des neutrophiles exprimant le CD15. Leur action immunosuppressive peut s'exercer à plusieurs niveaux :

- inhibition des LTCD8+ par déplétion du milieu en nutriments essentiels (notamment en L-Arginine) et la génération d'un stress oxydatif ²⁹⁸,
- inhibition des cellules NK par l'expression du TGFbeta ²⁹⁹,
- inhibition de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages ³⁰⁰,
- induction de la conversion de LT CD4+ en Tregs ³⁰¹

(ii) TAM

Comme décrits précédemment, certains macrophages ayant un phénotype particulier M2-like peuvent être retrouvés au sein de la tumeur et jouent un rôle pro-tumoral, notamment par leurs propriétés immunosuppressives. Les TAM M2-like sont en effet caractérisés par une forte expression d'IL-10 et de TGF-beta et une faible expression d'IL-12, inhibant ainsi l'action

des LT. Ils présentent également une faible capacité cytotoxique et une faible capacité de présentation antigénique.

(iii) *Neutrophiles associés aux tumeurs*

Le rôle des neutrophiles intra tumoraux (TAN) reste encore débattu, certains auteurs ayant montré des effets pro-tumoraux et d'autres anti-tumoraux ³⁰². Par analogie avec les macrophages, il est aujourd'hui admis qu'il existe probablement 2 sous types de TAN : les TAN de type N1 associés à une activité anti-tumorale et les TAN de type N2, à l'impact pro-tumoral. Une plasticité pourrait exister entre ces deux sous types puisqu'il a été montré que les TAN N1 pouvaient acquérir des propriétés de TAN N2 sous l'effet du TGFbeta ³⁰³. Le rôle pro-tumoral des N2 pourrait être lié à différents mécanismes tels que la production de dérivés de réactifs oxygénés (ROS), de dérivés d'oxyde nitrique (NO) et de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF ³⁰⁴.

(b) Tregs

Les Tregs sont des LT CD4+ immunosuppresseurs ayant un rôle clé dans la tolérance immunitaire périphérique, notamment dans la tolérance du soi.

L'existence de LT impliqués dans la régulation périphérique de la réponse immunitaire a été suspectée dans les années 60 mais c'est dans les années 90 que l'équipe de Sakaguchi et al. a pour la première fois identifié ces cellules. Par leurs travaux, ainsi que ceux d'autres équipes, les Tregs ont été caractérisés comme des LT CD4+ exprimant fortement le CD25, le Foxp3 et ayant une expression nulle ou faible de CD127 (cellules CD4+ CD25+ Foxp3+ CD127low/-). Le

gène *FOXP3*, membre de la famille des régulateurs transcriptionnels Forkhead/winged-helix, est un régulateur clé de l'activité des Tregs. Chez l'Homme, une mutation de ce gène entraîne le syndrome IPEX, caractérisé par des atteintes auto-immunes multiples. Cependant l'expression de Foxp3 n'est pas restreinte aux Tregs et peut être présente dans d'autres populations cellulaires T suppressives et non suppressives.

(i) *Ontogénie des Tregs*

La population des Tregs est constituée de deux sous populations ayant des origines différentes : les Tregs naturels ou thymiques (tTreg) et les Tregs induits (iTregs) aussi appelés Tregs périphériques (pTregs).

- tTreg : Les tTreg se différencient à partir des thymocytes CD4⁺ au cours de leur maturation dans le thymus. Ils semblent être issus des thymocytes présentant une affinité intermédiaire pour les complexes CMH/peptides du soi, échappant donc à la sélection négative mise en jeu dans la tolérance centrale, bien que tous les mécanismes permettant cet échappement ne soient pas encore élucidés. Plusieurs stimuli tels que la présence de signaux de co-stimulation, la sécrétion d'IL-2 ou la sécrétion d'IL-7 vont ensuite induire l'expression du CD25 et du Foxp3 et la différenciation en Treg.

- iTreg : Les Tregs peuvent également se différencier en périphérie à partir de LT CD4⁺ naïfs. Cette population représente une minorité des Tregs retrouvés chez l'Homme, sauf dans certains organes où ils sont retrouvés en quantité importante notamment dans le tube digestif et le placenta. Ils semblent ainsi particulièrement impliquée dans l'induction et le

maintien de la tolérance digestive (envers les bactéries commensales du tube digestif et les antigènes alimentaires notamment) et de la tolérance materno-fœtale^{305 306}.

Plusieurs mécanismes et conditions permettant la différenciation des LT CD4+ naïfs en Tregs ont été décrits : notamment une maturation insuffisante des CD (sur laquelle nous reviendrons plus loin), une quantité sous immunogénique de peptide présenté ou encore la présence de certains facteurs comme l'IL-2³⁰⁷ ou le TGF-beta^{308 309}. Ce dernier semble avoir un rôle particulièrement important dans l'induction de iTregs, via la voie Smad³¹⁰.

(ii) Rôle des CD dans l'induction des Tregs

Bien que les CD représentent des cellules clés dans l'activation de la réponse immunitaire, elles jouent également, comme nous l'avons vu, un rôle essentiel dans l'induction et le maintien de la tolérance immunitaire, notamment via leur capacité à induire des Tregs. Les interactions entre CD et Tregs ont été largement étudiées même si de nombreuses questions restent non élucidées. Plusieurs mécanismes sous tendant l'induction et le maintien des Tregs par les CD ont ainsi été décrits :

- Induction de tTregs par les CD thymiques. Au sein du thymus, les CD participent à la différenciation des plasmocytes en tTregs, sous l'effet notamment du thymic stromal lymphoietin (TSP) produit par les corpuscules de Hassal³¹¹.

- Induction de iTregs. Le rôle des CD et des Tregs dans le maintien de la tolérance immunitaire est particulièrement important dans les tissus en contact direct avec des agents extrinsèques tels que le tube digestif, les poumons et la peau³⁰⁵. C'est donc dans ce contexte spécifique que les interactions entre CD et iTregs ont été particulièrement étudiées. Dans ces tissus, les

CD vont capter les antigènes et migrer vers les organes lymphoïdes secondaires sous l'effet de l'up régulation du CCR7³¹². Cependant, sous l'effet de facteurs anti-inflammatoires tels que le TGFbeta, l'acide rétinoïque (RA) ou encore l'IL-10 présents dans le tissu d'origine, le processus de maturation de la CD va être incomplet. Ainsi dans le ganglion, la présentation de l'antigène par la CD immature (ou partiellement mature) n'entraîne pas de réponse cellulaire effectrice mais peut induire la différenciation des LT CD4+ naïfs en Tregs. Plusieurs conditions sous tendant cette différenciation ont été décrites³¹³ :

- une faible quantité de peptide antigénique présenté par la CD^{314 315}
- une faible expression de molécules de co-stimulation activatrices (CD80, CD86, CD40) par la CD
- un milieu pauvre en cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12)
- un milieu riche en cytokines ou facteurs anti-inflammatoires (IL-10, TGFbeta, acide rétinoïque) pouvant être produit par les CD elles-mêmes ou par d'autres cellules immunitaires³¹⁶
- l'expression de molécules inhibitrices par les CD (ILT-3, PD-L1, PD-L2)^{317 318}
- la modification de l'environnement métabolique des LT par les CD : notamment production d'IDO³¹⁹.

(iii) *Tregs naïfs et Tregs effecteurs*

D'un point de vue fonctionnel, de nombreuses sous populations de Tregs ont été décrites.

Deux grandes catégories ont ainsi été identifiées, caractérisées par l'expression mutuellement exclusive du CD45RO ou du CD45RA : les Tregs naïfs et les Tregs effecteurs.

- Les Tregs naïfs (CD45RA+/CD45RO-) sont essentiellement des Tregs thymiques. Ils sont également caractérisés par une expression plus faible de Foxp3 et ne possèdent pas d'activité suppressive. Ils constituent une population de Tregs quiescents, non prolifératifs, ayant une résistance augmentée à l'apoptose après stimulation^{320 321} .

- Les Tregs effecteurs (CD45RO+/CD45RA-) sont probablement différenciés à partir de Tregs naïfs après leur activation. Ils sont également caractérisés par une expression élevée de Foxp3 et présentent une activité suppressive, un taux de prolifération élevé, et une résistance à l'apoptose moindre³²⁰ .

Plus récemment, il a été montré qu'il existait une véritable polarisation des Tregs, superposable à celle observée chez les LT CD4+ helpers. On distingue ainsi des Tregs Th1, Th2 ou Th17, caractérisés par l'expression des récepteurs de chimiokines et l'activation de voies de signalisation distinctes.

(iv) *Tregs en situation physiologique*

Plusieurs mécanismes immunosuppresseifs des Tregs ont été décrits :

- Sécrétion de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10, l'IL-35 et le TGFbeta³²².
- Expression de molécules de co-stimulation inhibitrices telles que CTLA-4, Lag3^{323 324}
- Cytotoxicité directe : lyse des cellules effectrices via le système perforine/granzyme³²⁵
- Epuisement métabolique : notamment par déplétion du milieu en IL-2, nécessaire à l'activation des cellules effectrices, qui se lie avec une haute affinité au CD25 exprimé par les Tregs³²⁶.

- Induction de CD immatures tolérogènes. Comme nous l'avons vu précédemment, certaines CD peuvent induire des Tregs thymiques et périphériques. A l'inverse, les Tregs peuvent également influencer l'activation et la maturation des CD pour favoriser la présence de CD immatures tolérogène, notamment via la production d'IL-10 et l'expression de molécules de co-stimulation inhibitrices telle que le CTLA-4. Ces molécules vont se lier de manière compétitive aux molécules de co-stimulation activatrices CD80 et CD86 exprimées à la surface des CD, et entraînent leur diminution via un phénomène de trans-endocytose résultant en leur dégradation intra cellulaire³²⁷. Il existe ainsi en situation physiologique un véritable cross-talk entre les Tregs et les CD.

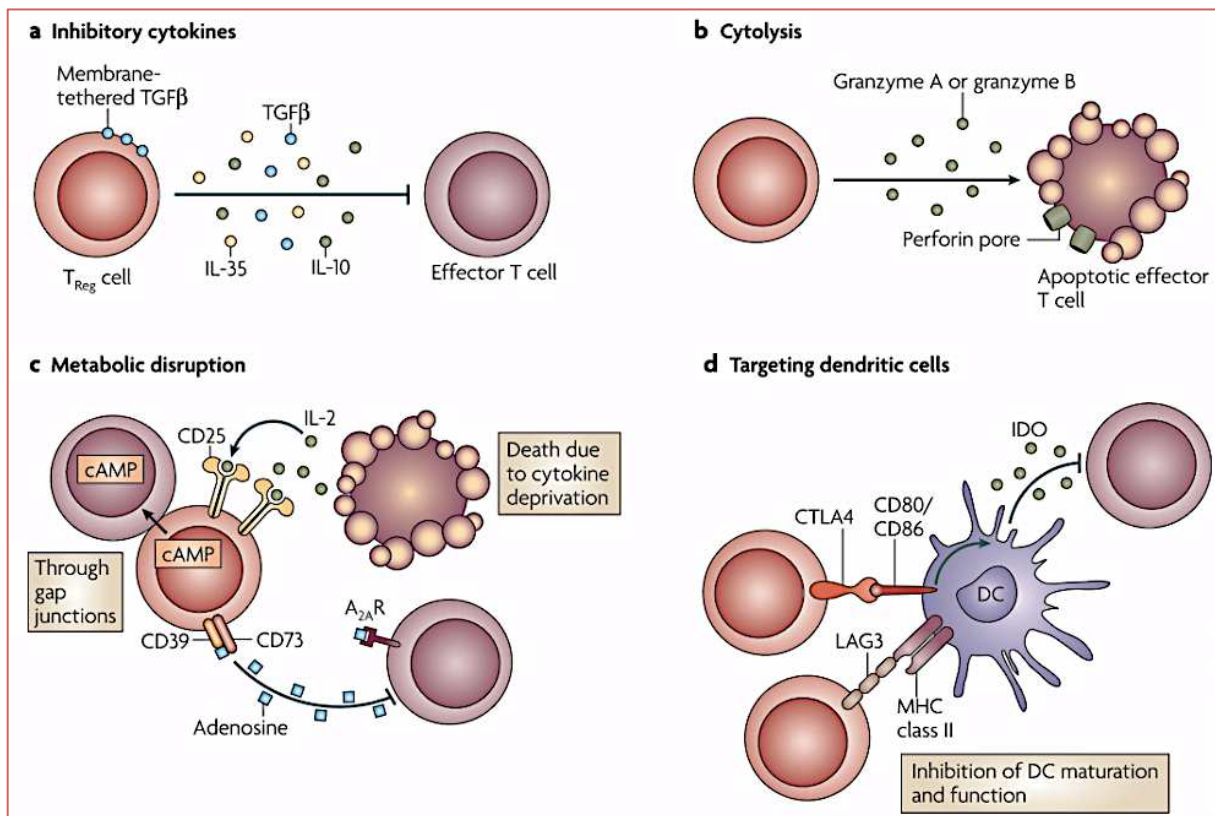


Figure 14. Mécanismes immunosuppresseurs des lymphocytes T régulateurs.

Plusieurs mécanismes d'immunosuppression par les Tregs ont été décrits tels que (a) la production de cytokines suppressives (b) une cytotoxicité directe par le système perforine-granzyme (c) des modifications métaboliques et (d) l'induction de CD immatures.

D'après Vignali et al. Nat. Rev. Immunol. (2008)

(v) *Tregs en situation tumorale*

Si ces fonctions immunosuppressives jouent un rôle fondamental en situation physiologique, elles peuvent être détournées par la tumeur pour inhiber la réponse immunitaire et favoriser la croissance tumorale. Ainsi, une forte infiltration intra tumorale en Tregs est observée dans de nombreux cancers. Il a également été montré que les patients atteints de cancer avaient plus de Tregs circulants par rapport aux sujets sains, et que leurs Tregs possédaient des

capacités immunosuppressives augmentées ^{328 329}. La présence de Tregs intra tumoraux et circulants est ainsi associée à un mauvais pronostic dans un grand nombre de localisations tumorales ³³⁰, à part dans le cancer colorectal où leur caractère pronostique semble plus controversé.

Plusieurs mécanismes à l'origine de l'accumulation de Tregs intra-tumoraux ont été décrits :

- L'augmentation de leurs capacités de migration via l'expression de chimiokines par les cellules tumorales et les cellules immunitaires du MET telles que CCL22 (ligand du récepteur CCR4 et CCD8 exprimés par les Tregs) ou CCL28 (ligand du récepteur CCR10) ^{331 332 333 334}.
- La prolifération des Tregs existants en intra-tumoral ou au sein des organes lymphoïdes secondaires. Ce phénomène pourrait être dépendant notamment de la présence d'IL-2 (sécrété notamment par les cellules effectrices), de TGF-beta (sécrété notamment par les CD) ou encore du VEGF-A ³³⁵.
- La conversion *de novo* des LT CD4+Foxp3- en Tregs ³³⁶. Il a en effet été montré que le TGFbeta produit par la cellule tumorale ou par les autres cellule immunitaires du MET était capable d'induire la différenciation de LT CD4+ en Tregs dans les organes lymphoïdes secondaires. Certains auteurs ont également suggéré que les Tregs pouvaient se différencier directement à partir de LT effecteurs présents au sein de la tumeur ³³⁷, bien que ce phénomène de conversion locale, et sa contribution au pool de Tregs observés au sein de la tumeur soient controversés.

L'activation et la prolifération des Tregs intra tumoraux va ensuite être régulée par leurs interactions avec les cellules tumorales et les autres cellules immunitaires (notamment les

CPA) via l'expression à leur surface de molécules de co-stimulation inhibitrices ou activatrices, et par les cytokines du MET.

4. Epuisement des lymphocytes T

Au cours de la progression du cancer, les cellules tumorales vont induire une perte d'efficacité progressive de la réponse cellulaire T CD8 appelée épuisement ou exhaustion. Ce phénomène est à différencier de l'anergie lymphocytaire qui est un état de « non réponse » survenant lorsque le LT CD4+ ou CD8+ engage son TCR avec le complexe CMH-peptide présenté par la cellule tumorale ou par la CPA (signal 1 de l'activation lymphocytaire), en l'absence de molécules et de cytokines de co-stimulation (signal 2 et 3). Cette interaction est insuffisante pour induire l'activation du LT qui entre alors dans un stade « anergique » avec des capacités de prolifération ainsi qu'une fonction cytotoxique diminuées³³⁸.

L'exhaustion lymphocytaire est un processus lié à la stimulation chronique et répétée des LT CD8+ par l'antigène tumoral, et pouvant être favorisé par d'autres éléments tels que la présence de cellules ou de facteurs immunosuppresseurs ou bien des changements métaboliques tels que l'hypoxie. Le LT CD8+ épuisé perd ses propriétés cytotoxiques et sa production de cytokines activatrices. D'un point de vue phénotypique les LT CD8 épuisés sont caractérisés par une forte co-expression de molécules inhibitrices telles que PD-1, Tim-3, Lag3 et CTLA-4³³⁹.

CHAPITRE V. IMPACT IMMUNOMODULATEUR DE L'AXE HGF/MET

I. Impact de l'axe HGF/MET sur les cellules immunitaires

A. Lymphocytes :

Comme nous l'avons vu, l'axe HGF/MET joue un rôle essentiel dans l'organogenèse au cours de la vie embryonnaire. Ce rôle semble également s'exercer au cours de la lymphopoïèse. En effet, chez la souris, cMet est fortement exprimé dans le thymus fœtal et néo-natal par les cellules lymphoïdes. Cette expression décroît très rapidement au cours de la période post-natale³⁴⁰. Dans cette même étude, la stimulation *in vitro* de thymocytes fœtaux de souris induit leur différenciation en lymphocytes T matures ayant une forte expression du TCR. Parallèlement, il a été montré chez la souris et chez l'Homme que les cellules stromales du thymus étaient capables de produire de l'HGF, y compris à l'âge adulte, et que cette production diminuait significativement au cours du vieillissement³⁴¹. De plus, dans des modèles murins, l'inactivation de *MET* dans les thymocytes était associée à une diminution du nombre de thymocytes matures lorsque le thymus était soumis à une agression tissulaire, et à une accélération de l'involution thymique³⁴². Ces données suggèrent ainsi également un rôle post-natal de la voie HGF/MET dans la réparation et le renouvellement thymique.

Par rapport aux autres types cellulaires, l'impact direct de la voie HGF/MET sur les LT périphériques a été moins étudié, notamment du fait de la faible expression du récepteur cMET par les LT naïfs, rapportée par plusieurs auteurs.

HGF semble jouer un rôle dans la migration des LT. Adams et al. ont en effet montré *in vitro* que l'HGF induisait la migration de LT humains isolés à partir du sang périphérique, et que cet effet était limité aux LT mémoires (CD45RA+) et aux LT CD8+ mais n'était pas observé pour les LT effecteurs (CD45RO+) ³⁴³. Dans cette étude, il n'était pas détecté d'expression du cMET par les LT, y compris après stimulation. Les auteurs ont émis l'hypothèse qu'un autre récepteur à l'HGF non identifié pourrait être exprimé par les LT, bien que cette hypothèse n'ait pas été validée. A l'inverse, dans une étude réalisée par le groupe de Komarowska et al. les LT stimulés *in vitro* par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 en présence d'HGF présentaient une up-régulation de l'expression de cMET et des capacités de migration augmentées, semblant liées à l'expression autocrine de CCL4 ³⁴⁴. L'expression d'autres récepteurs de chimiokines tels que CXCR3 et CCR4 étaient également augmentée.

Plus récemment, l'équipe de Benkhoucha a identifié chez la souris une population rare de LT CD8+ effecteurs exprimant le cMET et ayant des capacités cytolytiques augmentées. Dans cette étude, HGF exerçait un rôle immunosuppresseur sur les LT CD8+ cMET+ d'une part en diminuant leur activité cytolytique directe *in vitro* et *in vivo* (alors que la cytotoxicité des LT CD8+ cMet- n'était pas modifiée en présence d'HGF) mais aussi en induisant des propriétés régulatrices chez ces cellules. Ainsi, les LT CD8+ cMET+ pré-exposés à l'HGF étaient capables de diminuer l'activité des LT CD8+ spécifiques *in vitro*. Des LT CD8+ cMet+ intra tumoraux étaient observés dans plusieurs modèles murins de cancer et chez l'Homme au sein de mélanomes ³⁴⁵.

Tout comme les LT, les LB naïfs n'expriment pas le cMET. Cependant plusieurs auteurs ont montré qu'une up-régulation de cMET était observée sur les LB présents dans les organes

lymphoïdes secondaires après activation. Plusieurs données suggèrent ainsi que la voie HGF/MET pourrait être impliquée dans la migration et l'adhésion des LB activés au sein des follicules, et moduler leur activation^{346 347}. De plus, la signalisation HGF/MET pourrait jouer un rôle dans la survie des LB matures³⁴⁸.

B. Monocytes/Macrophages

L'impact de l'axe HGF/Met sur les monocytes et les macrophages apparaît limité en situation physiologique. En revanche, en cas d'agression aiguë ou chronique son activation pourrait favoriser la régénération tissulaire en augmentant le recrutement des monocytes circulants et des macrophages, et en modulant leur phénotype vers un phénotype anti-inflammatoire.

Chez l'Homme, les monocytes circulants ne semblent pas ou peu exprimer le cMET en situation physiologique³⁴⁹. En revanche, plusieurs données suggèrent que l'expression de cMET par les monocytes peut être augmentée par l'exposition à des facteurs pro-inflammatoires tels que le LPS, le TPA ou l'IFNgamma^{349 350 351}. En présence d'HGF, les monocytes ainsi activés présentent des capacités de migration *in vitro* augmentées et une up-régulation des gènes impliqués dans la migration cellulaire³⁵¹.

En plus de cet impact direct de l'axe HGF/MET sur la capacité de migration des monocytes, cette voie semble également jouer un rôle lors de la différenciation des monocytes en macrophages. En effet, les macrophages différenciés *in vitro* à partir de lignées de monocytes humains en présence de signaux inflammatoires tels que le LPS ou le TPA présentent une augmentation de l'expression de cMET. Lors de l'initiation de la réponse immunitaire, les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 vont induire la production de facteurs

régulateurs tels que l'u-PA qui va convertir le pro-HGF inactif en HGF. Coudriet et al. ont montré qu'en présence d'HGF, les macrophages stimulés par le LPS produisaient moins d'IL-6 et avaient à l'inverse une production augmentée d'IL-10, favorisant ainsi un phénotype anti-inflammatoire des macrophages³⁵². Cet impact de l'HGF sur l'atténuation de la réponse pro-inflammatoire des macrophages a été observé dans des pathologies inflammatoires chroniques telle que l'obésité. Il a ainsi été montré dans des modèles *in vitro* et *in vivo* que l'HGF était capable de limiter la production de facteurs pro-inflammatoires par les macrophages induite par les adipocytes³⁵³. De manière intéressante, l'HGF circulant est retrouvé en quantité augmentée chez les patients atteints d'obésité³⁵⁴, où il semble être produit par les adipocytes et les cellules stromales du tissu adipeux. Une hypothèse avancée par certains auteurs est que la production d'HGF pourrait être un mécanisme compensatoire pour rétablir l'homéostasie tissulaire dans cette pathologie.

HGF semble également impliqué dans le recrutement de macrophages tissulaires lors de processus inflammatoires ou lésionnels. Dans un modèle murin de néphropathie chronique liée au diabète, l'administration d'HGF était associée à une augmentation de l'expression de CXCL12 dans le rein induisant le recrutement de macrophages et favorisant la réparation tissulaire³⁵⁵.

C. Cellules dendritiques

Chez la souris, une expression de cMET est observée sur les CD différenciées *in vitro*³⁵⁶. Deux impacts principaux de la voie HGF/MET sur les CD ont été décrits et étudiés :

- Impact sur la migration des CD

La migration des CD de leur tissu d'origine vers les organes lymphoïdes secondaires représente une des étapes clés de l'activation de la réponse immunitaire adaptative. Dans des expériences réalisées à partir d'explants cutanés, l'application d'HGF était associée à une augmentation de la capacité de migration des CD et des cellules de Langherans. Dans cette même étude, l'inactivation de *MET* conditionnée par un stimulus inflammatoire était également associée à une diminution de la migration des CD du derme vers les OLS, résultant chez ces souris en une diminution de la réponse immunitaire spécifique dirigée contre des haptènes ³⁵⁷. Cet impact semble lié à une modulation de l'adhésion cellulaire liée aux intégrines par l'axe HGF/Met sur les CD.

- Induction de CD tolérogènes

L'équipe de Rutella est la première à avoir suggéré que l'HGF était capable de moduler directement le phénotype et la fonction des CD. Dans ce travail, les auteurs ont montré que les monocytes issus de volontaires sains cultivés en présence d'HGF exprimaient moins de molécules de co-stimulation CD80, CD83 et CD86, et produisaient moins d'IL-12 et plus d'IL-10 et d'IDO par rapport à des CD « contrôles » différenciées à partir de monocytes circulants en présence de GM-CSF et d'IL-4. De plus, les LT allogéniques cultivés avec ces monocytes précédemment stimulés par l'HGF produisaient moins d'IL-2 et d'IL-4, et acquéraient des propriétés suppressives ³⁵⁸. Ces données ont été confirmées par les travaux du groupe de Molnarfi et Benkhoucha dans lesquels les monocytes de sujets sains, cultivés en présence de GM-CSF, d'IL-4 et d'HGF, présentaient des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de CD « tolérogènes » capable d'induire des Tregs in vitro ³⁵⁹. Dans un autre travail portant sur un modèle murin d'encéphalite auto-immune, ces auteurs ont montré que la surexpression

sélective d'HGF dans les cellules neuronales était associée à une diminution de la sévérité des lésions d'encéphalite et à une augmentation de l'infiltration du système nerveux central par les Tregs³⁶⁰. De plus, Les CD isolées à partir du système nerveux central de ces souris étaient capables d'induire la différenciation de LT CD4+ spécifiques en Tregs produisant de l'IL-10. L'induction de CD tolérogènes par l'HGF pourrait être impliquée dans d'autres mécanismes physiopathologiques, et pourrait expliquer notamment son rôle protecteur dans la tolérance immunitaire observée dans le contexte de greffe cardiaque³⁶¹.

Plusieurs mécanismes pouvant expliquer la capacité de la voie HGF/MET à induire ces propriétés régulatrices chez les CD ont été suggérés comme l'inhibition de la voie NFkappaB par l'HGF, ou encore l'induction de l'expression du Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ), acteur majeur de l'immunosuppression induite par les glucocorticoïdes, par les CD³⁶².

D. Neutrophiles

Un premier impact de l'axe HGF/MET sur les neutrophiles semble être de favoriser leur adhésion aux cellules endothéliales ainsi que leur transmigration via l'activation de l'intégrine LFA-1³⁶³. Plusieurs travaux ont également montré que l'activation des neutrophiles par différents stimuli inflammatoires tels que le LPS, le TNFalpha ou l'IL-1 induisait un relargage d'HGF³⁶⁴. En effet les granulations des neutrophiles circulants contiennent du pro-HGF inactif qui peut, sous l'effet d'un signal d'activation, être converti en HGF mature et être relargué dans le tissu. Il a ainsi été décrit que les PNN des alvéoles pulmonaires et du tissu hépatique pouvaient sécréter de l'HGF, participant à la régénération tissulaire dans des pathologies

respiratoires aiguës ou des pathologies hépatiques telles que l'hépatite aiguë alcoolique ³⁶⁵

366

II. Implications en situation tumorale

L'axe HGF/MET semble donc avoir un impact plutôt suppresseur sur la réponse immunitaire. Ce rôle régulateur est bénéfique en situation physiologique pour limiter la réaction inflammatoire et permettre le renouvellement tissulaire. A l'inverse, en situation tumorale où une réponse immunitaire efficace maximale est nécessaire, ce rôle immunosuppresseur suggère un impact négatif pro-tumoral de l'activation de la voie HGF/MET. Cependant, certains auteurs ont également décrit un impact anti-tumoral de l'axe HGF sur le système immunitaire, particulièrement sur les neutrophiles ¹⁹⁹. Relativement peu d'études se sont attachées à étudier les relations entre système immunitaire et voie HGF/MET dans le contexte spécifique du cancer. Notamment, l'impact tolérogène de l'HGF sur les CD n'a jamais été démontré dans cette situation.

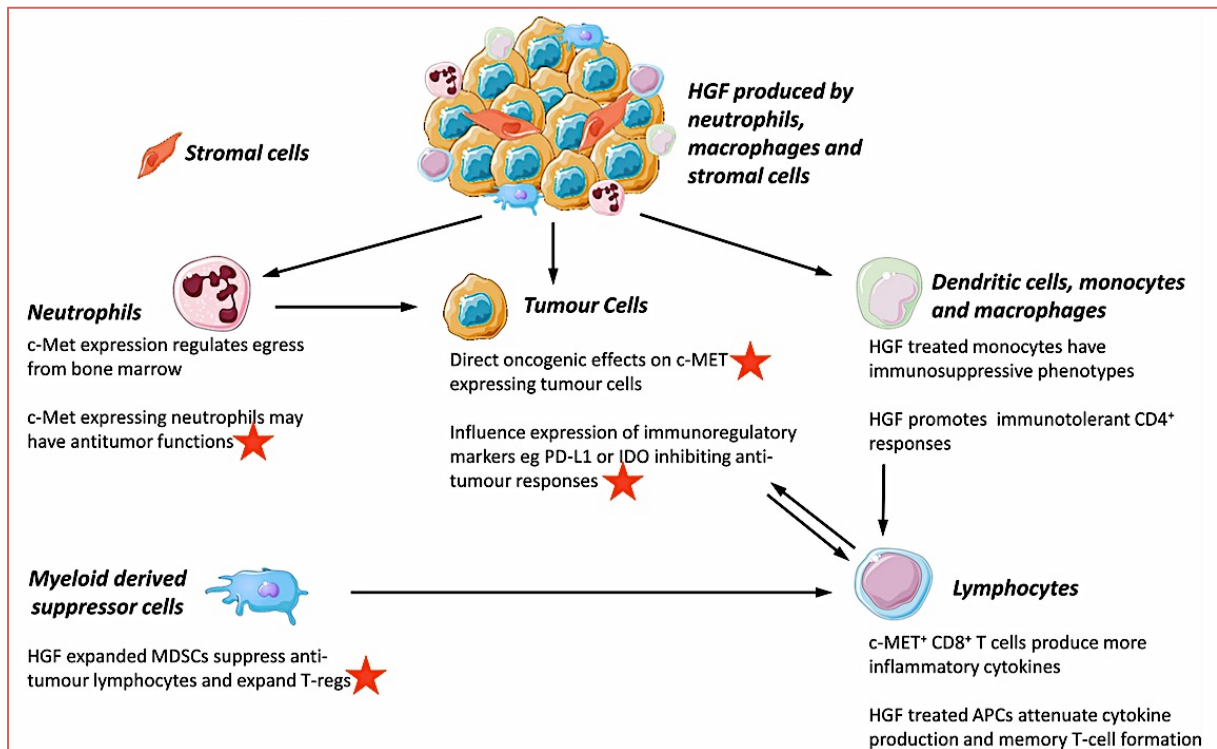


Figure 15. Potentiels rôles immunomodulateurs de l'HGF en situation tumorale

Plusieurs rôles immunomodulateurs de l'axe HGF/MET ont été mis en évidence en situation physiologique et en situation tumorale (étoile rouge).

D'après Titmarsh et al. *Frontiers in Oncology* (2020)

A. Effets anti-tumoraux

- Stimulation de la réponse effectrice. cMET peut être reconnu comme un antigène tumoral et induire l'activation des LT CD8 cytotoxiques contre les cellules tumorales exprimant cMET³⁶⁷. Dans une autre étude, l'administration intra tumorale d'une cytokine hybride (fusokine) associant IL-7 et HGF était associée à une augmentation des TILS CD4⁺ et CD8⁺ et à une diminution de la croissance tumorale dans plusieurs modèles murins de cancer colorectal et de mélanome³⁶⁸. Dans cette étude, la co-administration des 2 cytokines HGF et IL-7 (non hybridés) était associée à une réduction tumorale et à une infiltration en LT moindre que ce

qui était observé avec le traitement par la fusokine. De plus, aucune régression tumorale n'était observée après administration intra-tumorale d'HGF seul.

- Impact sur les neutrophiles. Chez l'Homme, cMET est faiblement exprimé par les neutrophiles circulants en situation physiologique. En revanche cette expression semble être augmentée chez les patients atteints de cancers, à la fois sur les neutrophiles circulants et sur les neutrophiles intra tumoraux, où cette augmentation est encore plus importante. *In vitro* la culture de neutrophiles humains ou murins en présence de milieu conditionné par des cellules tumorales, ou en présence de TNFalpha ou de LPS, induit une augmentation de l'expression de cMET à leur surface¹⁹⁹. Dans différents modèles de cancer murins, l'équipe de Finisguerra et al. a montré que l'inactivation de l'expression de *MET* dans les neutrophiles était associée à une croissance tumorale accrue et à une augmentation des métastases à distance ainsi qu' à une diminution de l'infiltration en neutrophiles intra tumoraux. Dans cette même étude, les auteurs ont montré que l'expression de cMET par les neutrophiles était nécessaire pour permettre leur migration transendothéliale vers les tissus lésés dans des modèles de colite ou de péritonite inflammatoire. Enfin, *in vitro*, les neutrophiles *MET* ^{-/-} présentaient une diminution de la cytotoxicité envers les cellules tumorales, notamment par une diminution de la production de NO. De plus, les neutrophiles stimulés par l'HGF avaient une production de NO et une cytotoxicité augmentée. Ainsi, les données apportées par ce groupe suggèrent un impact anti-tumoral de la voie HGF/MET sur les neutrophiles¹⁹⁹.

A l'inverse, l'équipe de Glodde et al. ont montré dans des modèles murins que les neutrophiles intra-tumoraux exprimant le cMET présentaient un phénotype

immunosuppresseur, avec une expression augmentée de gènes tels que *PD-L1* et *iNOS*. Chez des souris porteuses de tumeurs et traitées par transfert adoptif de LT, l'administration concomitante d'inhibiteurs de cMET était associée à une diminution de l'infiltration en TAN, à une meilleure efficacité du traitement et à une augmentation de la survie³⁶⁹. Une hypothèse pouvant expliquer cette différence de rôle pro ou anti-tumoral est l'impact du milieu cytokinique sur la fonctionnalité des TAN. En effet dans le contexte de transfert adoptif de LT, la réponse cellulaire T va induire une forte production d'IFN γ qui pourrait promouvoir des mécanismes immunosuppresseurs afin de limiter l'ampleur de la réponse immunitaire.

Enfin, d'autres équipes ont montré que les TAN observés dans le cancer du foie et dans le cancer broncho-alvéolaire produisaient de l'HGF, suggérant là aussi un rôle plutôt pro-tumoral

370 371

B. Effets pro-tumoraux

- Association avec l'expression de PD-L1. Comme précédemment décrit, l'expression de PD-L1 par la cellule tumorale représente un des mécanismes participant à l'échappement immunitaire, via l'inhibition de l'activation des LT exprimant le PD-1. Plusieurs auteurs ont suggéré que l'activation de la voie HGF/Met pourrait être associée à une expression tumorale de PD-L1. En effet, dans une étude portant sur 389 cancers pulmonaires (CBNPC), il existait une corrélation positive entre le taux d'expression de PD-L1 et d'amplification de *MET* par la tumeur. Ces résultats ont été reproduits dans une autre étude portant sur 155 cancers pulmonaires. Dans cette dernière, les auteurs ont également montré *in vitro* sur des lignées cellulaires de cancer que l'activation de la voie HGF/MET était capable d'induire directement

l'expression de PD-L1^{372 373}. Enfin dans une étude chinoise portant sur plus de 1000 cancers gastriques, les tumeurs exprimant cMET avaient une plus forte expression de PD-L1 par les cellules tumorales et par les cellules immunitaires infiltrantes que les tumeurs cMET -³⁷⁴.

Cependant, de manière contradictoire, dans une étude réalisée sur des modèles murins de carcinome hépato cellulaire, l'inhibition de la voie HGF/MET était associée à une augmentation de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales. Celle-ci était liée à une diminution de sa dégradation par la Glycogen synthase kinase 3b (GSK3B). De plus, l'expression intra-tumorale de PD-L1 était négativement corrélée à l'expression de MET chez les patients atteints de CHC³⁷⁵. Selon les auteurs de cette étude, la discordance de ces résultats avec ceux observés dans le cancer pulmonaire pourrait être liée à une spécificité de l'impact de la voie HGF/MET sur l'expression de PD-L1 selon certains organes et tissus.

- Impact sur la production d'IDO. Dans des expériences réalisées *in vitro* sur des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire (lignée SKOV-3 produisant de l'IDO), une inhibition pharmacologique de cMET ou la transfection avec un antagoniste du cMET (NK4), entraînait une inhibition de la production d'IDO, et une augmentation de la sensibilité à la cytotoxicité des cellules NK. Chez la souris, le blocage de la voie HGF/MET (toujours par transfection de l'antagoniste de cMET NK4) entraînait une augmentation de l'infiltration tumorale en cellules NK et une croissance tumorale réduite par rapport au groupe contrôle³⁷⁶.

C. Impact sur la réponse à l'immunothérapie

Si l'impact spécifique de l'activation de la voie HGF/MET sur la réponse immunitaire anti tumorale est encore relativement peu étudié, de plus en plus de données suggèrent qu'elle pourrait constituer un des mécanismes de résistance à l'immunothérapie. Ce sujet sera abordé dans la partie discussion.

OBJECTIFS

La compréhension des mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire représente un des enjeux clé de la recherche actuelle en oncologie. La découverte de l'expression de molécules de co-stimulation inhibitrices par les cellules tumorales a ainsi permis le développement des inhibiteurs de checkpoint immunitaires, constituant une révolution thérapeutique majeure dans la prise en charge des cancers.

Au-delà des molécules de co-stimulation inhibitrices, de multiples mécanismes permettant à la tumeur d'échapper au système immunitaire ont été décrits. Parmi ces mécanismes, la capacité des cellules tumorales à induire l'accumulation de lymphocytes T régulateurs a été démontrée dans de nombreux cancers, notamment dans le cancer gastrique. Différents phénomènes peuvent être à l'origine de cette accumulation. Dans le laboratoire plusieurs travaux ont ainsi montré que le VEGF-A, molécule pro-angiogénique, était capable d'induire l'accumulation de Tregs en situation de cancer. Comme évoqué précédemment, la voie HGF/cMET possède également des propriétés pro-angiogéniques et a été décrite comme pouvant agir sur les cellules immunitaires. De plus, cette voie peut être suractivée dans le contexte du cancer gastrique.

L'objectif de mon travail de thèse a ainsi été d'étudier l'impact de l'axe HGF/MET sur l'accumulation de lymphocytes T régulateurs chez les patients atteints de cancer gastrique.

Pour cela, nous avons :

- caractérisé l'expression de cMET par les cellules immunitaires circulantes des patients atteints de cancer gastrique et son association avec les paramètres cliniques et histologiques dans cette pathologie.
- étudié *in vitro* l'impact direct de l'HGF sur la différenciation et la maturation des cellules dendritiques de patients atteints de cancer et leur capacité à induire des Tregs.
- étudié l'impact d'un anticorps anti-HGF sur les lymphocytes T régulateurs circulants chez des patients atteints de cancer gastrique.

RESULTATS

Article publié dans Cancers (Novembre 2021)

Titre original : Targeting HGF/c-Met axis decreases circulating regulatory T cells accumulation in gastric cancer patients.

Auteurs : Juliette Palle, Laure Hirsch, Alexandra Lapeyre-Prost, David Malka, Morgane Bourhis, Simon Pernot, Elie Marcheteau, Thibault Voron, Florence Castan, Ariane Lacotte, Nadine Benhamouda, Corinne Tanchot, Eric François, François Ghiringhelli, Christelle de la Fouchardière, Aziz Zaanani, Eric Tartour, Julien Taïeb et Magali Terme.

L'hyperactivation de la voie HGF/MET, retrouvée dans de multiples cancers notamment le cancer gastrique, induit de nombreux processus associés à la croissance tumorale, tels que la prolifération et la survie cellulaire, la dissémination à distance ou encore l'angiogenèse. Plus récemment, différents impacts de cette voie de signalisation sur les cellules immunitaires ont été mis en évidence. Ce rôle immunomodulateur a été cependant peu étudié dans le contexte spécifique de l'immunité anti-tumorale. Notamment, l'impact de la voie HGF/MET sur l'induction de Tregs n'a jamais été étudié dans le cancer.

Dans ce travail nous avons étudié le rôle de la voie HGF/MET sur la différenciation des cellules dendritiques et l'induction de Tregs chez des patients atteints de CG.

- Les monocytes circulants des patients atteints de cancer gastrique expriment le cMET

Nous avons étudié l'expression de cMET par les cellules immunitaires circulantes chez des patients atteints d'adénocarcinome gastrique, tous stades confondus. Nous avons observé que les monocytes circulants des patients expriment le cMET à leur surface, contrairement aux Tregs et aux LT conventionnels. Cette expression était retrouvée chez les trois sous populations monocytaires (classiques, intermédiaires et non classiques), mais semblait plus élevée chez les monocytes classiques. L'expression de cMET était associée à un phénotype histologique tumoral peu différencié et à la présence de métastases, suggérant qu'une forte expression de cMET par les monocytes circulants est associée à une maladie agressive dans le contexte de l'adénocarcinome gastrique. Nous avons donc cherché à étudier l'impact pronostique de l'expression de cMET chez ces patients. Pour cela nous avons comparé dans un modèle univarié la survie des patients ayant une forte expression monocyttaire du cMET au diagnostic, à celle des

patients ayant une expression faible. Dans cette cohorte exploratoire, la forte expression de cMet par les monocytes circulants au diagnostic initial était associée à une moins bonne survie.

- L'HGF induit la différenciation des monocytes des patients atteints de cancer gastrique en cellules dendritiques immatures immunosuppressives

Dans un deuxième temps, nous avons étudié *in vitro* l'impact de l'HGF sur la différenciation des monocytes en CD chez les patients atteints de CG. Nous avons observé que les monocytes isolés du sang périphérique de patients, cultivés en présence de GM-CSF et d'IL-4 (condition standard) et d'HGF étaient capables de se différencier en CD exprimant le CD11c, l'HLA-DR et le CD1c. Les CD différenciées en présence d'HGF présentaient un phénotype immature, avec une diminution de l'expression du CD86 et de l'HLA-DR par rapport aux CD différenciées en condition standard. De plus, les CD différenciées en présence d'HGF avaient une production augmentée d'IL-10 et de TGFbeta par rapport aux CD standard. Après stimulation par du LPS, les CD différenciées en présence d'HGF ne présentaient pas d'up-régulation des molécules de co-stimulation observée chez les CD standard.

- Les CD différenciées en présence d'HGF induisent des lymphocytes T régulateurs

Nous avons ensuite étudié l'impact de ces CD différenciées à partir de monocytes de patients en présence d'HGF sur la prolifération et l'induction de Tregs. *In vitro*, les CD différenciées en présence d'HGF, co-cultivées avec des LT CD4+ allogéniques induisaient une augmentation de la proportion de Tregs et une augmentation de leur prolifération comparativement au CD différenciées en condition standard.

- Le Rilotumumab, un anticorps monoclonal anti-HGF, diminue les Tregs circulants chez les patients atteints de cancer gastrique avancé

Nous avons comparé le taux de Tregs circulants avant et après 2 cycles de traitement chez des patients atteints de cancer gastrique avancé inclus dans l'essai de phase III MEGA. Cet essai comparait l'efficacité de la chimiothérapie standard (FOLFOX) à la chimiothérapie associée au RILOTUMUMAB (anticorps monoclonal anti HGF) ou au PANITUMUMAB (anticorps monoclonal anti EGFR). Une diminution des Tregs circulants étaient observée chez les patients traités par chimiothérapie + anti-HGF alors qu'elle n'était pas retrouvée chez les patients du bras standard ou du bras chimiothérapie + anti EGFR.

Ce travail suggère ainsi pour la première fois en situation tumorale que l'HGF est capable de moduler la différenciation des CD vers un phénotype immature et immunosuppresseur, capable d'induire des Tregs. Nous avons également pour la première fois à notre connaissance montré que les monocytes circulants des patients atteints de CG expriment le récepteur cMET, et que cette expression est associée à un mauvais pronostic. Ces résultats apportent donc un nouvel élément dans la compréhension du rôle immunomodulateur, ici immunosuppresseur, de la voie HGF/MET en situation tumorale.

Article

Targeting HGF/c-Met Axis Decreases Circulating Regulatory T Cells Accumulation in Gastric Cancer Patients

Juliette Palle ^{1,2,3}, Laure Hirsch ^{1,4,†}, Alexandra Lapeyre-Prost ^{1,2,†}, David Malka ^{5,†}, Morgane Bourhis ^{1,3}, Simon Pernot ¹, Elie Marcheteau ¹, Thibault Voron ¹, Florence Castan ⁶, Ariane Lacotte ¹, Nadine Benhamouda ^{1,7}, Corinne Tanchot ^{1,3}, Eric François ⁸, François Ghiringhelli ⁹, Christelle de la Fouchardière ^{10,11}, Aziz Zaanani ², Eric Tartour ^{1,3,6}, Julien Taieb ² and Magali Terme ^{1,3,*}

- ¹ Université de Paris, Inserm, PARCC, 75015 Paris, France; juliette.palle@aphp.fr (J.P.); laure.hirsch@wanadoo.fr (L.H.); lapeyre@ipc.unicancer.fr (A.L.-P.); morgane.bourhis@inserm.fr (M.B.); s.pernot@bordeaux.unicancer.fr (S.P.); elie.marcheteau@gmail.com (E.M.); thibault.voron@aphp.fr (T.V.); arianelacotte@gmail.com (A.L.); nadine.benhamouda@aphp.fr (N.B.); corinne.tanchot@inserm.fr (C.T.); eric.tartour@aphp.fr (E.T.)
 - ² Department of GI Oncology, AP-HP, Hôpital Européen Georges-Pompidou, Université de Paris, 75015 Paris, France; aziz.zaanani@aphp.fr (A.Z.); julien.taieb@aphp.fr (J.T.)
 - ³ Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, 31037 Toulouse, France
 - ⁴ Department of Medical Oncology, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université de Paris, 75015 Paris, France
 - ⁵ Département de Médecine Oncologique, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, 94805 Villejuif, France; david.malka@gustaveroussy.fr
 - ⁶ Biostatistics Unit, CTD INCa, ICM-Montpellier Cancer Institute, 34090 Montpellier, France; Florence.Castan@icm.unicancer.fr
 - ⁷ Department of Immunology, AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, 75015 Paris, France
 - ⁸ Centre Antoine-Lacassagne, 06100 Nice, France; eric.francois@nice.unicancer.fr
 - ⁹ Centre Georges-François Leclerc, 21000 Dijon, France; fghiringhelli@cgfl.fr
 - ¹⁰ Medical Oncology Department, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France; christelle.delafouchardiere@lyon.unicancer.fr
 - ¹¹ Cancer Research Center of Lyon (CRCL), UMR INSERM 1052, CNRS 5286, 69373 Lyon, France
- * Correspondence: magali.term@inserm.fr
† These authors contributed equally to this work.



Citation: Palle, J.; Hirsch, L.; Lapeyre-Prost, A.; Malka, D.; Bourhis, M.; Pernot, S.; Marcheteau, E.; Voron, T.; Castan, F.; Lacotte, A.; et al. Targeting HGF/c-Met Axis Decreases Circulating Regulatory T Cells Accumulation in Gastric Cancer Patients. *Cancers* **2021**, *13*, 5562. <https://doi.org/10.3390/cancers13215562>

Academic Editor: Enrico Giraudo

Received: 27 August 2021
Accepted: 2 November 2021
Published: 5 November 2021

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



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

Simple Summary: Restoring an effective immune response is the key goal of immunotherapy. One of the major mechanisms of tumor-induced immunosuppression is regulatory T cells (Treg) accumulation. In this study, using in vitro and in vivo analysis, we assessed the impact of the HGF/c-Met pathway, involved notably in tumor angiogenesis, on Treg accumulation in patients with gastric cancer. First, we reported that c-Met is expressed on circulating monocytes of gastric cancer patients and this expression seems to be associated with the worst outcome. Secondly, during in vitro cultures, c-Met+ monocytes differentiate into dendritic cells with tolerogenic properties able to induce the proliferation of Treg. Finally, rilotumumab, an anti-HGF antibody, decreases the percentage of circulating Treg in gastric cancer patients. Using HGF/c-Met inhibitors to partially reverse immunosuppression could lead to the development of new treatment associations, for example with immune checkpoint blockers.

Abstract: Elucidating mechanisms involved in tumor-induced immunosuppression is of great interest since it could help to improve cancer immunotherapy efficacy. Here we show that Hepatocyte Growth Factor (HGF), a pro-tumoral and proangiogenic factor, and its receptor c-Met are involved in regulatory T cells (Treg) accumulation in the peripheral blood of gastric cancer (GC) patients. We observed that c-Met is expressed on circulating monocytes from GC patients. The elevated expression on monocytes is associated with clinical parameters linked to an aggressive disease phenotype and correlates with a worse prognosis. Monocyte-derived dendritic cells from GC patients differentiated in the presence of HGF adopt a regulatory phenotype with a lower expression of co-stimulatory molecules, impaired maturation capacities, and an increased ability to produce interleukin-10 and to induce Treg differentiation in vitro. In the MEGA-ACCORD20-PRODIGE17 trial, GC patients

received an anti-HGF antibody treatment (rilotumumab), which had been described to have an anti-angiogenic activity by decreasing proliferation of endothelial cells and tube formation. Rilotumumab decreased circulating Treg in GC patients. Thus, we identified that HGF indirectly triggers Treg accumulation via c-Met-expressing monocytes in the peripheral blood of GC patients. Our study provides arguments for potential alternative use of HGF/c-Met targeted therapies based on their immunomodulatory properties which could lead to the development of new therapeutic associations in cancer patients, for example with immune checkpoint inhibitors.

Keywords: hepatocyte growth factor; c-Met; pro-angiogenic factor; regulatory T cells; gastric cancer; targeted therapies; anti-HGF

1. Introduction

One of the potential obstacles to reducing the efficacy of immunotherapy resides in the presence of immunosuppressive cells such as regulatory T cells (Treg). Treg are enhanced in the peripheral blood and abundantly infiltrate tumor tissues in cancer patients. They hamper an efficient tumor immunity and represent a key mechanism of tumor evasion [1]. Thus, identification of factors influencing Treg accumulation in tumor-bearing hosts is essential for the understanding of Treg biology and could provide therapeutic targets.

We have previously shown that a pro-angiogenic factor, the vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) which is highly produced in tumor-bearing hosts, could be involved in the accumulation of Treg and that anti-angiogenic (AA) molecules targeting the VEGF-A/VEGFR pathway could decrease Treg in a mouse model of colorectal cancer and metastatic colorectal cancer patients [2]. However, other pro-angiogenic factors could be produced by the tumor or by cells from the tumor microenvironment such as Hepatocyte Growth Factor (HGF) [3]. HGF, which is the ligand of the c-Met receptor, is involved in the regulation of different cellular properties including cell proliferation, invasion, angiogenesis, and plays a key role in physiological processes such as embryogenesis, tissue repair, and regeneration [4]. The HGF/c-Met pathway is aberrantly activated or overexpressed in epithelial cancers such as gastric, lung, or ovarian cancers [5] and is an important actionable target in many solid tumors. In two meta-analyses with more than 2000 gastric cancer (GC) patients, *c-Met* amplification or overexpression is associated with a poor prognosis [6,7]. C-Met expression is a predictor of invasive growth in GC [8]. High plasmatic HGF level also correlates with poor overall survival in GC patients [9]. Beyond these cellular properties, the HGF/c-Met pathway has also been involved in immune responses [10,11], notably by different works performed in experimental animal models of inflammatory or autoimmune diseases. In a mouse model of experimental autoimmune encephalitis, overexpression of HGF in neurons or systemic administration of HGF induce an increase of Treg and limit neuroinflammation [12,13]. In cancer, HGF is mainly produced by stromal cells from the tumor microenvironment but also by tumor cells themselves and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) [14,15]. While HGF is associated with a poor prognosis particularly in patients with GC, the role of HGF in Treg accumulation in the context of cancer has not been documented. Based on these previous reports, we hypothesized that the HGF/c-Met pathway could contribute to the increase of Treg in cancer patients. In this study, we aimed to explore the role of the HGF/c-Met axis and the impact of an anti-HGF antibody (rilotumumab) on circulating Treg in GC patients.

2. Material and Methods

2.1. Patients

2.1.1. HEGP Cohort

80 patients with histologically proven gastric or esogastric junction adenocarcinoma treated in the Gastro-intestinal Oncology unit of Georges Pompidou European Hospital (Pr. J. Taieb) were included from January 2016 to July 2020. The study was approved by the

local ethics committee (Comité de Protection des Personnes d’Île-de-France 04/09/2014). Oral and written information was provided, and each patient signed a written consent prior to enrolment. For each patient, a blood sample was collected before or throughout planned treatment. Clinical and pathological data were obtained from medical records. Patients’ characteristics at the time of blood collection are presented in Table 1. Patients with autoimmune diseases or receiving targeted therapies or monoclonal antibodies (such as trastuzumab and ramucirumab) were excluded. Survival was evaluated in 37 patients who had received a maximum of one cycle of chemotherapy, or no treatment at all, before blood sample collection.

Table 1. Characteristics of patients from the HEGP cohort.

	N = 80	N (%)
Age (years)		
median		65
Sex		
male		56 (70)
female		24 (30)
Localization		
lower esophagus		4 (5)
esogastric junction		17 (21.5)
gastric body		57 (71)
missing data		2 (2.5)
Differentiation		
well		8 (10)
moderate		28 (35)
poor		28 (35)
missing data		16 (20)
Linitis		
yes		14 (17.5)
no		45 (56)
mixed		11 (14)
missing data		10 (12.5)
Disease status		
local/locally advanced		28 (35)
metastatic		52 (65)
Tumor burden		
yes		70 (87.5)
no (post-surgery patients)		10 (12.5)
HER2 status		
positive		11 (13.75)
negative		61 (76.25)
missing data		8 (10)

2.1.2. PRODIGE 17-ACCORD 20-MEGA Trial

The PRODIGE 17-ACCORD 20-MEGA trial is a randomized three-arm phase II study that evaluated the association of chemotherapy (FOLFOX) combined with rilotumumab (a monoclonal antibody targeting HGF) or panitumumab (a monoclonal antibody targeting EGFR) in comparison with FOLFOX alone in 162 patients with advanced GC. The trial eligibility criteria and treatments were reported previously [16]. In 123 patients, an ancillary study has been conducted to assess the evolution of circulating immune cell populations before and during treatment. The baseline characteristics of patients included in the ancillary cohort are shown in Table 2. Blood samples were collected before (day 1) and after two cycles (day 28) of treatment. Peripheral Blood Mononuclear cells (PBMCs) were isolated from peripheral blood on Ficoll–Hypaque gradients, Treg staining was performed on fresh PBMCs and analyzed by flow cytometry (see the corresponding paragraph). The assessment of circulating immune cells was planned in the initial design of the study. The final analysis presented hereby included 64 patients for whom data on circulating Treg

were available both on day 1 and day 28. Specific informed consent was required for each patient. The trial was registered with the US and French health registries (NCT01443065, EudraCT No. 2009-012797-12). The study protocol has been approved by a French national ethics committee.

Table 2. Characteristics of patients from the PRODIGE17-ACCORD20-MEGA ancillary cohort.

	N = 80	N (%)
Age (years)		
median		65
Sex		
male		56 (70)
female		24 (30)
Localization		
lower esophagus		4 (5)
esogastric junction		17 (21.5)
gastric body		57 (71)
missing data		2 (2.5)
Differentiation		
well		8 (10)
moderate		28 (35)
poor		28 (35)
missing data		16 (20)
Linitis/Diffuse type (Lauren's classification)		
yes		14 (17.5)
no		45 (56)
mixed		11 (14)
missing data		10 (12.5)
Disease status		
local/locally advanced		28 (35)
metastatic		52 (65)
Tumor burden		
yes		70 (87.5)
no (post-surgery patients)		10 (12.5)
HER2 status		
positive		11 (13.75)
negative		61 (76.25)
missing data		8 (10)
chemotherapy received by metastatic patients		
FOLFOX		25 (48)
FOLFIRI		6 (11.5)
FOLFOX HERCEPTIN		3 (5.8)
OTHER		8 (15.4)
NONE		7 (13.5)

2.1.3. Healthy Controls

Blood samples from healthy controls (HC) were obtained at Etablissement Français du Sang (European Georges Pompidou Hospital, Paris, convention N°C CPSL UNT-N°13/R/013).

2.2. Monocyte Isolation and Culture

PBMCs were isolated by Pancoll density gradient centrifugation (PANbiotech, Aidenbach, Deutschland). CD14⁺ monocytes were isolated by magnetic labeling followed by negative magnetic selection (Pan Monocyte Isolation kit; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The purity of the obtained monocyte fraction was verified by immunostaining. Monocytes were then cultured at 37 °C in AIMV-Albumax medium (ThermoFisher Scientific, Walltam, Massachusetts, USA) at the concentration of 1×10^6 cells/mL, supplemented with human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) (1000 UI/mL; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and human Interleukin 4 (IL-4) (400 UI/mL;

Miltenyi Biotec) (=control condition) or GM-CSF, IL-4 and human HGF (=HGF condition) (20 ng/mL; Miltenyi Biotec). On day 3, the medium was changed, and fresh cytokines were added at the same concentrations. On day 6, culture supernatants and obtained cells were collected. Cytokine dosage and cellular immunostaining were then performed (see corresponding paragraphs). In 7 independent experiments, to provide a maturation signal to DCs, Lipopolysaccharide (LPS) (1 µg/mL; Sigma–Aldrich, Saint-Louis, MI, USA) or control PBS was added to the culture. After 24 h, culture supernatants and cells were collected.

2.3. Isolation of CD4⁺ T Cells

PBMCs from HC were isolated by Pancoll density gradient centrifugation. CD4⁺ cells were then isolated by magnetic labeling followed by negative magnetic selection (Miltenyi Biotec). The purity of the obtained CD4⁺ cellular fraction was assessed by immunostaining.

2.4. Monocyte/Lymphocyte Co-Culture

After 6 days of culture in standard or HGF condition, monocyte-derived DCs generated from GC patients were collected as previously described. DCs were then co-cultured with freshly isolated CD4⁺ T cells at a ratio of 5 lymphocytes for 1 dendritic cell in AIMV-Albumax medium (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) at 37 °C for 7 days. After 7 days of co-culture, cells were collected and immunostaining was performed.

2.5. Immunostaining

Cells were first incubated for 15 min with Human True Stain FcX Blocking reagent (Biolegend, San Diego, California, USA) to prevent unspecific binding of the antibodies to Fc receptors. Then cells were incubated for 20 min at 4 °C with the following fluorochrome-conjugated antibodies or their corresponding isotype controls: CD14 (clone: 61D3); HLA-DR (clone: LN3); CD3 (clone: OKT3); CD56 (clone: MEM-188); CD19 (clone: HIB19); CD80 (clone: 2D10.4); CD83 (clone: HB15e); CD86 (clone: IT2.2); CD25 (clone: BC96); CD127 (clone: eBioRD); FoxP3 (clone: PCH101) (all purchased at ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA); CD11c (clone: 3.9); CD16 (clone: 3G8); HLA-DR (clone: LN3); PD-L1 (clone: 29E2A3); ILT-3 (clone: ZM4.1); Tim3 (clone: F38-2E2); CD1a (clone: HI149); CD14 (clone: HCD14); CD209 (clone: 9E9A8); CD40 (clone: HB14); CD64 (clone: 10.1); CD1c (clone: L161); CD4 (clone: OKT4) (all purchased at Biolegend, USA); Ki-67 (clone: MOPC-21) purchased at BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, USA); cMet APC (clone: 95106) purchased at R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Intracellular staining was performed using Foxp3/transcription factor staining buffer set (ThermoFisher Scientific) according to manufacturer's recommendations. Cell viability was assessed using the LIVE/DEAD fixable dead stain kit (Thermo Fisher Scientific). Samples were run through a LSRII flow cytometer or Fortessa ×20 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) using DIVA[®] software (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Analysis were performed using FlowJo[®] software (Flow Jo, Ashland, OR, USA). Dead cells and doublet cells were excluded from the analysis. Isotype controls and fluorescence minus one controls were used as negative controls.

2.6. Analysis of Cytokine Production

IL-10 and TGF-β1 levels in culture supernatants were assessed by enzyme-linked immunoabsorbent assays (ELISAs) using commercially available kits (respectively purchased at Biolegend and R&D Systems). The limits of detection were 3.9 pg/mL for IL-10 and 31.2 pg/mL for TGF-β1. HGF and IL-10 levels in plasma from GC patients and HC were assessed by enzyme-linked immunoabsorbent assays (ELISAs) using a commercially available kit (respectively R&D Systems and Biolegend). The limit of detection for HGF was 156 pg/mL.

2.7. Statistical Analyses

Results are presented as mean and Standard Error of the Mean (SEM). All statistical analyses were performed with GraphPad Prism[®] software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Comparisons were performed with Wilcoxon, Mann Whitney, or Kruskal Wallis test, as appropriate. Overall survival (OS) was defined as the time from randomization to death by any cause. OS was estimated by the Kaplan-Meier method. Univariate analysis was performed using a proportional hazard model to estimate the hazard ratio. Comparisons were performed using the log-rank test. A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant. All statistical tests were two-sided.

3. Results

3.1. C-Met Receptor Is Expressed on Peripheral Blood Monocytes in GC Patients

A prospective cohort of GC patients has been set up. Patients' characteristics are reported in Table 1. Plasmatic HGF level was increased in GC patients compared to HC patients (1407 ± 126 pg/mL vs. 658.6 ± 153 pg/mL, $p = 0.031$; Supplementary Figure S1A) and was associated with a more advanced disease phenotype since metastatic patients exhibited higher levels of plasmatic HGF than patients with localized disease (1726 ± 136.3 pg/mL vs. 1010 ± 152.9 pg/mL, $p = 0.0047$; Supplementary Figure S1B), as previously reported [17]. We first analyzed the expression of c-Met in the peripheral blood of GC patients from our cohort. A marginal expression of c-Met was found on Treg and conventional T cells ($0.55 \pm 0.20\%$ on Treg and $0.36 \pm 0.13\%$ on Tconv, Figure 1A,B,D) but c-Met was expressed on circulating monocytes ($20.24 \pm 2.32\%$) (Figure 1C,D). In 14 patients, we assessed c-Met on different monocyte subsets characterized by the expression of CD14 and CD16 [18]. C-Met was present on all monocyte subsets, however its expression level seemed to be lower in CD14^{int}/CD16^{hi} subset in comparison to CD14^{high}/CD16⁻ population (Figure 1E) (respectively $17.10 \pm 3.91\%$ and $25.67 \pm 4.95\%$, $p = 0.0166$). As observed in Figure 1D, the c-Met expression on monocytes is heterogeneous among the patients and distributed between 0.38 and 90%. We then sought an association between c-Met expression on monocytes and clinical features. The c-Met expression did not vary according to tumor location (Figure 2A). Histological features such as tumor differentiation or linitic phenotype (including diffuse carcinomas according to Lauren's classification and signet ring cell carcinomas according to OMS' classification [19]) are of importance since they are associated with different clinical outcomes and different immune infiltrate as we previously showed [20]. No correlation has been observed between linitic phenotype and c-Met expression (Figure 2B) but a poor differentiation grade was associated with an enhanced c-Met expression on monocytes compared to well or moderately differentiated tumors ($27.1 \pm 4.6\%$ vs. $17.1 \pm 2.9\%$; $p = 0.046$) (Figure 2C). Interestingly, the presence of metastases was linked to a higher c-Met expression on monocytes (metastatic: $23.6 \pm 3.2\%$ vs. localized or locally advanced: $15.3 \pm 3.2\%$; $p = 0.043$) (Figure 2D). Thus, it seemed that c-Met expression on circulating monocytes was associated with an aggressive disease phenotype. To further assess the prognostic significance of c-Met expression by peripheral monocytes, we compared the survival probability of patients harboring a lower c-Met expression on monocytes (inferior to the observed median value on the global population = 12.2%) with those harboring a higher c-Met expression (above median value) before any treatment or after no more than one cycle of treatment (survival population), using a univariate model. The characteristics of the survival population are presented in Supplemental Table S1. In our survival population, a higher c-Met expression on circulating monocytes was associated with poorer survival (median OS: 19.4 vs. 34.9 months) ($p = 0.017$) (Figure 2E).

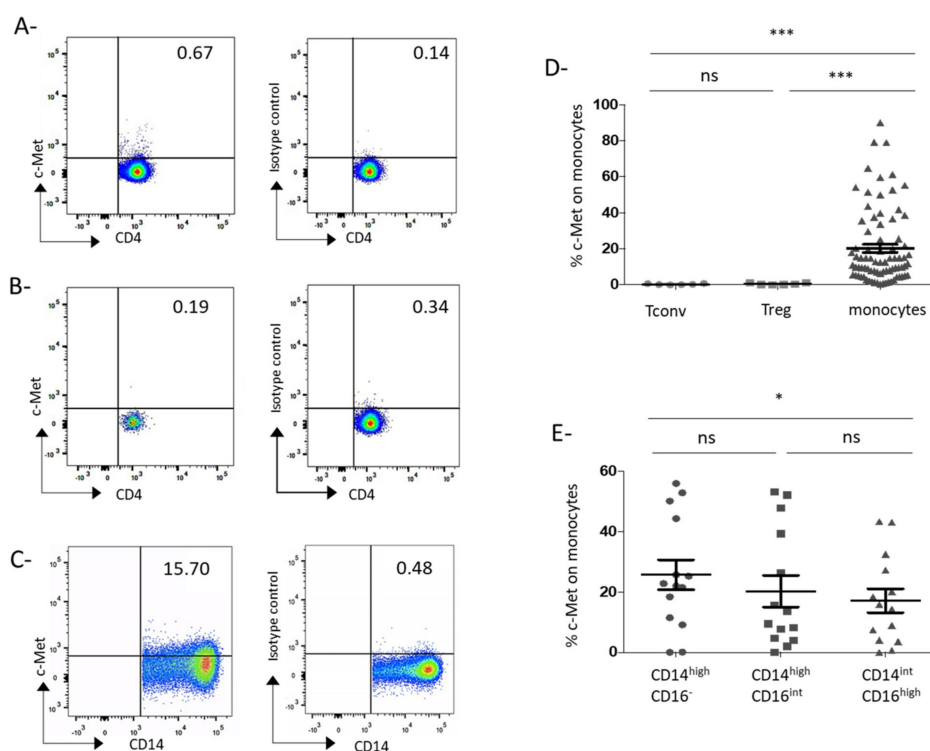


Figure 1. Circulating monocytes but not circulating conventional or regulatory T cells express the c-Met receptor in GC patients. Freshly isolated PBMCs from GC patients were stained with fluorochrome-conjugated antibodies or their isotype control and analyzed by flow cytometry. Tconv were defined as CD4⁺/CD25⁻ cells. Treg were defined as CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺/CD127^{low} cells. Monocytes were defined as CD14⁺/HLA-DR⁺/CD3⁻/CD56⁻/CD19⁻ cells. (A–C) Representative c-Met expression by Tconv (A), Treg (B), and monocytes (C) of GC patients. Results are indicated in percentages of c-Met positive cells. (D) Mean c-Met expression by peripheral Tconv (mean ± SEM: 0.36 ± 0.13%; n = 6), Treg (mean ± SEM: 0.55 ± 0.20%; n = 6) and monocytes (mean ± SEM: 20.24 ± 2.32%; n = 80) from GC patients. *** indicates a *p*-value ≤ 0.001 according the Kruskal-Wallis multiple comparisons test. (E) Mean c-Met expression by the three monocytes subpopulations from GC patients (n = 14): CD14^{high}CD16^{low} (mean ± SEM: 25.67 ± 4.95%), CD14^{high}CD16^{int} (mean ± SEM: 20.24 ± 5.26%) and CD14^{int}CD16^{high} (mean ± SD: 17.10 ± 3.914%). * indicates a *p*-value ≤ 0.05 according the Friedman multiple comparisons test. Ns: nonsignificant.

Furthermore, the c-Met expression on monocytes was decreased in patients who underwent tumor resection by gastrectomy (patients with a resected localized tumor) compared to patients with an active tumor burden (patients with a non-resected localized tumor or metastatic patients) (5.62 ± 1.24% and 22.33 ± 2.55%, respectively; *p* = 0.001) (Figure 2F). These results suggested that the presence of the tumor is involved in the c-Met expression on monocytes in GC patients. For one patient, we could obtain peripheral blood before and after tumor resection by gastrectomy. In this patient, c-Met was highly expressed on monocytes before surgery (66.6%) and dropped after resection of the tumor (11.9%; Figure 2G). In parallel, HGF plasmatic level was significantly enhanced in the plasma of patients with more than 5% of monocytes expressing c-Met (Supplementary Figure S1C).

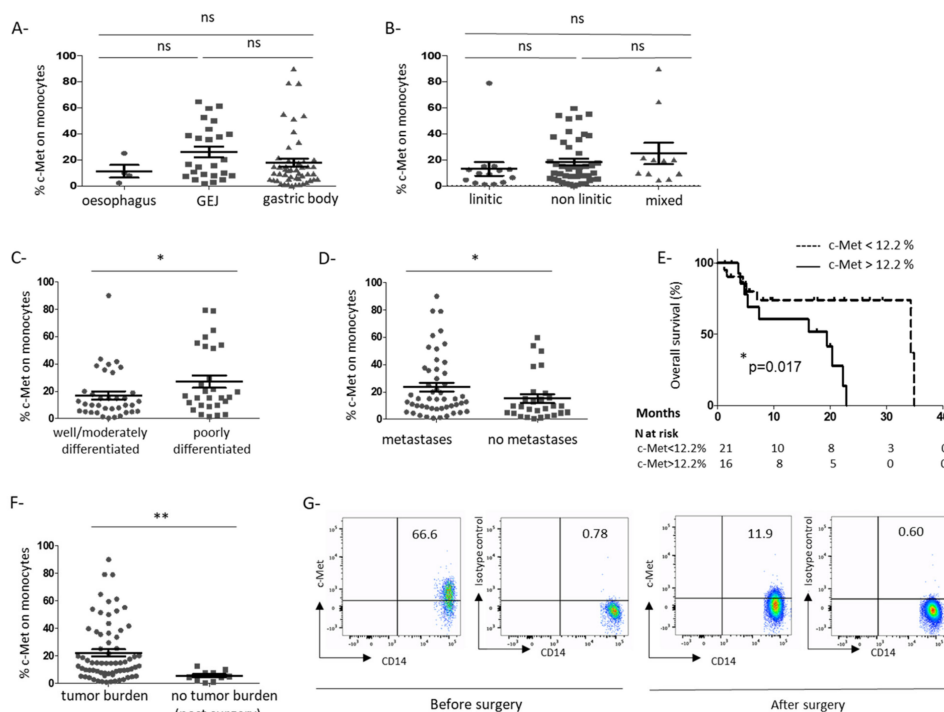


Figure 2. The C-Met expression on circulating monocytes is associated with an aggressive disease phenotype in GC patients. Clinical and pathological characteristics of the GC patients included in our cohort were analyzed ($n = 80$) (A–D,F). C-Met expression was assessed by flow cytometry as in Figure 1. Mean c-Met expression on circulating monocytes according to tumor location (esophagus, gastro–esophagic junction (GEJ), gastric body) (A), linitic status (B), tumor differentiation (C), presence of metastases (D), and presence of an evolutive tumor burden (F). * indicates a p -value ≤ 0.05 and ** indicates a p -value ≤ 0.01 according to the Mann-Whitney test. NS: nonsignificant (E) For 37 patients who had received 1 or 0 cycles of chemotherapy before assessment of c-Met expression, survival probability has been estimated according to c-Met expression level on monocytes (high expression > median $n = 16$ (full line), lower expression < median, $n = 21$ (dashed line)). The median was calculated on the global population. ($p = 0.017$ according the Log-rank test). (G) For one patient with a localized tumor, the c-Met expression on circulating monocytes was assessed by flow cytometry before and after tumor resection (gastrectomy). Results are indicated as percentages of c-Met positive cells.

Thus, c-Met is expressed on circulating monocytes and is associated with poor tumor differentiation, the presence of metastases, and poorer survival in GC patients. Furthermore, high c-Met expression is linked to the presence of a tumor burden suggesting that a tumor-derived factor could be involved in the c-Met expression on monocytes.

3.2. HGF Induces the Differentiation of Monocytes into Dendritic Cells with Tolerogenic Properties

We next explored the impact of HGF on monocyte differentiation into DCs. Isolated CD14⁺ monocytes from peripheral blood of GC patients were cultured in a DC differentiation medium with or without HGF. After 6 days of culture, DCs were generated expressing CD11c, HLA-DR, CD209, and CD1c (Figure 3A and Figure S2). The percentage of CD11c⁺ HLA-DR⁺ cells was similar in these two conditions ($86.6 \pm 2.22\%$ and $83.99 \pm 2.56\%$, respectively) (Figure 3A). Then we analyzed the expression of costimulatory molecules on DCs cultured with or without HGF at day 6. No significant difference was observed for CD80

or CD83, but CD86 expression was significantly decreased in the presence of HGF (Median Fluorescence Intensity-MFI: $2.5 \pm 0.28 \times 10^4$ with HGF vs. $3.7 \pm 0.65 \times 10^4$ without HGF; $p = 0.0003$) (Figure 3B,C). Interestingly, CD86 was not decreased when DC was cultured in the presence of Epithelial Growth Factor (EGF), another growth factor involved in cancer development (data not shown). HLA-DR was also lowered in the presence of HGF (MFI: $1.5 \pm 0.14 \times 10^4$ with HGF vs. $1.8 \pm 0.2 \times 10^4$ without HGF; $p = 0.033$) (Figure 3B,C). HGF did not affect CD40 expression nor the expression of inhibitory receptors such as PD-L1, Tim-3, or ILT-3 (Supplementary Figure S2). To determine if HGF can impact the maturation of DCs, we stimulated DCs with LPS to induce their maturation and analyzed the expression of these different costimulatory molecules 24 h later. Whereas LPS induced upregulation of CD83, CD86, and HLA-DR on DCs generated without HGF, these maturation markers were not upregulated on DCs cultured in the presence of HGF (Figure 3D). We next evaluated immunosuppressive cytokines secretion by these DCs cultured in the presence or absence of HGF. TGF- β was detected in DCs supernatants (Figure 3E) but with no significant difference between these two culture conditions. HGF-DCs produced higher amount of IL-10 compared with DCs cultured without HGF (193.3 ± 80.32 pg/mL with HGF vs. 101.6 ± 54.16 pg/mL without HGF; $p < 0.0001$) (Figure 3E).

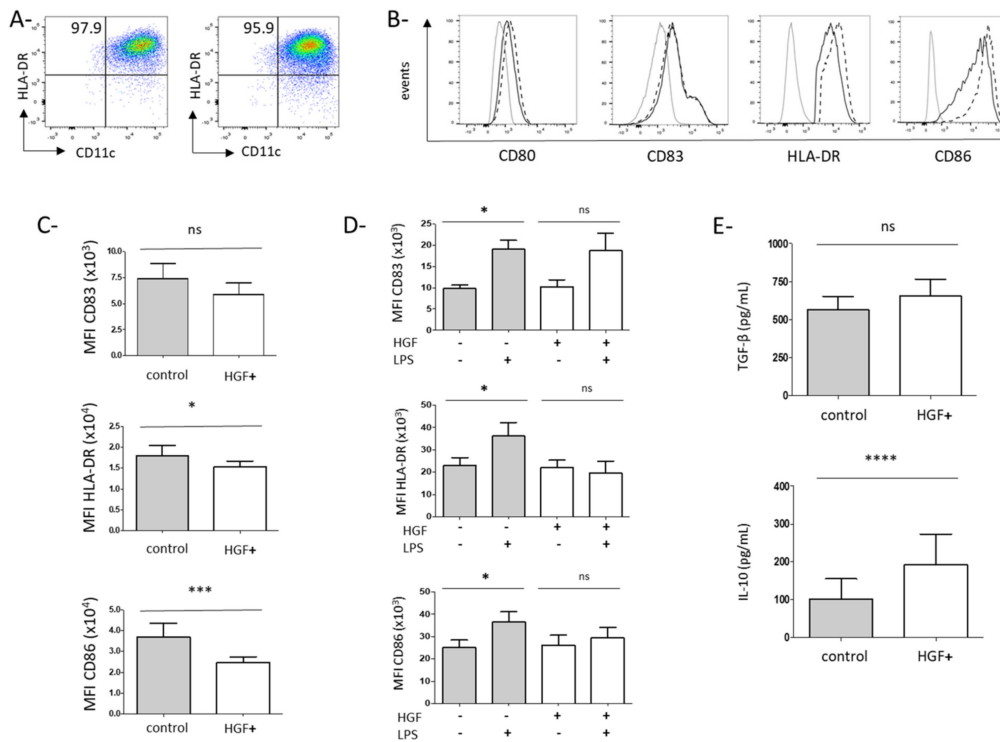


Figure 3. HGF modulates monocyte-derived DC differentiation from GC patients into a regulatory phenotype in vitro. Freshly isolated peripheral monocytes from GC patients were cultured in the presence of GM-CSF and IL-4 with HGF (=HGF condition) or without HGF (=control condition) as described in the material and method section. After 6 days,

cell phenotype was assessed by flow cytometry. In both conditions, monocyte-derived cells harbored DC features such as CD11c and HLA-DR co-expression. (A) CD11c and HLA-DR expression by monocyte-derived DCs without (left panel) or with HGF (right panel). Results are indicated as percentages of CD11⁺ HLA-DR⁺ cells. Representative staining out of 45 independent experiments with similar results is shown. (B) Expression of CD80, CD83, HLA-DR, and CD86 in DCs generated without (black dashed curve) or with HGF (black full curve). Markers were set on their proper isotype control (light grey curve). A representative staining out of respectively 23, 45 and 29 independent experiments is shown (C) Median Fluorescence Intensity (MFI) of CD83 ($n = 23$), HLA-DR ($n = 45$) and CD86 ($n = 29$) by DCs generated in control condition or in HGF condition. * indicates a p -value ≤ 0.05 according to the Wilcoxon test. *** indicates a p -value ≤ 0.001 according to the Wilcoxon test. NS: non significant. After 6 days of culture, DCs were matured with LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or control PBS. After 24 h, cells were collected, and their phenotype was studied by flow cytometry. (D) Mean expression (MFI) of CD83 (upper panel, $n = 6$), HLA-DR (center panel, $n = 6$) and CD86 (lower panel, $n = 6$) by DCs generated in control or HGF condition with or without LPS. * indicates a p -value ≤ 0.05 according to the Wilcoxon test. Culture supernatants were collected and cytokine levels were assessed by ELISA. (E) TGF- β levels (upper panel, $n = 18$) and IL-10 levels (lower panel, $n = 26$) in supernatants of control or HGF-generated DCs. **** indicates a p -value ≤ 0.0001 according to the Wilcoxon test.

Thus, HGF does not prevent DCs differentiation but restrains HLA-DR and CD86 expression and full maturation induced by a maturing agent such as LPS. Furthermore, HGF enhances the production of IL-10, an immunosuppressive cytokine by DCs.

3.3. HGF-Generated DCs Induce the Development of Regulatory T Cells in Gastric Cancer Patients

Given the higher production of IL-10 by HGF-generated DCs and their impaired maturation, we hypothesized that HGF-DCs could be involved in Treg accumulation. To test this hypothesis, we cocultured DCs differentiated from circulating monocytes of GC patients in the presence or absence of HGF with allogeneic purified CD4⁺ T cells. HGF-generated DCs enhanced the proportion of CD25⁺Foxp3⁺CD127^{lo} Treg in coculture compared to control-DCs ($p = 0.008$) (Figure 4A). Furthermore, we observed an increase of Ki67 expression in these Treg, suggesting that HGF-generated DCs induced the proliferation of Treg in culture ($p = 0.002$) (Figure 4B).

3.4. Rilotumumab, an Anti-HGF Antibody, Reduces Treg Proportion in the Peripheral Blood of Advanced GC Patients

Next, we took advantage of a clinical trial (Prodige 17-ACCORD20-MEGA) evaluating the impact of an anti-HGF antibody (rilotumumab) in association with chemotherapy in advanced GC patients. In this three-arm trial, patients were randomized to receive either chemotherapy alone (Folfox), chemotherapy associated with rilotumumab, or chemotherapy associated with an anti-EGFR (panitumumab) (Table 2). We evaluated the percentage of circulating Treg before and after 2 cycles of treatment. Only patients receiving the association of chemotherapy and anti-HGF exhibited a decrease of Treg proportion after 2 cycles of treatment compared to baseline ($p < 0.0001$). On the opposite, no modification of circulating Treg proportion was observed in patients receiving chemotherapy alone or chemotherapy associated with anti-EGFR suggesting that Treg decrease was due to rilotumumab (Figure 4C). Furthermore, for 9 patients from the rilotumumab group, we had enough cells before treatment to analyze c-Met expression on monocytes. We could confirm that circulating monocytes express c-Met in this group (Figure 4D).

Thus, inhibition of HGF in advanced GC patients decreased circulating Treg.

Taken together, our findings suggest that the HGF/c-Met pathway is involved in Treg accumulation in the context of cancer. In advanced GC patients, circulating monocytes express the c-Met receptor and could differentiate into DCs with tolerogenic properties in vitro in the presence of HGF. Inhibition of the HGF/c-Met pathway could prevent Treg increase in cancer patients.

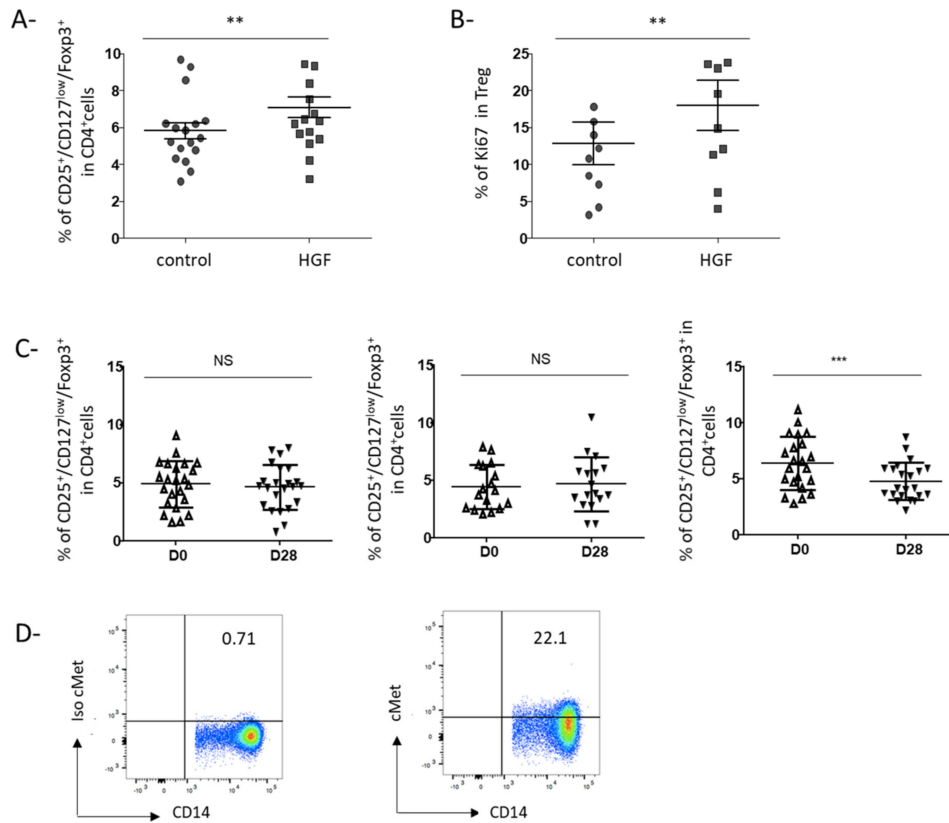


Figure 4. The proportion of regulatory T cells is enhanced by HGF-DCs in vitro and is decreased by rilotumumab (a monoclonal antibody targeting HGF) in vivo in gastric cancer patients. **(A,B)** After 6 days of culture, HGF-DCs or control-DCs were then co-cultured with freshly isolated CD4⁺ T cells from HC. After 7 days of co-culture, cells were collected and their phenotype was assessed by immunostaining and flow cytometry. Treg were defined as CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ CD127^{low} cells. Treg proliferation was assessed by Ki-67 intra-cellular expression. **(A)** The proportion of Treg amongst CD4⁺ T cells after 7 days of co-culture with control-DCs or HGF-DCs is shown ($n = 17$). **(B)** Ki67 was assessed in Treg cells after 7 days of co-culture with control-DCs or HGF-DCs ($n = 10$). ** indicates a p -value ≤ 0.01 according to the Wilcoxon test. **(C,D)** The PRODIGE 17-ACCORD 20-MEGA trial is a randomized three-arm phase II study that evaluated the efficacy of 3 treatment regimens in patients with advanced GC: chemotherapy (FOLFOX) alone, an association of FOLFOX + panitumumab (an anti-EGFR monoclonal antibody), or association of FOLFOX + rilotumumab (an anti-HGF monoclonal antibody). PBMCs were collected before (day 1) and after 2 cycles of treatment (day 28). Immunostaining was then performed and cells were analyzed by flow cytometry. Treg was defined as CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ CD127^{low} cells, monocytes were defined as CD3⁻/CD56⁻/CD19⁻/CD14⁺/HLA-DR⁺ cells as previously described. **(C)** Proportions of Treg amongst circulating CD4⁺ cells before and after two cycles of treatment in GC patients treated with FOLFOX ($n = 23$, left panel), FOLFOX + anti EGFR ($n = 17$, middle panel) or FOLFOX + anti HGF ($n = 21$, right panel) are shown. *** indicates a p -value ≤ 0.005 according to the Wilcoxon test. **(D)** Monocytes from PBMC of 9 GC patients included in the PRODIGE17-ACCORD20-MEGA trial were stained as described in Figure 1 ($n = 9$). Representative staining out of 9 independent experiments is shown. Results are indicated as percentages of c-Met positive cells.

4. Discussion

A link between HGF and Treg has been firstly reported in mouse models of transplantation, autoimmune or inflammatory disease [10–13]. In a swine model of allogeneic kidney transplantation, administration of HGF in the graft inhibited acute renal rejection and enhanced Treg [21]. In mice, HGF overexpression in neurons increased Treg percentage in the central nervous system and inhibited the development of experimental autoimmune encephalitis. This effect was related to the development of tolerogenic DCs [12]. Furthermore, in vitro human studies have reported that HGF induced the differentiation of monocytes from healthy volunteers into DCs with tolerogenic properties [22,23]. The HGF/c-Met pathway is upregulated in many different cancer types but the influence of this pathway on Treg development in cancer has to our knowledge not been explored. In this work, we first observed that circulating CD4⁺ T cells do not express c-Met on their cell surface. This is in accordance with previous reports showing no expression of c-Met on naïve T cells, or on circulating CD4⁺ T cells from multiple sclerosis patients [24]. Only subsets of highly autoreactive encephalitogenic CD8⁺ T cells and of CD4⁺ memory T cells which preferentially recirculate in the heart have been reported to express c-Met in mice [25,26]. On the other hand, we found that c-Met was present on circulating monocytes from GC patients. In healthy volunteers, circulating monocytes have previously been shown to express low levels of c-Met which can be enhanced during activation by endotoxin [27]. C-Met was also described on circulating monocytes from multiple sclerosis patients [24]. In hepatocellular carcinoma, Zhao et al. observed a subset of peritumoral monocytes expressing c-Met [28]. As far as we know, our study is the first to show an expression of c-Met on monocytes in the peripheral blood of cancer patients. This expression is not restricted to GC since we also observed the presence of c-Met on circulating monocytes from metastatic colorectal cancer patients ($n = 35$; mean: $12.68 \pm 2.90\%$, our unpublished data).

Our study pointed out that c-Met expression on monocytes was associated with the presence of a tumor since patients after tumor resection exhibit a lower c-Met level on monocytes compared to patients with a tumor burden (patients with a non-resected localized tumor or metastatic patients) (Figure 2F). Furthermore, in one patient we observed a decrease of c-Met after tumor resection. These results suggested that c-Met on monocytes could be induced or upregulated by a tumor-derived factor. Different works have shown that in vitro stimulation of tumor cell lines by soluble factors such as IL-1 β , TNF α , IL-6 or TGF β can enhance c-Met expression [29]. Since these cytokines are produced by tumors or by cells from the tumor microenvironment, they could also be involved in the c-Met expression on circulating monocytes from GC patients. On the other hand, HGF is also able to increase c-Met expression by an autocrine and paracrine manner on epithelial cells and tumor cell lines in vitro [30]. In this sense, we noticed that patients exhibiting an expression of c-Met above 5% have a plasmatic HGF level higher than patients with less than 5% of c-Met (Supplementary Figure S1). However, in preliminary experiments, we were not able to detect any modification of c-Met expression after HGF stimulation of monocytes (our unpublished data). Further investigations are needed to determine the mechanism of upregulation of c-Met on monocytes in GC patients.

In a study performed in 102 colorectal cancer patients, c-Met expression by the tumor was correlated to TNM status, lymph node, and liver metastases [31]. In our cohort of GC patients, the c-Met expression on monocytes was also associated with the presence of metastasis (Figure 2D). However, patients with liver metastasis did not exhibit an elevated level of c-Met expression compared to patients with other metastasis locations (data not shown). In two meta-analyses, c-Met amplification or overexpression by the tumor was related to a poor prognosis [6,7]. In our cohort, we observed that c-Met expression on monocytes was associated with more aggressive disease and poorer survival in GC patients in a univariate model (Figure 2C–E). Due to a small number of patients in our survival cohort, we were not able to perform a multivariate analysis.

Few works have previously reported the influence of HGF on monocytes in vitro. Stimulation of monocytes from HC with HGF induced the development of cells with DC

features able to produce IL-10 and to generate the differentiation of Treg from allogeneic CD4⁺ T cells [23,32]. Molnarfi et al. have shown that culture of monocytes from HC in DC differentiating medium in the presence of HGF leads to the development of DC exhibiting less costimulatory molecules and HLA-DR. In this condition, HGF enhanced the capacity of DC to stimulate Treg differentiation [22]. However, no study has been performed on monocytes from cancer patients. Since we observed that in GC patients, monocytes express c-Met, we purified circulating monocytes from these patients and cultured them in a DC differentiation medium with or without HGF. In accordance with the results previously published on monocytes from HC, we observed that HGF induced the development of DC: (1) expressing less CD86 and HLA-DR molecules; (2) impaired in their maturing capacity, (3) producing the anti-inflammatory IL-10 cytokine, and (4) facilitating the accumulation of Treg from allogeneic CD4⁺ T cells (Figure 3). Interestingly, in our cohort of patients, the plasmatic level of IL-10 was correlated with the c-Met expression on monocytes (Supplementary Figure S3), suggesting that this subset could be involved in IL-10 production in cancer patients. Treg accumulation in cancer could occur through different mechanisms such as an expansion of pre-existing Treg, conversion of conventional CD4⁺ T cells into Treg [33]. Treg accumulation induced by HGF-generated DC was at least partly due to enhanced proliferation of pre-existing Treg since upregulation of Ki67, a proliferation marker, was observed. Based on our *in vitro* results, we hypothesized that targeting HGF could modulate Treg in tumor-bearing patients. We analyzed peripheral Treg in GC patients and observed that targeting HGF with rilotumumab decreased Treg proportion in peripheral blood (Figure 4C).

HGF/c-Met pathway has been firstly described as a proangiogenic factor since it exhibits a very potent mitogenic activity on endothelial cells. HGF promotes endothelial motogenesis, tube and capillary blood vessels formation [34]. Early studies of the proangiogenic actions of HGF attributed the effects of HGF to the induction of VEGF-A [35]. However, HGF can also stimulate angiogenesis independently of VEGF-A by inducing different signaling pathways [36]. Furthermore, HGF represents an alternative proangiogenic pathway involved in resistance to AA treatments directed against VEGF-A [37]. Targeting the HGF/c-Met pathway, especially using rilotumumab, impacts angiogenesis as evidenced by a decrease in the proliferation of endothelial cells and tube formation in pancreatic cancer [38] and glioma [39]. Assessing the impact of rilotumumab on tumor vessels in our cohort of GC patients would have been of interest but we could not get tumor specimens before and after treatment since tumors were not resected or sampled in these metastatic GC patients after rilotumumab treatment. Our work provides a novel argument supporting the involvement of tumor-derived growth factors firstly described for their protumoral and/or proangiogenic capacities, in the immune escape observed in cancer. We and others have previously shown that VEGF-A, a proangiogenic factor, has an immunomodulatory role since it can elicit the accumulation of Treg and myeloid-derived suppressor cells, inhibit the maturation of dendritic cells and induce the expression of immune checkpoints on CD8⁺ T cells in tumor-bearing hosts [2,40,41]. In this work, we found that HGF, a protumoral and proangiogenic factor, is involved in Treg increase in the peripheral blood of cancer patients. Thus, targeting the HGF/c-Met axis has an immunomodulatory impact. Results from recent phase III studies assessing HGF/c-Met targeting therapies in GC have been disappointing [16]. However, based on these immunomodulatory properties, we could consider alternative uses of HGF/c-Met inhibitors which could be associated with immunotherapies such as the anti-PD-(L)1 antibody to unleash the immune system. Notably, cabozantinib, a multikinase inhibitor, targets not only HGF/c-Met but also the VEGF/VEGFR2 pathway [42], both involved in Treg accumulation in the context of cancer. Different works have recently shown that cabozantinib can decrease peripheral Treg in the MC38-CEA colorectal cancer model in mice [43] and also in patients with platinum-refractory metastatic urothelial carcinoma [44]. Considering our results, Treg drop could be attributable to c-Met/HGF and/or VEGF/VEGFR inhibition in this context. Associations of cabozantinib with different immunotherapies are being

evaluated in different clinical trials especially in GC patients (NCT04164979, NCT03539822). Recently, an association of cabozantinib with nivolumab has been reported to enhance OS and PFS in advanced renal cancer patients [45] and has been approved as first-line treatment in advanced renal cancer patients [46].

5. Conclusions

In conclusion, we show that c-Met is expressed on circulating monocytes from GC patients and that this expression is linked to an aggressive disease (poor differentiation, metastatic disease) and poorer survival. HGF influences the development of DC with tolerogenic properties able to induce the development of Treg. Finally, inhibition of HGF by rilotumumab inhibits the accumulation of Treg in GC patients. Using HGF/c-Met inhibition for their impact on immunosuppression could lead to the development of new therapeutic associations for example with immune checkpoint blockers.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13215562/s1>, Figure S1: Circulating HGF is correlated to higher c-Met expression by peripheral monocytes in GC patients, Figure S2: Phenotypic features of DCs generated from monocytes of gastric cancer patients in the presence of HGF, Figure S3: C-met expression on circulating monocytes is correlated to IL-10 plasmatic levels in GC patients, Table S1: Characteristics of the survival population.

Author Contributions: Conceptualization, J.P., L.H., A.L.-P. and M.T.; Formal analysis, J.P., L.H., A.L.-P., M.B., S.P., E.M., F.C. and C.T.; Funding acquisition, E.T., J.T. and M.T.; Investigation, J.P., L.H., A.L.-P., M.B., S.P., E.M., T.V. and A.L.; Resources, J.P., L.H., A.L.-P., D.M., N.B., E.F., F.G., C.d.l.F., A.Z. and J.T.; Validation, J.P., L.H., A.L.-P. and M.T.; Visualization, J.P. and M.T.; Writing—original draft, J.P. and M.T.; Writing—review & editing, L.H., M.B. and C.T., J.P., M.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work has been supported by Cancéropôle Ile de France/INCa (2017-1-EMERG-74-INSERM-5-1), Amgen (Prodige 17-Mega trial), Association des Gastroentérologues Oncologues (AGEO), SIRIC CARPEM, Labex Immuno-oncology. JP received financial support from ITMO Cancer AVIESAN (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Sciences & Health) within the framework of the Cancer Plan. LH received a grant from Fondation pour la Recherche Médicale. ALP was supported by Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (Année Recherche). MB was supported by Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Comité de Protection des Personnes d'Ile-de-France 04/09/2014 for the HEGP Cohort. The Prodige 17 was approved by the Ethics Committee of Comité de Protection des Personnes Paris V and registered as EudraCT No. 2009-012797-12.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

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

Conflicts of Interest: Juliette Palle, Laure Hirsch, Morgane Bourhis, Elie Marcheteau, Thibault Voron, Florence Castan, Ariane Lacotte, Nadine Benhamouda, Corinne Tanchot have declared no potential conflict of interest. Alexandra Lapeyre-Prost declares personal fees from Merck, Amgen, Sanofi, Servier and Mundi Pharma outside of this work. Pr. Malka has received honoraria and non-financial support from Amgen, Bayer, Ipsen, Merck, Merck Serono, Pierre Fabre Oncologie, Roche, Sanofi, and Servier, and honoraria from Incyte, Leo Pharma, Shire, HalioDx, and Agios. Pernot reports Pierre Fabre, Sanofi, Bayer, Servier, Amgen, Merck: advisory/consultancy; honoraria. Pr. A. Zaanan has participated in consulting and/or advisory boards for Amgen, Lilly, Merck, Roche, Sanofi, Servier, Baxter, MSD, Pierre Fabre, Havas Life, Alira Health, Zymeworks. Pr Tartour reports research grants (Servier, Vaxeal), Honoraria (BMS, Merck-MSD), Advisory Board (BMS, Astra-Zeneca). Pr Taieb reports personal fees from Servier, Roche, Amgen, Merck Serono, MSD, Lilly, Sanofi, Pierre Fabre,

BMS, HallioDx outside the submitted work. Terme reports personal fees from Roche and Gilead and a research grant from Sanofi outside the submitted work.

References

1. Tanchot, C.; Terme, M.; Pere, H.; Tran, T.; Benhamouda, N.; Strioga, M.; Banissi, C.; Galluzzi, L.; Kroemer, G.; Tartour, E. Tumor-infiltrating regulatory T cells: Phenotype, role, mechanism of expansion in situ and clinical significance. *Cancer Microenviron.* **2013**, *6*, 147–157. [\[CrossRef\]](#)
2. Terme, M.; Pernot, S.; Marcheteau, E.; Sandoval, F.; Benhamouda, N.; Colussi, O.; Dubreuil, O.; Carpentier, A.F.; Tartour, E.; Taieb, J. VEGFA-VEGFR Pathway Blockade Inhibits Tumor-Induced Regulatory T-cell Proliferation in Colorectal Cancer. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 539–549. [\[CrossRef\]](#)
3. Bergers, G.; Hanahan, D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 592–603. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Trusolino, L.; Bertotti, A.; Comoglio, P.M. MET signalling: Principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 834–848. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Anestis, A.; Zoi, I.; Karamouzis, M.V. Current advances of targeting HGF/c-Met pathway in gastric cancer. *Ann. Transl. Med.* **2018**, *6*, 247. [\[CrossRef\]](#)
6. Yu, S.; Yu, Y.; Zhao, N.; Cui, J.; Li, W.; Liu, T. c-Met as a Prognostic Marker in Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e79137. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Peng, Z.; Zhu, Y.; Wang, Q.; Gao, J.; Li, Y.; Li, Y.; Ge, S.; Shen, L. Prognostic Significance of MET Amplification and Expression in Gastric Cancer: A Systematic Review with Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e84502. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Toiyama, Y.; Yasuda, H.; Saigusa, S.; Matushita, K.; Fujikawa, H.; Tanaka, K.; Mohri, Y.; Inoue, Y.; Goel, A.; Kusunoki, M. Co-expression of hepatocyte growth factor and c-Met predicts peritoneal dissemination established by autocrine hepatocyte growth factor/c-Met signaling in gastric cancer. *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 2912–2921. [\[CrossRef\]](#)
9. Park, D.J.; Yoon, C.; Thomas, N.; Ku, G.Y.; Janjigian, Y.Y.; Kelsen, D.P.; Ilson, D.H.; Goodman, K.A.; Tang, L.H.; Strong, V.E.; et al. Prognostic Significance of Targetable Angiogenic and Growth Factors in Patients Undergoing Resection for Gastric and Gastroesophageal Junction Cancers. *Ann. Surg. Oncol.* **2014**, *21*, 1130–1137. [\[CrossRef\]](#)
10. Papaccio, F.; della Corte, C.M.; Viscardi, G.; di Liello, R.; Esposito, G.; Sparano, F.; Ciardiello, F.; Morgillo, F. HGF/MET and the Immune System: Relevance for Cancer Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3595. [\[CrossRef\]](#)
11. Ilangumaran, S.; Villalobos-Hernandez, A.; Bobbala, D.; Ramanathan, S. The hepatocyte growth factor (HGF)-MET receptor tyrosine kinase signaling pathway: Diverse roles in modulating immune cell functions. *Cytokine* **2016**, *82*, 125–139. [\[CrossRef\]](#)
12. Benkhoucha, M.; Santiago-Raber, M.-L.; Schneider, G.; Chofflon, M.; Funakoshi, H.; Nakamura, T.; Lalive, P.H. Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 6424–6429. [\[CrossRef\]](#)
13. Benkhoucha, M.; Molnarfi, N.; Dunand-Sauthier, I.; Merkler, D.; Schneider, G.; Bruscoli, S.; Riccardi, C.; Tabata, Y.; Funakoshi, H.; Nakamura, T.; et al. Hepatocyte growth factor limits autoimmune neuroinflammation via glucocorticoid-induced leucine zipper expression in dendritic cells. *J. Immunol.* **2014**, *193*, 2743–2752. [\[CrossRef\]](#)
14. Owusu, B.; Gallemmo, R.; Janetka, J.; Klampfer, L. Hepatocyte Growth Factor, a Key Tumor-Promoting Factor in the Tumor Microenvironment. *Cancers* **2017**, *9*, 35. [\[CrossRef\]](#)
15. Beppu, K.; Uchiyama, A.; Morisaki, T.; Matsumoto, K.; Nakamura, T.; Tanaka, M.; Katano, M. Hepatocyte growth factor production by peripheral blood mononuclear cells of recurrent cancer patients. *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 2195–2200.
16. Malka, D.; François, E.; Penault-Llorca, F.; Castan, F.; Bouché, O.; Bennouna, J.; Ghiringhelli, F.; de la Fouchardière, C.; Borg, C.; Samalin, E.; et al. FOLFOX alone or combined with rilotumumab or panitumumab as first-line treatment for patients with advanced gastroesophageal adenocarcinoma (PRODIGE 17-ACCORD 20-MEGA): A randomised, open-label, three-arm phase II trial. *Eur. J. Cancer* **2019**, *115*, 97–106. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Amemiya, H.; Kono, K.; Itakura, J.; Tang, R.F.; Takahashi, A.; An, F.Q.; Kamei, S.; Iizuka, H.; Fujii, H.; Matsumoto, Y. c-Met expression in gastric cancer with liver metastasis. *Oncology* **2002**, *63*, 286–296. [\[CrossRef\]](#)
18. Ziegler-Heitbrock, L. Blood Monocytes and Their Subsets: Established Features and Open Questions. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 423. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Pernot, S.; Voron, T.; Perkins, G.; Lagorce-Pages, C.; Berger, A.; Taieb, J. Signet-ring cell carcinoma of the stomach: Impact on prognosis and specific therapeutic challenge. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 11428–11438. [\[CrossRef\]](#)
20. Pernot, S.; Terme, M.; Radosevic-Robin, N.; Castan, F.; Badoual, C.; Marcheteau, E.; Penault-Llorca, F.; Bouche, O.; Bennouna, J.; Francois, E.; et al. Infiltrating and peripheral immune cell analysis in advanced gastric cancer according to the Lauren classification and its prognostic significance. *Gastric Cancer* **2020**, *23*, 73–81. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Oku, M.; Okumi, M.; Shimizu, A.; Sahara, H.; Setoyama, K.; Nishimura, H.; Sada, M.; Scalea, J.; Ido, A.; Sachs, D.H.; et al. Hepatocyte growth factor sustains T regulatory cells and prolongs the survival of kidney allografts in major histocompatibility complex-inbred CLAWN-miniature swine. *Transplantation* **2012**, *93*, 148–155. [\[CrossRef\]](#)
22. Molnarfi, N.; Benkhoucha, M.; Juillard, C.; Bjarnadóttir, K.; Lalive, P.H. The neurotrophic hepatocyte growth factor induces protolerogenic human dendritic cells. *J. Neuroimmunol.* **2014**, *267*, 105–110. [\[CrossRef\]](#)

23. Rutella, S.; Bonanno, G.; Procoli, A.; Mariotti, A.; de Ritis, D.G.; Curti, A.; Danese, S.; Pessina, G.; Pandolfi, S.; Natoni, F.; et al. Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10⁺/IL-12^{low}/neg accessory cells with dendritic-cell features. *Blood* **2006**, *108*, 218–227. [[CrossRef](#)]
24. Molnarfi, N.; Benkhoucha, M.; Bjarnadóttir, K.; Juillard, C.; Lalive, P.H. Interferon- β Induces Hepatocyte Growth Factor in Monocytes of Multiple Sclerosis Patients. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e49882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Benkhoucha, M.; Senoner, I.; Lalive, P.H. C-Met is expressed by highly autoreactive encephalitogenic CD8⁺ cells. *J. Neuroinflammation* **2020**, *17*, 68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Komarowska, I.; Coe, D.; Wang, G.; Haas, R.; Mauro, C.; Kishore, M.; Cooper, D.; Nadkarni, S.; Fu, H.; Steinbruchel, D.A.; et al. Hepatocyte Growth Factor Receptor c-Met Instructs T Cell Cardiotropism and Promotes T Cell Migration to the Heart via Autocrine Chemokine Release. *Immunity* **2015**, *42*, 1087–1099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Galimi, F.; Cottone, E.; Vigna, E.; Arena, N.; Boccaccio, C.; Giordano, S.; Naldini, L.; Comoglio, P.M. Hepatocyte growth factor is a regulator of monocyte-macrophage function. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 1241–1247. [[CrossRef](#)]
28. Zhao, L.; Wu, Y.; Xie, X.-D.; Chu, Y.-F.; Li, J.-Q.; Zheng, L. c-Met identifies a population of matrix metalloproteinase 9-producing monocytes in peritumoural stroma of hepatocellular carcinoma. *J. Pathol.* **2015**, *237*, 319–329. [[CrossRef](#)]
29. Moghul, A.; Lin, B.; Beedle, A.; Kanbour-Shakir, A.; DeFrances, M.C.; Liu, Y.; Zarnegar, R. Modulation of c-MET proto-oncogene (HGF receptor) mRNA abundance by cytokines and hormones: Evidence for rapid decay of the 8 kb c-MET transcript. *Oncogene* **1994**, *9*, 2045–2052.
30. Boccaccio, C.; Gaudino, G.; Gambarotta, G.; Galimi, F.; Comoglio, P.M. Hepatocyte growth factor (HGF) receptor expression is inducible and is part of the delayed-early response to HGF. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12846–12851. [[CrossRef](#)]
31. Gayyed, M.F.; El-Maqsoud, N.M.R.A.; El-Heeny, A.A.E.H.; Mohammed, M.F. c-MET expression in colorectal adenomas and primary carcinomas with its corresponding metastases. *J. Gastrointest. Oncol.* **2015**, *6*, 618–627. [[CrossRef](#)]
32. Chen, P.-M.; Liu, K.-J.; Hsu, P.-J.; Wei, C.-F.; Bai, C.-H.; Ho, L.-J.; Sytwu, H.-K.; Yen, B.L. Induction of immunomodulatory monocytes by human mesenchymal stem cell-derived hepatocyte growth factor through ERK1/2. *J. Leukoc. Biol.* **2014**, *96*, 295–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Mouggiakakos, D.; Choudhury, A.; Lladser, A.; Kiessling, R.; Johansson, C.C. Regulatory T cells in cancer. *Adv. Cancer Res.* **2010**, *107*, 57–117. [[CrossRef](#)]
34. Kaga, T.; Kawano, H.; Sakaguchi, M.; Nakazawa, T.; Taniyama, Y.; Morishita, R. Hepatocyte growth factor stimulated angiogenesis without inflammation: Differential actions between hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Vascul. Pharmacol.* **2012**, *57*, 3–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zhang, Y.W.; Su, Y.; Volpert, O.V.; Woude, G.F.V. Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12718–12723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Gerritsen, M.E.; Tomlinson, J.E.; Zlot, C.; Ziman, M.; Hwang, S. Using gene expression profiling to identify the molecular basis of the synergistic actions of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 595–610. [[CrossRef](#)]
37. Kopetz, S.; Hoff, P.M.; Morris, J.S.; Wolff, R.A.; Eng, C.; Glover, K.Y.; Adinin, R.; Overman, M.J.; Valero, V.; Wen, S.; et al. Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: Efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 453–459. [[CrossRef](#)]
38. Patel, M.B.; Pothula, S.P.; Xu, Z.; Lee, A.K.; Goldstein, D.; Pirola, R.C.; Apte, M.V.; Wilson, J.S. The role of the hepatocyte growth factor/c-MET pathway in pancreatic stellate cell-endothelial cell interactions: Anti-angiogenic implications in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* **2014**, *35*, 1891–1900. [[CrossRef](#)]
39. Abounader, R.; Lal, B.; Luddy, C.; Koe, G.; Davidson, B.; Rosen, E.M.; Laterra, J. In vivo targeting of SF/HGF and c-met expression via U1snRNA/ribozymes inhibits glioma growth and angiogenesis and promotes apoptosis. *FASEB J.* **2002**, *16*, 108–110. [[CrossRef](#)]
40. Voron, T.; Colussi, O.; Marcheteau, E.; Pernot, S.; Nizard, M.; Pointet, A.-L.; Latreche, S.; Bergaya, S.; Benhamouda, N.; Tanchot, C.; et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8⁺ T cells in tumors. *J. Exp. Med.* **2015**, *212*, 139–148. [[CrossRef](#)]
41. Lapeyre-Prost, A.; Terme, M.; Pernot, S.; Pointet, A.-L.; Voron, T.; Tartour, E.; Taieb, J. Immunomodulatory Activity of VEGF in Cancer. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2017**, *330*, 295–342. [[CrossRef](#)]
42. FYakes, M.; Chen, J.; Tan, J.; Yamaguchi, K.; Shi, Y.; Yu, P.; Qian, F.; Chu, F.; Bentzien, F.; Cancelli, B.; et al. Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 2298–2308. [[CrossRef](#)]
43. Kwilas, A.R.; Ardiani, A.; Donahue, R.N.; Aftab, D.T.; Hodge, J.W. Dual effects of a targeted small-molecule inhibitor (cabozantinib) on immune-mediated killing of tumor cells and immune tumor microenvironment permissiveness when combined with a cancer vaccine. *J. Transl. Med.* **2014**, *12*, 294. [[CrossRef](#)]
44. Apolo, A.B.; Nadal, R.; Tomita, Y.; Davarpanah, N.N.; Cordes, L.M.; Steinberg, S.M.; Cao, L.; Parnes, H.L.; Costello, R.; Merino, M.J.; et al. Cabozantinib in patients with platinum-refractory metastatic urothelial carcinoma: An open-label, single-centre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **2020**, *21*, 1099–1109. [[CrossRef](#)]

45. Choueiri, T.K.; Powles, T.; Burotto, M.; Bournalon, M.T.; Zurawski, B.; Juárez, V.M.O.; Hsieh, J.J.; Basso, U.; Shah, A.Y.; Suarez, C.; et al. 696O_PR Nivolumab + cabozantinib vs sunitinib in first-line treatment for advanced renal cell carcinoma: First results from the randomized phase III CheckMate 9ER trial. *Ann. Oncol.* **2020**, *31*, S1159. [[CrossRef](#)]
46. Powles, T. Recent eUpdate to the ESMO Clinical Practice Guidelines on renal cell carcinoma on cabozantinib and nivolumab for first-line clear cell renal cancer: Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up 1. *Ann. Oncol.* **2021**, *32*, 422–423. [[CrossRef](#)]

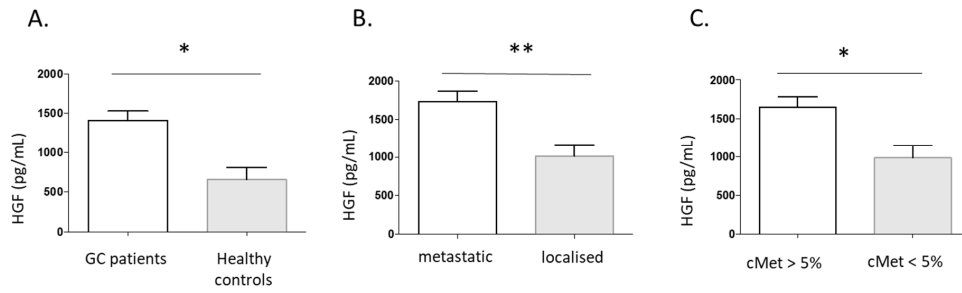


Figure S1. Circulating HGF is correlated to higher c-Met expression by peripheral monocytes in GC patients. HGF plasmatic levels were assessed by ELISA in GC patients of the HEGP cohort and in healthy controls (HC). (A) HGF plasmatic levels in GC patients (n=22; mean \pm SD: 1407 \pm 126pg/mL) and in HC (n=4; mean \pm SD: 658.6 \pm 153pg/mL). * indicates a P value \leq 0.05 according to the Mann Whitney test. (B) HGF plasmatic levels in GC patients with metastatic disease (n=10; mean \pm SD: 1726 \pm 136.3pg/mL) and with localized disease (n=6; mean \pm SD: 1010 \pm 152.9pg/mL). ** indicates a P value \leq 0.01 according to the Mann-Whitney test. (C) HGF plasmatic levels in GC patients with c-Met expression by circulating monocytes >5% (n=14; mean \pm SD: 1651 \pm 133.2pg/mL) and in GC patients with c-Met expression by circulating monocytes <5% (n=10; mean \pm SD: 980.6 \pm 163.6pg/mL) * indicates a P value \leq 0.05 according to the Mann Whitney test.

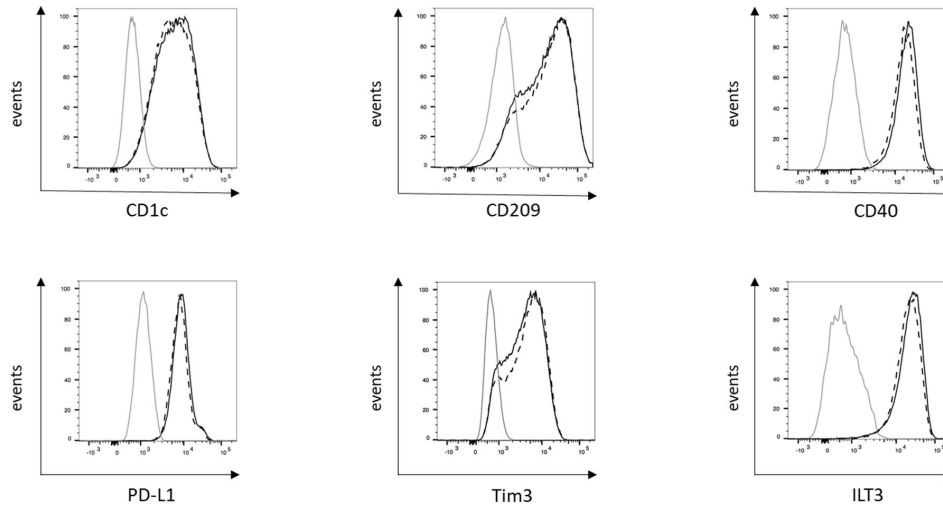


Figure S2. Phenotypic features of DCs generated from monocytes of gastric cancer patients in the presence of HGF. Freshly isolated peripheral monocytes from GC patients were cultured in the presence of GM-CSF and IL-4 with HGF (= HGF condition) or without HGF (= control condition) as described in the material and method section. After 6 days, cell phenotype was assessed by flow cytometry. Expression of CD1c, CD209, CD40, PD-L1, Tim-3 and ILT-3 in DCs generated without (black dashed curve) or with HGF (black full curve). Markers were set on their proper control isotype (light grey curve). A representative staining out of 5 to 11 independent experiments is shown.

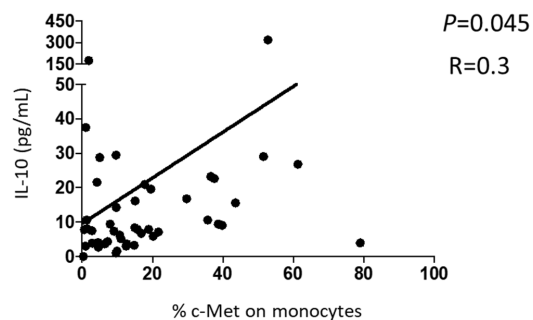


Figure S3. C-met expression on circulating monocytes is correlated to IL-10 plasmatic levels in GC patients. C-Met expression on peripheral monocytes was assessed by immunostaining as described in Fig.1. IL-10 plasmatic levels were assessed by ELISA. The correlation between IL-10 plasmatic levels and percentages of c-Met positive monocytes has been assessed for 42 patients using Spearman correlation test.

	cMet<20% (N=21) N (%)	cMet>20% (N=16) N (%)
Age (years)		
median	68	67
Sex		
male	11 (52)	13 (81)
female	10 (48)	43 (19)
Localisation		
oesogastric junction	5 (24)	6 (37)
gastric body	16 (76)	10 (63)
Linitis		
yes	3 (14)	1 (6)
no	14 (67)	13 (81)
mixed	4 (19)	2 (13)
Disease status		
localised	8 (38)	3 (19)
metastatic	13 (62)	13 (81)

Table S1. Characteristics of the survival population.

DISCUSSION

Expression de cMET sur les monocytes circulants des patients atteints de cancer

Plusieurs auteurs ont montré que les monocytes circulants des sujets sains n'expriment pas le récepteur cMET en situation physiologique^{377 349 378}. Cette expression semble être augmentée *in vivo* dans certaines pathologies inflammatoires auto-immunes. L'équipe de Molnarfi a ainsi montré que cMET était exprimé à la surface des monocytes circulants CD14+/CD16- et CD14+/CD16+ de patients atteints de sclérose en plaque³⁵⁰. Ces données sont ainsi concordantes avec l'augmentation de cMET induite *in vitro* par l'exposition de monocytes à différents stimuli pro-inflammatoires tels que le LPS^{349 378}.

Par de nombreux aspects, le cancer peut être assimilé à un état pro-inflammatoire et on peut donc émettre l'hypothèse que les monocytes circulants de patients atteints de cancer pourraient exprimer le cMET. Cependant, ceci n'a, à notre connaissance, jamais été étudié. Dans ce travail, nous avons montré que les monocytes circulants des patients atteints de CG expriment le récepteur cMET. Etant donné que les pathologies auto-immunes pourraient induire cette expression, nous avons exclu de notre étude les patients atteints de telles pathologies, ainsi que les patients recevant un traitement à visée anti-inflammatoire comme les corticoïdes. L'expression de cMET par les monocytes circulants était retrouvée au sein de 2 cohortes indépendantes de patients atteints de CG (Figure 1. et Figure 4. de l'article) mais aussi chez une cohorte de patients atteints de cancer colorectal.

I. Rôle fonctionnel des monocytes exprimant le cMET

Les monocytes circulants sont classiquement divisés en trois sous populations : les monocytes classiques, les monocytes intermédiaires et les monocytes non classiques. En étudiant l'expression de cMET par les différentes sous populations monocytaires, nous avons observé que celle-ci semblait plus importante chez les monocytes classiques (CD14^{high}/CD16) par rapport aux monocytes non classiques (CD14^{int}/CD14^{high}). Ces résultats sont discordants avec l'étude de Molnarfi réalisée chez les patients atteints de sclérose en plaque, dans laquelle le niveau d'expression de cMET était similaire entre les 2 populations.

Comme décrit précédemment, les monocytes classiques sont recrutés au sein des tissus en cas de lésion et possèdent une demi-vie courte dans la circulation sanguine. En situation de cancer, il a été montré que les monocytes classiques peuvent jouer un rôle dans la progression tumorale via plusieurs mécanismes notamment le recrutement de Tregs. Dans 2 modèles murins, les monocytes classiques étaient ainsi impliqués dans le recrutement intra tumoral de Tregs via l'axe CCR2 et CCR5^{242 379}. Les monocytes classiques sont également capables de produire de l'IL-10³⁸⁰ atténuant la réponse immunitaire anti-tumorale. Les monocytes classiques pourraient donc être impliqués de manière préférentielle dans l'effet immunomodulateur induit par l'HGF en situation de cancer.

Au-delà de l'induction de Tregs observée dans ce travail, d'autres différences fonctionnelles pourraient être observées chez les monocytes cMET+ par rapport aux monocytes cMET-. Etant donné l'implication de la voie HGF/MET dans l'angiogenèse, on peut notamment émettre l'hypothèse que l'expression de cMET par les monocytes pourrait avoir un impact sur leur rôle pro-angiogénique. Dans une étude réalisée sur des échantillons tumoraux humains de

carcinome hépatocellulaire, Zhao et al. ont montré que des monocytes exprimant le cMET pouvaient être détectés dans le stroma péri-tumoral et qu'une forte densité de monocytes cMET+ au front tumoral était associée de manière indépendante à l'infiltration vasculaire de la tumeur³⁵¹. Dans cette même étude, les monocytes cMET+ étaient capables de produire de grandes quantités de MMP9, et présentaient des capacités de migration augmentées. Il serait ainsi intéressant de poursuivre la caractérisation des monocytes exprimant le cMET en situation de cancer, par exemple par des analyses de single cell RNA-Seq afin de mieux caractériser cette population.

II. Mécanismes d'expression du cMET sur les monocytes circulants

Dans notre travail, nous avons mis en évidence que l'expression de cMET par les monocytes était plus importante chez les patients ayant une tumeur en place (métastatique ou localisée) que chez les patients ayant été opérés et n'ayant plus de maladie décelable cliniquement (Figure 2 de l'article). De plus, chez un patient, nous avons comparé l'expression de cMET par les monocytes avant et après la résection de la tumeur et nous avons observé que celle-ci diminuait fortement après la chirurgie (Figure 2 de l'article). Cela pourrait suggérer l'implication d'un ou de plusieurs facteurs produits par la tumeur ou le micro-environnement tumoral dans l'induction et/ou le maintien de l'expression monocyttaire de cMET. *In vitro*, de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1alpha, l'IL-6 et le TNF alpha, ainsi que des facteurs de croissance comme le TGFbeta ou l'EGF sont capables d'induire l'expression de cMET par des lignées cellulaires de différents types tumoraux³⁸¹. Similairement, différents

stimuli inflammatoires pouvant entraîner l'expression de cMET par les monocytes ont été décrits. Dans l'article de Beilman et al., une expression de cMET par les monocytes circulants de volontaires sains était observée après exposition à la phytohemagglutinine (PHA, agent de stimulation lymphocytaire) et/ou au LPS. Des résultats similaires étaient obtenus dans l'article publié par Chen et al. en stimulant des lignées monocytaires (THP-1) par du LPS ou des combinaisons de TNFalpha associé à de l'IL-6 ou à de l'IFNg. Puisque ces différents facteurs peuvent être produits par la cellule tumorale ou par le micro-environnement, on peut émettre l'hypothèse qu'ils pourraient être impliqués dans l'expression de cMET observée *in vivo* sur les monocytes de patients.

L'expression de cMET par les monocytes pourrait également être induite par un facteur produit de manière autocrine. En effet, dans une étude publiée par Zhao et al, les auteurs ont cultivés des monocytes circulants de volontaires sains en présence de surnageant de culture de différentes lignées tumorales hépatiques humaines (Tumoral Supernatant TSN), ce qui induisait une expression de cMET par les monocytes. Ces TSN isolés présentaient des taux peu élevés de cytokines, mais induisaient rapidement la production d'IL-6, d'IL-10, d'IL-12p et de TNFalpha par les monocytes. Les auteurs ont ensuite montré que la production TNFalpha par les monocytes exposés aux TSN était capable d'induire l'expression de cMet de manière autocrine, et que cette induction semblait dépendante de la voie NFkB³⁵¹.

Par ailleurs, il a été montré que l'HGF était capable d'induire une augmentation de l'expression de cMET de manière autocrine et paracrine par des cellules épithéliales et des lignées tumorales *in vitro*³⁸². Dans notre travail, nous avons observé que les patients dont les monocytes exprimaient le cMET (>5%) ont un taux d'HGF circulant supérieur aux patients

n'exprimant pas le cMET sur leur monocytes (Figure Supplémentaire S1 de l'article), pouvant ainsi suggérer que l'HGF pourrait être impliqué dans l'expression de cMET par les monocytes. Cependant, nous n'avons pas observé de différence d'expression de cMET par les CD différenciées à partir de monocytes de patients en condition standard ou avec HGF.

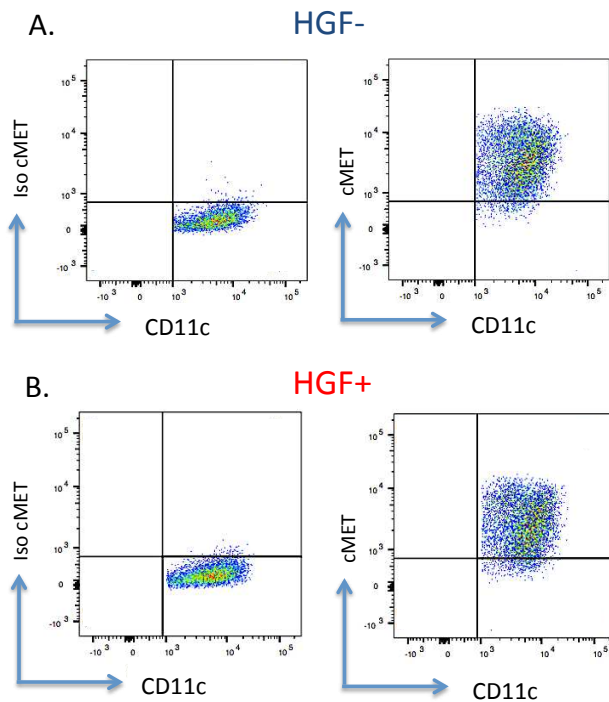


Figure 16. Expression de cMET par les CD.

L'expression de cMET par les CD issues de monocytes périphériques de patients atteints de cancer gastrique différenciées en condition standard (A.) ou en présence d'HGF (B.) a été évaluée par immunomarquage et cytométrie en flux. Expression du cMET par les cellules CD11c+/HLA-DR+.

Par ailleurs, dans une étude publiée par Jiang et al. l'expression de cMET par des monocytes circulants issus de sujets sains adultes diminuait en présence d'HGF mais était augmentée en présence d'IL-10 ou d'IFN γ ³⁸³. Dans notre étude, nous avons observé que l'expression de

cMET par les monocytes circulants était positivement corrélée au taux d'IL-10 circulant chez les patients atteints de cancer gastrique suggérant que celle-ci pourrait également être impliquée dans l'expression de cMET (Figure supplémentaire S3 de l'article).

III. Rôle pronostique de l'expression de cMET par les monocytes

Comme décrit précédemment, le rôle pronostique péjoratif de l'expression de cMET par les cellules tumorales a été largement démontré dans le cancer gastrique. Dans ce travail, nous avons montré que l'expression de cMET par les monocytes circulants est plus élevée chez les patients ayant une tumeur peu différenciée par rapport à ceux ayant une tumeur moyennement ou bien différenciée, et plus élevée chez les patients métastatiques par rapport aux patients ayant une tumeur localisée ou localement avancée (Figure 2 C. et 2 D. de l'article). L'expression de cMET par les monocytes semble donc être associée à un phénotype tumoral agressif. En revanche il n'y avait pas d'association entre l'expression de cMET et le caractère linitique ou non linitique (Figure 2 B. de l'article), la localisation tumorale (Figure 2 C. de l'article), la surexpression de HER2 ou l'association avec une infection par *Helicobacter pylori* (Figure 17).

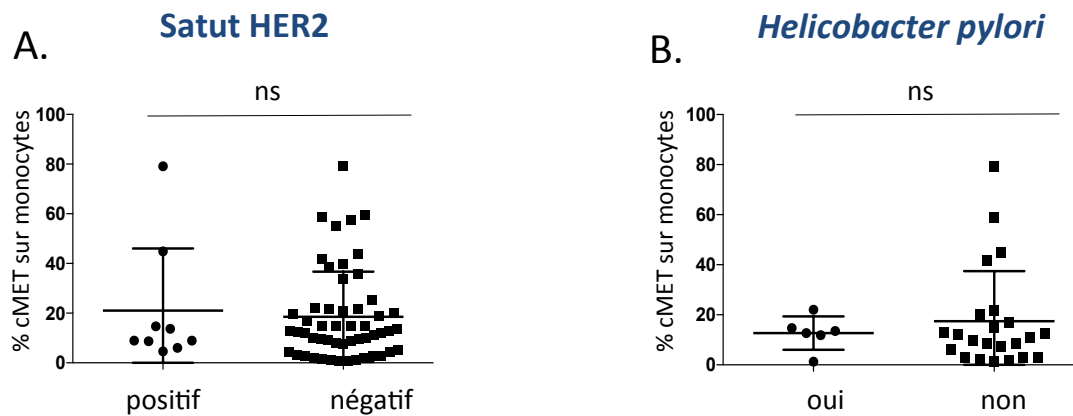


Figure 17. Expression de cMET par les monocytes circulants des patients atteints de cancer gastrique en fonction du statut HER2 (A) et de la présence d’une infection à *Helicobacter pylori* (B).

Dans un modèle univarié, nous avons observé que les patients ayant une expression élevée de cMET par les monocytes circulants (supérieure à la médiane) avaient une moins bonne survie globale que les patients ayant une expression faible ou nulle. (Figure 2. E de l’article). Etant donné le faible nombre de patients, nous n’avons pas pu réaliser d’analyse multivariée et ces résultats sont donc à interpréter avec prudence.

IV. Corrélation avec l’expression du cMET par les monocytes intra tumoraux

Dans l’étude de Zhao et al. précédemment décrite, la densité d’infiltration du stroma péri-tumoral en monocytes exprimant le cMET chez des patients atteints de CHC était associée de façon indépendante à une moins bonne survie globale et à des taux de récurrence plus importants après chirurgie³⁵¹. Dans cette étude, l’expression de cMET par les monocytes circulants des patients atteints de CHC n’était pas décrite.

De manière plus globale, la corrélation de l'impact fonctionnel et pronostic entre les cellules immunitaires circulantes et intra-tumorales reste une question largement ouverte. Dans le contexte du cancer, l'étude des cellules immunitaires circulantes possède plusieurs avantages : elle représente un accès peu invasif aux cellules du patient, permettant une évaluation répétée et dynamique, elle permet des techniques d'analyses fines telles que la cytométrie en flux multiparamétrique, enfin elle évite le biais d'échantillonnage lié à l'hétérogénéité tumorale. Cependant elle n'est pas forcément le reflet des phénomènes intra tumoraux puisqu'elle ne prend pas en compte l'adressage dans la tumeur lié aux chimiokines et à leurs récepteurs, les différences entre les zones tumorales (zone centrale/front d'invasion).

Impact de l'HGF sur l'induction de Tregs in vitro

I. Impact de l'HGF sur les monocytes *in vitro*

L'impact immunomodulateur de l'HGF sur les monocytes est très peu décrit en situation physiologique et n'a jamais été étudié dans le contexte du cancer. Après stimulation *in vitro* par l'HGF seul, les monocytes de volontaires sains sont capables de se différencier en cellules avec une morphologie proche de celles de CD, de produire de fortes quantités d'IL-10 et de modifier le profil de sécrétion cytokinique de LT activés vers un profil Th2³⁸⁴. Dans une étude réalisée par Molnarfi et al. les monocytes circulants de volontaires sains étaient différenciés *in vitro* en CD par culture en présence de GM-CSF et IL-4 pendant 6 jours. L'ajout initial d'HGF dans le milieu de culture, induisait une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation HLA-DR, CD80, CD83 et CD86 mais pas du CD40, ni des molécules de co-stimulation

inhibitrices PD-L1 et IL-T3³⁸⁵. Ces résultats sont concordants avec ceux de notre travail, à l'exception du CD83 dont le niveau d'expression était similaire entre les CD différenciées avec ou sans HGF (Figure 3 A, 3B, 3C de l'article). De manière similaire, nous n'avons pas observé de différence d'expression des molécules de co-stimulation inhibitrices (PD-L1, Tim3, ILT3) entre les deux conditions de culture (Figure supplémentaire S2 de l'article). Dans notre travail, les CD différenciées en présence d'HGF avaient une production augmentée d'IL-10 (Figure 3.E de l'article) venant encore renforcer l'hypothèse du rôle immunosuppresseur de l'HGF sur la différenciation des CD. *In vitro*, la stimulation des CD par le LPS induit leur maturation terminale caractérisée notamment en condition standard par une augmentation des molécules de co-stimulation. Dans notre travail, les CD différenciées en présence d'HGF ne présentaient pas d'augmentation de ces molécules de costimulation après stimulation par le LPS contrairement à la condition témoin sans HGF (Figure 3.D). De manière intéressante, dans l'étude de Molnarfi, lorsque les CD différenciées en condition standard étaient exposées tardivement à l'HGF (24 heures avant la stimulation par le LPS), il n'était pas observé de blocage de la maturation des CD.

II. Impact des CD différenciées en présence d'HGF sur les Tregs *in vitro*

Dans notre travail, lorsque les CD différenciées à partir de monocytes de patients atteints de CG en présence d'HGF étaient co-cultivées *in vitro* avec des LT CD4+ allogéniques, nous avons observé une augmentation des Tregs ainsi qu'une augmentation de leur prolifération (Figures 4.A et 4.B de l'article). Au vu de nos résultats précédents, plusieurs hypothèses peuvent donc être évoquées pour expliquer ces observations : la forte production d'interleukine 10 par les

CD induite par l'HGF (Figure 3.E de l'article) et la diminution d'expression de molécules de co-stimulation activatrices à leur surface (Figure 3. de l'article). Dans notre travail, la production de TGFbeta par les CD n'était pas impactée par l'HGF (Figure 3.E de l'article). Par ailleurs, nous n'avons pas non plus observé d'augmentation d'expression de molécules de co-stimulation inhibitrices telles que PD-L1 (Figure supplémentaire S2 de l'article).

Dans un modèle murin d'encéphalite auto-immune, l'administration systémique d'un traitement par HGF réduisait la sévérité des lésions observées dans le système nerveux central (SNC) des souris. Les auteurs ont ensuite comparé le phénotype des CD infiltrant le SNC des souris traitées par HGF aux souris non traitées. En cohérence avec nos résultats, les CD des souris traitées par HGF présentaient un phénotype « tolérogène » notamment marqué par une augmentation de l'expression de GILZ, dont l'implication dans l'induction de Tregs est largement démontré. L'inhibition de GILZ induisait une suppression de l'effet neuro-protecteur de l'HGF. De plus, dans des expériences réalisées *in vitro*, les CD isolées à partir de rates de souris traitées par HGF étaient capable d'induire des Tregs alors que cet effet n'était pas observé chez des souris transgéniques GILZ KO ³⁶². Ces résultats suggèrent donc une forte implication de GILZ dans l'induction des Tregs par les CD induite par l'HGF. Cependant, lors d'expériences préliminaires, nous n'avons pas observé d'augmentation du récepteur GILZ sur les CD différenciées en présence d'HGF.

III. Reproductibilité *in vivo*

Une grande partie des connaissances accumulées ces dernières années à propos de la biologie des CD humaines a été permise par des expériences réalisées *in vitro* sur des CD générées à

partir de monocytes (stimulés par du GM-CSF et de l'IL-4). Ces CD différenciées *in vitro* à partir des monocytes présentent des similarités avec les CD tissulaires ou circulantes mais ne sont cependant pas strictement équivalentes³⁸⁶. Nos résultats étant obtenus sur des expériences réalisées sur des CD générées *in vitro*, la validité de ces observations sur des CD *in vivo* reste un élément à démontrer. Notamment il serait intéressant d'étudier le phénotype et la fonctionnalité des CD circulantes ou intra-tumorales des patients selon le taux d'HGF intra tumoral ou le taux d'HGF circulant.

Impact de l'HGF sur l'accumulation de Tregs in vivo

I. Mécanismes de l'accumulation de Tregs induite par l'axe HGF/MET dans le CG

De nombreux mécanismes ont été décrits induisant l'accumulation de Tregs dans le contexte du CG.

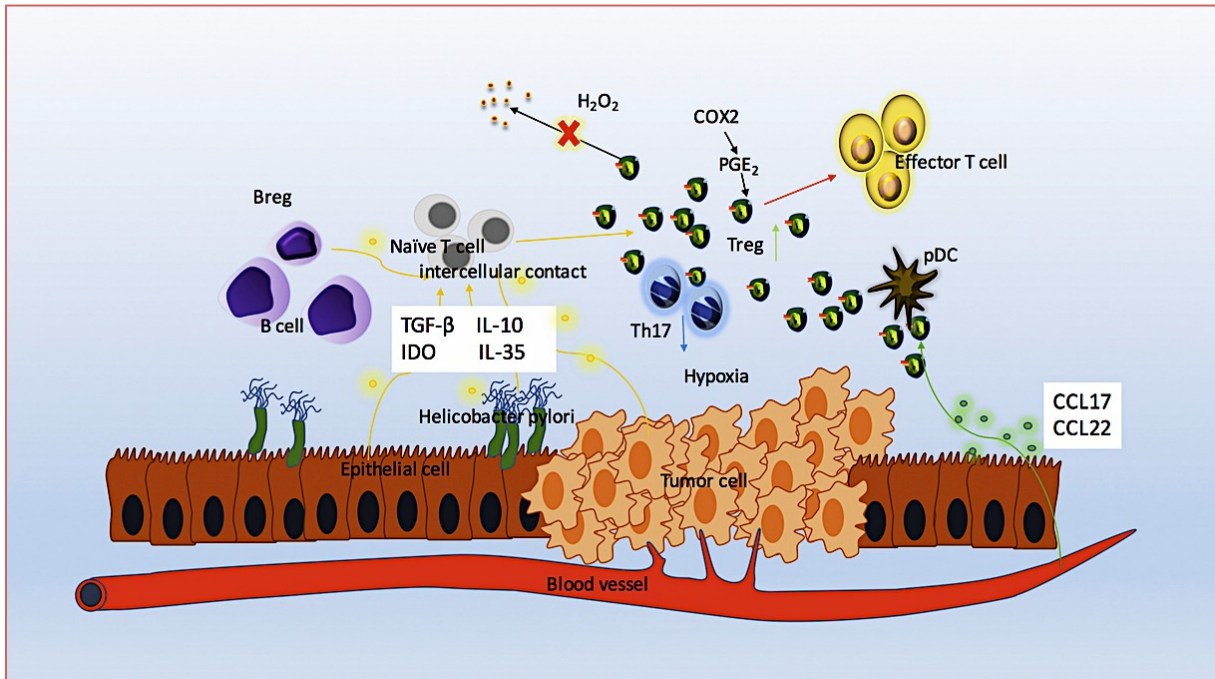


Figure 18. Différents mécanismes d'accumulation des Tregs mis en évidence dans le cancer gastrique.

Deux grands mécanismes d'accumulation des Tregs dans le CG ont été mis en évidence : l'augmentation de leur recrutement au sein de la tumeur, et l'induction de leur différenciation. Le recrutement des Tregs peut ainsi être favorisé par : les CD intra tumorales ayant un phénotype tolérogène et la sécrétion de certaines chimiokines comme CCL17 et CCL22. La différenciation des Tregs peut être induite par la sécrétion de cytokines immunosuppressives augmentées en condition d'hypoxie ou par l'infection à *Helicobacter pylori*. Les Tregs intra tumoraux possèdent également des capacités de résistance à l'apoptose augmentées.

D'après Liu et al. Recent advances in the study of regulatory T cells in gastric cancer 2019

Dans notre étude, les patients atteints de CG avancé non opérable recevant un anticorps anti-HGF associé à de la chimiothérapie présentaient une diminution des Tregs circulants. Cet effet n'était pas observé chez les patients recevant de la chimiothérapie seule ou de la chimiothérapie associée à un anticorps anti EGFR (Figure 4 de l'article), suggérant donc un rôle de la voie HGF/MET dans l'accumulation de Tregs chez les patients atteints de cancer. Comme vu précédemment, nous avons montré que l'HGF était capable de moduler la différenciation des CD vers un phénotype tolérogène capable d'induire des Tregs et d'augmenter leur prolifération *in vitro*. On peut donc émettre l'hypothèse que l'effet de l'HGF sur les Tregs observé *in vivo* pourrait être lié, au moins en partie, à un impact sur la différenciation des monocytes en CD des patients, résultant ainsi en l'accumulation de CD tolérogènes. Cet impact pourrait s'exercer à deux niveaux : i) au sein de la tumeur : lors de leur arrivée dans le tissu lésé, les monocytes, en présence d'HGF produit par la tumeur, se différencient en CD induisant l'accumulation de Tregs. ii) au sein des organes lymphoïdes secondaires : les monocytes migrent vers les ganglions où ils se différencient en CD immatures sous l'effet de l'HGF. Les CD vont alors induire l'accumulation de Tregs qui vont pouvoir ensuite circuler dans le sang périphérique et éventuellement migrer vers le site tumoral.

D'autres mécanismes sous tendant l'accumulation de Tregs dans le CG peuvent cependant être évoqués d'après les données de la littérature

- *Impact de la chimiothérapie* : Dans deux études menées sur des CG localisés, l'infiltration tumorale en Tregs diminuait après un traitement par chimiothérapie néo-adjuvante (FOLFOX), et cette diminution était associée à un pronostic favorable^{387 389}. Dans notre étude, nous

n'avons pas observé de diminution des Tregs circulants chez les patients traités par chimiothérapie seule.

- *Induction directe par les monocytes* : A leur arrivée au sein de la tumeur, la majorité des monocytes issus de la circulation se différencient en CD, en macrophages ou encore en MDSC. Cependant une partie minoritaire d'entre eux peuvent persister dans le MET. Ainsi, sous l'effet de l'HGF, les monocytes intra tumoraux pourraient adopter un phénotype régulateur, notamment capable de produire de l'IL-10³⁶⁰, et ainsi être impliqués de manière directe dans l'induction de Tregs. Dans une étude réalisée dans un modèle murin de CHC, l'activation de la voie HGF/MET induite par l'inactivation de LECT-2 (protéine ayant un rôle suppresseur de tumeur, capable de se lier au cMET de façon compétitive à l'HGF pour antagoniser l'activation de cette voie¹) était associée à un infiltrat intra-tumoral en monocytes ayant un phénotype immature, caractérisé notamment par une diminution de l'expression du CD86 et du CMH-II, et des propriétés immunosuppressives augmentées, notamment une inhibition de la prolifération des LT naïfs². Cependant l'impact de ces monocytes intra-tumoraux « immunosuppresseurs » sur les Tregs n'était pas décrit dans cette étude.

- *Impact direct de l'HGF sur les Tregs* : En accord avec les données de la littérature, nous avons observé que les lymphocytes circulants TCD4+ ainsi que les Tregs circulants des patients n'expriment pas le cMet, ce qui semble a priori réfuter l'hypothèse d'un impact direct de l'HGF sur la conversion de LT CD4+ en Tregs ou sur la prolifération de Tregs existants.

- *Liens entre angiogenèse et Tregs* : récemment, il a été montré que l'angiogenèse joue un rôle immunomodulateur en situation de cancer, notamment via un impact sur les Tregs. Notre équipe a ainsi montré chez des patients atteints de cancer colorectal que le traitement par bevacizumab (AC anti VEGF-A) était associé à une diminution des Tregs circulants. *In vitro*, le VEGF-A induit une prolifération des Tregs de souris porteuses de tumeurs dans un modèle de CCR. Par ailleurs, le blocage du VEGFR-2, exprimé à la surface des Tregs, abroge l'effet prolifératif du VEGF-A, alors que cet effet n'était pas observé avec le blocage du VEGFR-1. Le VEGF-A semble donc être capable d'induire la prolifération des Tregs en situation de cancer, et ce via une activation du VEGFR2³³⁷. D'autre part, le VEGF-A pourrait également induire l'accumulation de Tregs via une augmentation des MDSC ou un blocage de maturation des CD.

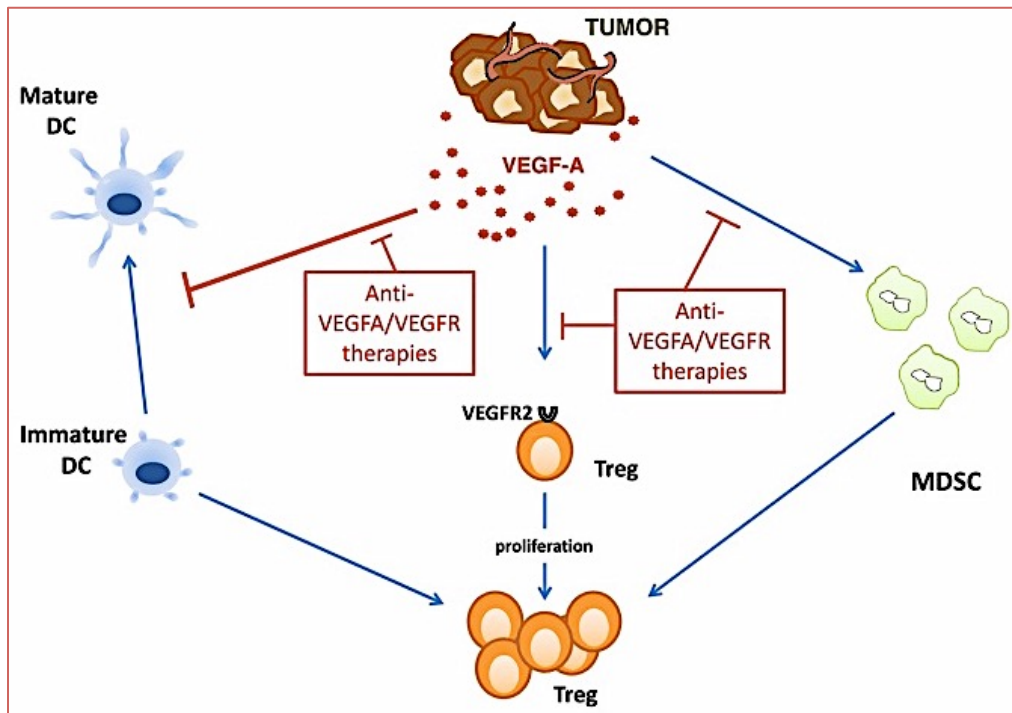


Figure 19. Impacts immunosuppresseurs du VEGF-A en situation tumorale

Le VEGF-A produit par les cellules tumorales peut induire un blocage de maturation des cellules dendritiques (DC) et l'expansion des MDSC. Les DC immatures ainsi que les MDSC favorisent l'accumulation de Tregs. Le VEGFA peut également induire directement la prolifération des Tregs exprimant le VEGFR2.

D'après Terme et al. Oncoimmunology (2013).

Ainsi, on peut émettre l'hypothèse la modulation de l'angiogenèse (notamment de l'axe VEGFA/VEGFR) par l'HGF soit en partie impliquée que la diminution des Tregs circulants observée chez les patients atteints de cancer gastrique traités par un AC anti-HGF.

II. Interprétation des résultats de l'essai MEGA

La diminution des Tregs circulants que nous avons observée chez les patients traités par l'association chimiothérapie + AC anti-HGF n'était pas associée à une meilleure efficacité de

cette combinaison thérapeutique. En effet, dans l'essai de phase II MEGA, il n'y avait pas de différence significative de taux de survie sans progression à 4 mois (critère de jugement principal), de survie sans progression, de survie globale ni de taux de réponse tumorale entre les groupes de patients recevant la chimiothérapie seule, l'association chimiothérapie + AC anti-EGFR ou l'association chimiothérapie + AC anti-HGF.

Plusieurs hypothèses peuvent être soulevées pour expliquer les résultats négatifs de l'essai MEGA :

- *La sélection des patients.* Dans l'essai MEGA, 60% des patients inclus présentaient une hyperexpression intra tumorale de cMET et seulement 3% des patients avaient une amplification de *MET* ce qui concorde avec les données de la littérature. Hors, comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'hyperexpression de cMET ne semble pas être un biomarqueur prédictif de la réponse aux thérapies ciblées anti-MET. A l'inverse, les amplifications de *MET* pourraient traduire une réelle addiction oncogénique de la tumeur pour cette voie de signalisation et constituer un meilleur biomarqueur de sélection des patients. Les analyses de sous-groupes n'ayant pas été prévues a priori, l'efficacité de l'association chimiothérapie + AC anti-HGF n'a pas été étudiée spécifiquement chez les patients ayant une amplification de *MET*. D'autre part cette population ne représentait que 2 patients du groupe recevant l'AC anti-HGF, ce qui aurait rendu les résultats de cette analyse peu interprétable.
- *L'activation de voies de signalisation alternatives* induite par l'AC anti-HGF, qui n'a pas été étudiée dans cet essai.

- *Le rôle pronostique de l'infiltration en Tregs dans le CG.* Dans la littérature, l'accumulation de Tregs intra-tumoraux et circulants est associée à un moins bon pronostic dans un grand nombre de cancers comme les cancers de l'ovaire, les cancers du sein, les cancers du rein, les cancers pulmonaires³⁹¹. Dans le CG, l'impact pronostic des Tregs intra-tumoraux et circulants a également été largement étudié, avec des résultats parfois contradictoires. Une élévation des Tregs circulants et tissulaires est observée chez les patients atteints de CG par rapport aux sujets sains. Une infiltration tissulaire en Tregs est également retrouvée dans plusieurs lésions gastriques pré-cancéreuses telles que les gastrites liées à *Helicobacter pylori*, ou les ulcères peptiques chroniques^{392 393}.

D'un point de vue pronostique, l'infiltration tumorale en Tregs semble être associée à une plus forte probabilité d'envahissement loco-régional, notamment à la présence de métastases dans les ganglions drainants³⁹⁴. Dans plusieurs études portant sur le pronostic des cancers gastriques localisés après résection chirurgicale, la probabilité de récurrence était corrélée à : une forte infiltration tumorale en Tregs, un ratio Tregs/T4 intra tumoraux élevé, un ratio Treg/T8 intra tumoraux élevé³⁹⁵. Cependant, dans d'autres études, l'infiltration en Tregs était associée à un meilleur pronostic. Ainsi dans une étude portant sur 33 patients ayant été opérés d'un cancer gastrique, l'infiltration en Tregs était positivement corrélée au pronostic, alors que l'infiltration en MDSC était associée à une moins bonne survie. Dans une autre étude l'association de Tregs et de macrophages CD68+ intra tumoraux était un facteur indépendamment lié à une amélioration de la survie. Enfin pour d'autres auteurs la présence de LTCD8+ et de Tregs était également associée à un pronostic favorable. Dans cette dernière étude, les auteurs suggéraient qu'au delà de la quantité de l'infiltrat, la répartition spatiale de

ces deux types cellulaires au sein de la tumeur était fortement liée à ce rôle pronostique.³⁹⁵

Ces résultats discordants suggèrent que le degré d'infiltration tumorale en Treg pourrait ne pas représenter un facteur pronostique en soi, et que d'autres éléments pourraient être impliqués tels que la présence d'autres types cellulaires et leur co-localisation au sein de la tumeur, mais aussi le type histologique d'adénocarcinome gastrique, le caractère induit par un pathogène etc. Plus récemment, l'indentification plus précise de différentes sous populations de Tregs pourrait également expliquer ces discordances de valeur pronostique observées entre les études^{396 397}.

Ainsi, dans l'essai MEGA, la baisse des Tregs circulants pourrait ne pas être associée à une amélioration de la réponse immunitaire anti-tumorale.

- *Rôle immunomodulateur insuffisant de l'AC anti-HGF.* Enfin, on peut émettre l'hypothèse que la baisse des Tregs circulants observés chez les patients recevant un AC anti-HGF est bien associée à une augmentation de la réponse immunitaire anti-tumorale, mais que celle-ci est insuffisante pour entraîner une amélioration des paramètres cliniques. Des combinaisons avec d'autres traitements boostant la réponse immunitaire anti-tumorale pourraient alors être envisagées.

Rôle immunomodulateur de l'axe HGF/MET en situation tumorale : impact thérapeutique

Comme décrit en introduction, de plus en plus d'auteurs se sont intéressés au cours des dernières années à comprendre l'impact immunomodulateur de la voie HGF/MET en situation de cancer. En montrant que l'HGF peut impacter la différenciation des CD et induire

l'accumulation de Tregs, nos travaux ont ainsi permis de décrire un rôle supplémentaire de l'activation de cette voie sur la réponse immunitaire en contexte tumoral.

Plus récemment, l'arrivée de l'immunothérapie et notamment des inhibiteurs de checkpoints immunitaires (ICI) a permis d'améliorer les connaissances sur les interactions entre axe HGF/MET et système immunitaire, notamment en montrant que la voie HGF/MET pouvait être impliquée dans la résistance à ces nouveaux traitements.

I. Rôle de la voie HGF/MET dans la résistance à l'immunothérapie

Plusieurs études ont montré l'association entre l'expression de PD-L1 et l'activation de la voie HGF/MET, notamment dans le CBNPC³⁹⁸. Par ailleurs, dans le CBNPC, il a été montré que les patients porteurs d'une altération génique de MET ont une moins bonne réponse aux ICI³⁹⁹⁴⁰⁰. Dans une étude portant sur 29 patients atteints de mélanome métastatique traités par anti PD-1 (nivolumab ou pembrolizumab), le taux d'HGF plasmatique des patients était négativement corrélé à la réponse au traitement⁴⁰¹.

II. Combinaisons antiHGF/MET et immunothérapie

A. ITK + immunothérapie

Il existe donc un rationnel fort pour associer le traitement par ICI à des thérapies ciblées anti-HGF/MET. Récemment l'association du cabozantinib (ciblant cMET, VEGFR-2, c-RET, c-KIT, FLT3 et TIE2) au nivolumab a montré une supériorité dans un essai de phase III par rapport au traitement de référence (sunitinib) en première ligne dans le cancer du rein avancé, et constitue depuis le nouveau standard thérapeutique⁴⁰². Dans un essai de phase Ib, la

combinaison de cabozantinib et nivolumab administrée chez des patients atteints de CHC localement avancés était associée à une réponse tumorale permettant une résection chirurgicale chez 80% des patients. Une réponse histologique majeure sur la pièce opératoire était observée chez 42% des patients ⁴⁰³. Si ces résultats sont confirmés par des études de plus large ampleur, cette combinaison pourrait devenir un traitement de référence dans cette indication. L'association cabozantinib + nivolumab est actuellement en cours d'évaluation dans de nombreux cancers en situation avancée/métastatique tels que le CHC (NCT05039736), le CCR (NCT04963283), le mélanome (NCT05200143) ou encore le cancer de la prostate (NCT05502315).

Etant donné que le Cabozantinib est un ITK multi-cibles, le rôle spécifique de l'inhibition de la voie HGF/MET dans les résultats cliniques observés est difficile à déterminer. D'autres essais sont en cours pour évaluer l'efficacité du savolitinib, ITK spécifique anti-MET associé au durvalumab (AC anti-PD-L1): dans le cancer papillaire du rein avec altération génique de *MET* (NCT05043090), dans le CBNPC EGFR non muté (NCT05374603) et dans le CG avancé avec amplification de *MET* (NCT05620628).

L'efficacité de ces résultats sera à mettre en balance avec les risques de toxicité notamment immunitaire. Ainsi l'essai CheckMate 370 qui évaluait l'association du crizotinib au nivolumab dans les cancers pulmonaires avancés ALK+ a dû être arrêté prématurément du fait de toxicités hépatiques sévères ⁴⁰⁴. Par ailleurs étant donné l'impact sur l'angiogenèse de la voie HGF/MET et de l'immunothérapie, des effets secondaires importants liés à l'inhibition de cette voie pourraient également être observés.

B. Autres stratégies d'immunothérapies spécifiques

Au-delà des combinaisons d'ITK + immunothérapie, de nouvelles formes d'immunothérapies ciblant également la voie HGF/MET ont été développées au cours de ces dernières années.

Plusieurs AC bi-spécifiques ciblant à la fois cMET et PD-1, ont ainsi montré une efficacité anti-tumorale sur différents cancers in vitro et dans des modèles précliniques, dont le CG^{405 406}. A notre connaissance, la tolérance et l'efficacité de ces anticorps bi-spécifiques n'a pas encore été évaluée chez l'Homme.

Une autre stratégie est le développement de chimeric antigen receptor (CAR) T-cell spécifiques de cMET. En 2023, une seule étude clinique précoce étudiant l'efficacité de CAR T cells spécifiques de cMET a été publiée. Dans cet essai, 4 patientes atteintes de cancer du sein avec métastases ganglionnaires (où une expression de cMET est retrouvée dans environ 50% des cas), ont été traitées par des CAR T-cells ayant été transfectées par de l'ARNm de cMET. Une seule injection a été administrée directement dans la tumeur. Les patientes étaient ensuite opérées. Les CAR-T cells spécifiques de cMET étaient retrouvées dans le sang périphérique et en intra tumoral chez 2 des 4 patientes et étaient associées à des signes de nécrose tumorale et de réponse inflammatoire au site d'injection.⁴⁰⁸. Là encore, la toxicité de ces traitements pourrait représenter un facteur limitant.

CONCLUSION

La meilleure compréhension des mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire a constitué une des avancées majeures pour la prise en charge thérapeutique en oncologie. De nombreux phénomènes restent cependant à élucider. Parmi eux, l'induction de cellules immunosuppressives tels que les Tregs semble jouer un rôle majeur dans l'échappement immunitaire et la progression tumorale. Dans ce travail, nous avons mis en évidence un nouveau mécanisme permettant l'accumulation de Tregs chez des patients atteints de cancer gastrique, lié à l'activation de la voie HGF/MET. Nous avons montré que les monocytes circulants des patients atteints de cette pathologie expriment le récepteur cMET et que cette expression était liée à un phénotype tumoral agressif et à une moins bonne survie. *In vitro*, l'HGF induisait un blocage de la maturation des CD différenciées à partir de monocytes de patients, et un phénotype tolérogène. Les CD différenciées en présence d'HGF présentent des propriétés immunosuppressives et sont capables d'induire *in vitro* l'accumulation et la prolifération de Tregs. Enfin nous avons montré qu'un blocage de la voie HGF/MET par un anticorps anti-HGF (associé à la chimiothérapie) induisait une diminution des Tregs circulants chez les patients atteints de cancer gastrique. Ces travaux apportent donc des arguments suggérant l'intérêt de l'utilisation des thérapies ciblant HGF/MET existantes pour leurs propriétés immunomodulatrices, en association à d'autres formes d'immunothérapie et pour le développement de thérapies nouvelles tels que les anticorps bi-spécifiques.

ANNEXE

Revue publiée dans Frontiers in Immunology (2021)

Titre original : Direct and indirect modulation of T Cells by VEGF-A counteracted by anti-angiogenic treatment.

Auteurs : Morgane Bourhis, Juliette Palle, Isabelle Galy-Fauroux, Magali Terme



Direct and Indirect Modulation of T Cells by VEGF-A Counteracted by Anti-Angiogenic Treatment

Morgane Bourhis¹, Juliette Palle^{1,2}, Isabelle Galy-Fauroux¹ and Magali Terme^{1*}

¹ Université de Paris, PARCC, INSERM, Paris, France, ² Department of GI Oncology, AP-HP, Hôpital Européen Georges-Pompidou, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Loredana Albonici,
University of Rome Tor Vergata, Italy

Reviewed by:

Brian Rini,
Vanderbilt University, United States
Rolf A. Brekken,
University of Texas Southwestern
Medical Center, United States

*Correspondence:

Magali Terme
magali.term@inserm.fr

Specialty section:

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

Received: 13 October 2020

Accepted: 04 March 2021

Published: 29 March 2021

Citation:

Bourhis M, Palle J, Galy-Fauroux I and
Terme M (2021) Direct and Indirect
Modulation of T Cells
by VEGF-A Counteracted
by Anti-Angiogenic Treatment.
Front. Immunol. 12:616837.
doi: 10.3389/fimmu.2021.616837

Vascular endothelial growth factor A is known to play a central role in tumor angiogenesis. Several studies showed that VEGF-A is also an immunosuppressive factor. In tumor-bearing hosts, VEGF-A can modulate immune cells (DC, MDSC, TAM) to induce the accumulation of regulatory T-cells while simultaneously inhibiting T-cell functions. Furthermore, VEGFR-2 expression on activated T-cells and FoxP3^{high} regulatory T-cells also allow a direct effect of VEGF-A. Anti-angiogenic agents targeting VEGF-A/VEGFR contribute to limit tumor-induced immunosuppression. Based on interesting preclinical studies, many clinical trials have been conducted to investigate the efficacy of anti-VEGF-A/VEGFR treatments combined with immune checkpoint blockade leading to the improvement of these associations in different tumor locations. In this review, we focus on the impact of VEGF-A on immune cells especially regulatory and effector T-cells and different therapeutic strategies to restore an antitumor immunity.

Keywords: VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A), effector T-cells, regulatory T (Treg) cells, tumor, anti-angiogenic therapy, immunosuppression, immune check point inhibitor (ICI)

INTRODUCTION

Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) is considered to be a critical regulator of angiogenesis, which is the formation of new blood vessels from pre-existing ones, both in physiological and pathological states such as tumor angiogenesis (1). VEGF-A production is regulated by transcriptional factors such as HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) during a hypoxic stress or by oncogenes (2). Its pro-angiogenic activities are mediated by the activation of VEGF receptors (VEGFR-1, VEGFR-2) which can be expressed on endothelial cells, tumor cells and some immune cells (1). However, VEGF-A has a dual function in supporting tumor progression: first, by inducing vessel formation and second, by acting as an immunosuppressive factor (3–5). The immune system has emerged as a pivotal actor in controlling tumor growth. Cytolytic CD8⁺ T lymphocytes, which have been previously activated by mature dendritic cells presenting tumor antigen-derived peptides, can lyse tumor cells. However, different escape mechanisms are developed by the tumor to evade the immune system such as the development of regulatory T cells (Tregs) or the induction of T cell exhaustion (6). Different works have highlighted a direct or an indirect impact of VEGF-A on this T cell-based immunosuppression. This review will summarize these studies and focus on the immunomodulation induced by anti-angiogenic agents.

REGULATORY T-CELLS

Tregs play a critical role in immune homeostasis by regulating effector T cell functions. The proportion of Tregs is enhanced in tumor-bearing mice and in cancer patients and is often associated with a poorer overall survival (7). A correlation between VEGF-A in malignant effusions and the accumulation of Tregs has been observed in cancer patients suggesting a potential role of VEGF-A on Tregs (8). A meta-analysis also revealed that VEGF-A expression is positively associated with intratumoral Tregs in hepatocellular carcinoma (HCC) (9). Thus, VEGF-A has been associated with the induction and maintenance of regulatory T-cells in tumor microenvironment in a direct or indirect-dependent manner.

Indirect Induction of Regulatory T-Cells by VEGF-A

In cancer, Tregs accumulation could occur through different mechanisms, such as expansion of pre-existing Tregs or conversion of conventional CD4⁺T cells into Tregs. Immature dendritic cells (DC) can induce Tregs proliferation in a TGF- β -dependent manner in tumor-bearing rodents (10). An initial study showed that tumor cell lines-derived VEGF-A affects the development of hematopoietic progenitor cells (HPCs) at an early state resulting in impaired DC differentiation and maturation (11). Inhibition of DC differentiation is mediated by VEGFR-2 (12). In mouse models, VEGF-A binding to VEGFR-1 on HPCs blocked the activation of nuclear factor κ B (NF- κ B) thereby blocking DC maturation (13, 14). In cancer patients, an increased VEGF-A plasma level is correlated with the presence of immature DC in the peripheral blood (15). This team also reported that the decrease of mature DC is associated with an increase of myeloid-derived suppressor cell (MDSC) in the peripheral blood of cancer patients (16). MDSC, especially Gr-1⁺CD11b⁺CD115⁺ (monocytic) MDSC, can also generate tumor specific Tregs in tumor-bearing mice and in cancer patients by secreting IL-10 and TGF- β (17, 18) or by arginase activity (19). VEGF-A has also been involved in MDSC increase in a VEGFR-2-dependent manner in mice (13, 20) and in ovarian cancer patients (21). Activation of JAK2-STAT3 pathway by VEGF-A facilitates circulating MDSC accumulation (22). Accumulation of VEGFR-2⁺ MDSC in tumors contributes to poor prognosis (21). Thus, VEGF-A can act on both DC maturation and MDSC in tumor-bearing hosts. These myeloid cells producing immunosuppressive factors such as TGF- β or IL-10 could be involved in Tregs accumulation. Furthermore, a correlation has been observed between MDSC decrease and Tregs reduction in metastatic renal cell cancer patients during sunitinib treatment (a tyrosine kinase inhibitor targeting VEGFR) suggesting a link between MDSC and Tregs (23).

VEGF-A Directly Promotes Regulatory T-Cells Proliferation

Different studies have recently highlighted a population of Tregs expressing VEGFR-2 in tumor-bearing mice and cancer patients (24–26). In a mouse model of colorectal cancer, we observed that a subset of activated/memory Tregs express VEGFR-2 (unlike

healthy controls) and that VEGF-A induces Tregs proliferation in a VEGFR-2 dependent manner (25). In humans, Suzuki et al. showed that VEGFR-2 is selectively expressed by human FoxP3^{high} Tregs but not on FoxP3^{low} Tregs and may have stronger suppressive function (24). Effector CD45RA⁻ FoxP3⁺CD4⁺ Tregs subset infiltrating the tumors has also been reported to express VEGFR-2 in advanced gastric cancer patients. Furthermore, the ability of VEGF-A to increase Tregs proliferation has been confirmed in this setting (26). VEGFR-2⁺ Tregs in tumor tissues is also associated with clinical outcome since intratumoral FoxP3⁺ VEGFR-2⁺ Tregs, unlike intratumoral FoxP3⁺ VEGFR-2⁻ Tregs are significantly correlated with poor overall survival and disease-free survival. It is an independent factor of recurrence and poor survival in colorectal cancer patients suggesting that VEGFR-2⁺ Tregs may be a prognostic biomarker in colorectal cancer (27). In some tumor locations, the prognostic role of tumor-infiltrating Tregs is still controversial. Taking VEGFR-2⁺ Tregs into account and not all Tregs could be more accurate to evaluate patient prognosis. Furthermore, specifically targeting VEGFR-2⁺ Tregs and not all Tregs could be of interest in cancer patients since it could help to restore an efficient anti-tumor response while limiting autoimmune adverse events.

EFFECTOR T-CELLS

Disruption of effector T cell infiltration or activation are important mechanisms of tumor-induced immunosuppression. VEGF-A has also been reported to take part in these mechanisms.

Immunosuppressive State Mediated by VEGF-A Inhibits Effector T-Cells Functions

As we described above, VEGF-A can block DC maturation and increase MDSC accumulation. Therefore, immature DC are not able to efficiently activate T-cells (11). MDSC are also highly efficient at suppressing effector T cells by different mechanisms: L-arginase depletion (28), NO or ROS production (29, 30) and CD40-CD40L ligation (31). Likewise, tumor-associated macrophages (TAM) express PD-L1 which upon binding with PD-1 inhibits TCR signaling leading to an inactivation of T-cells (32). VEGF-A contributes to TAM recruitment; mainly into poorly vascularized tumor areas, exercising a chemoattractant effect *via* VEGFR-1 expression on macrophages surface. Nevertheless, VEGF-A alone is not sufficient to their activation which requires other tumor-produced factors such as IL-4 and IL-10 (33, 34). The up-regulation of these pro-inflammatory cytokines seems to be favored by VEGF-A over-expression.

Aberrant Tumor Vasculature Mediated by VEGF-A Decreases T-Cell Infiltration of the Tumor

Although tumor angiogenesis driven by pro-angiogenic factors intends to contribute to blood supply to the tumor, the induced vascular network is abnormal. It is characterized by chaotic, immature, disorganized, poorly perfused and permeable blood

vessels which are partially mediated by an abnormal level of tumor-secreted VEGF-A and other factors such as TGF- β , PDGF (platelet-derived growth factor) and angiopoietin 2 (35, 36). In many human and mouse solid tumors, the aberrant structure and function of the tumor vasculature generates a barrier to the CD8⁺ T-cell infiltration and contribute to the maintenance of an immunosuppressive tumor microenvironment (37). Deletion of Rgs5-gene (regulator of G-protein signaling 5), which is responsible for the aberrant morphology of blood vessels, induced a vascular normalization and CD8⁺ T-cell infiltration in tumor-bearing mice (38). Several *in vitro* studies have demonstrated that the decrease of T-cell adhesion resulting in a restricted migration is associated with the decrease of intercellular adhesion molecules 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecules 1 (VCAM-1) on endothelial cells (39–41). The cooperation of VEGF-A with IL-10 and prostaglandin E2 is also able to induce FasL expression on tumor endothelial cells. In ovarian, colon, bladder, prostate, and renal cancers, FasL⁺ endothelial cells acquire the ability to kill T-cells while allowing FoxP3⁺ Tregs accumulation and infiltration (42). Finally, the down-regulation of adhesion molecules and expression of FasL on tumor endothelial cells mainly induced by VEGF-A are responsible for a decrease of tumor infiltration by T-cells.

VEGF-A Directly Suppresses T-Cell Functions

In tumor producing elevated levels of VEGF-A, studies revealed that this factor and its receptors have important roles in the aberrant hematopoiesis resulting in defects in immunity (20). Mice exposed to recombinant VEGF at similar concentrations to those observed in patients with advanced cancer develop a thymic atrophy with a reduced number of CD4/CD8 thymocytes (43). These results demonstrate that VEGF-A directly interferes with the thymic development of T-cells from HPCs and can contribute to the immune deficiencies associated with tumors. Studies revealed that VEGF-A directly impacts effector T cells. Indeed, *in vitro* activated T-cells but also tumor-infiltrating T cells express VEGFR-2 (44). In advanced ovarian cancer, VEGF-A directly suppresses T cell proliferation and cytotoxic activity *via* VEGFR-2 (45, 46). Although Basu et al.' study reported an enhanced IFN- γ and IL-2 production and migratory responses induced by VEGF-A in human CD45RO⁺ CD4⁺ memory T-cells (47), there are growing evidences to support the immunosuppressive role of VEGF-A/VEGFR in T-cells (5) especially on tumor-induced T-cell exhaustion (44, 48). T-cell exhaustion is phenotypically characterized by the co-expression of immune inhibitory receptors called immune checkpoints such as program cell death-1 (PD-1), T-cell immunoglobulin mucin-3 (Tim-3), cytotoxic T-lymphocyte-associated protein (CTLA-4), lymphocyte activation gene 3 (Lag3) in CD8⁺ T-cells and by a gradual loss of function (49). VEGF-A increases PD-1 expression and other immune checkpoints CTLA-4, Tim-3 and Lag-3 on CD8⁺ T-cells but also their co-expression which is related to exhaustion. The VEGFR-2- PLC γ - calcineurin- NFAT pathway is involved in this effect (44). These results have been confirmed by others (48, 50).

Recently, a study carried out on patients with microsatellite stable colorectal cancer (MSS CRC) resistant to anti-PD-1 therapies has identified that VEGF-A-dependent upregulation of immune checkpoints involved the TOX transcription factor (50).

In conclusion, VEGF-A acts as an immunosuppressive factor in modulating immune cells. Its effects are summarized in **Figure 1**.

ANTI-ANGIOGENIC THERAPIES

Based on these properties, the immunomodulatory role of anti-angiogenic (AA) agents targeting VEGF-A/VEGFR in antitumor immunity has been investigated in tumor models and cancer patients (51). These effects are summarized in **Table 1**.

Anti-VEGF-A/VEGFR Therapies Modulate Immune Cells Including T-Cells

During the last decade, different AA molecules have been developed and approved to treat cancer patients. They can be classified in three main classes: (i) small tyrosine kinase inhibitors (TKI) such as sunitinib, sorafenib and axitinib (ii) monoclonal antibodies (mAb) such as bevacizumab (anti-VEGF-A) and ramucirumab (anti-VEGFR-2) (iii) aflibercept which is a fusion protein composed of extracellular domains from VEGFR-1 and VEGFR-2 (52). Whereas TKI target VEGFR pathway (but also other receptors), monoclonal antibodies and fusion proteins directly target circulating pro-angiogenic factors or their receptors present on the cell membrane.

Tyrosine Kinase Inhibitors

Sunitinib. Sunitinib is a TKI currently used to treat different types of cancers, in particular metastatic renal cell carcinoma (mRCC) (52). After sunitinib treatment, the percentage of splenic FoxP3⁺ Tregs in mouse models of renal cancer and circulating Tregs in mRCC patients is decreased (23, 53–55). Sunitinib also reduces MDSC numbers which is correlated with Treg decrease in the tumor microenvironment (23, 56) and favors CD4⁺ and CD8⁺ infiltration in the tumor site while reducing PD-1 expression on CD8⁺ T-cells (44, 53). Moreover, sunitinib suppresses the conversion of CD4⁺CD25⁻ naïve T cells in Tregs in mouse tumor models (57). In humans, *in vitro* studies reported a significant improvement of Th1 cytokine response in mRCC patients receiving sunitinib. This effect seems to be linked to a reduction of Tregs (23, 54). In addition, in RCC tumor cells and tumor-associated MDSC, sunitinib inhibits Stat3 activity leading to tumor cell apoptosis and promoting antitumor effect (56).

Sorafenib. As well as sunitinib, sorafenib can reduce Tregs and MDSC proportion in mouse models of liver cancer (58) and in HCC patients (59) or RCC (60). However, sorafenib seems to modulate T-cell functions differently from sunitinib and had no impact on Th1 response (60, 70). An *in vitro* study examining the effects of sorafenib on the proliferation and activation of human peripheral blood T-cells showed that sorafenib targets LCK phosphorylation implicated in the TCR signaling causing the loss of T-cell immune responses (71). Controversially, studies

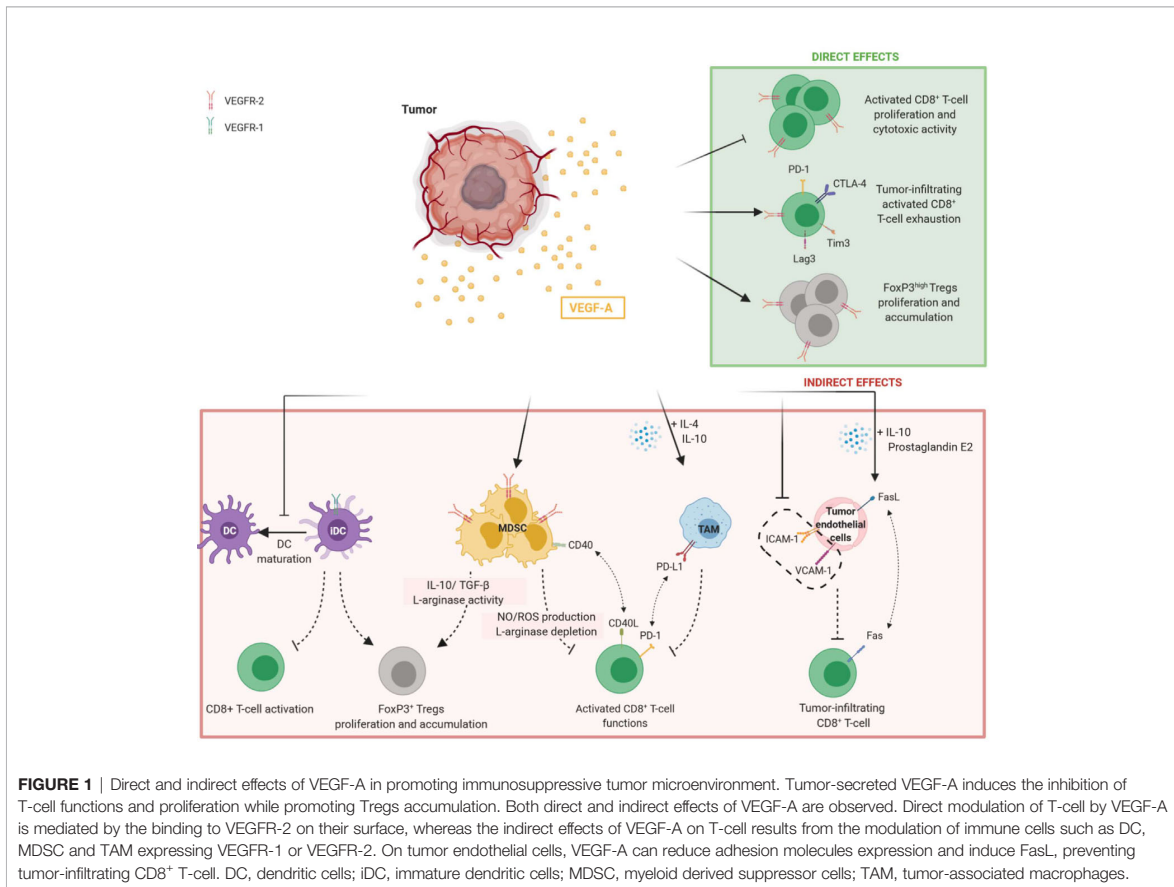


FIGURE 1 | Direct and indirect effects of VEGF-A in promoting immunosuppressive tumor microenvironment. Tumor-secreted VEGF-A induces the inhibition of T-cell functions and proliferation while promoting Tregs accumulation. Both direct and indirect effects of VEGF-A are observed. Direct modulation of T-cell by VEGF-A is mediated by the binding to VEGFR-2 on their surface, whereas the indirect effects of VEGF-A on T-cell results from the modulation of immune cells such as DC, MDSC and TAM expressing VEGFR-1 or VEGFR-2. On tumor endothelial cells, VEGF-A can reduce adhesion molecules expression and induce FasL, preventing tumor-infiltrating CD8⁺ T-cell. DC, dendritic cells; IDC, immature dendritic cells; MDSC, myeloid derived suppressor cells; TAM, tumor-associated macrophages.

have revealed that this treatment seems to up-regulate the tumor-specific effector T cell functions while PD-1 expression on CD8⁺ T-cells is down-regulated (59, 61, 62). Currently, the effects of sorafenib on T-cell functions remain unclear.

Axitinib. Axitinib is a highly selective VEGFR tyrosine kinase inhibitor and has demonstrated its efficacy in the treatment of advanced RCC (aRCC) (63). In tumor bearing mice, axitinib suppressed MDSC accumulation through the inhibition of Stat3 activity and it was correlated with the reversal of T-cell suppression (64, 65). Indeed, the proportion of CD8⁺ T-cells is increased in a mouse model of renal cancer (64) and an *in vivo* study in a mouse melanoma model showed an increase of tumor-infiltrating immune cells (65).

Monoclonal Antibodies

Bevacizumab. Bevacizumab, a humanized anti-VEGF-A monoclonal antibody which directly targets VEGF-A, reduced the proportion of Tregs in tumor-bearing mice and in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) (25, 66). This phenomenon is linked to a decrease of Ki67⁺ expression in Tregs (25). In mCRC patients treated with bevacizumab, Manzoni et al. revealed an increase of CD4, CD8 and CD3 lymphocyte numbers (29),

whereas Tsavaris et al. observed a better proliferation and cytokine production of circulating T-cells compared to patients treated with chemotherapy only (67). Moreover, the administration of anti-VEGF-A in tumor-bearing mice decreased PD-1 expression on intratumoral CD8⁺ T-cells and limited the co-expression of inhibitory checkpoints associated with exhaustion (44). Recently, a study conducted on non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients revealed that bevacizumab addition to the chemotherapy doublet based on cisplatin and oral etoposide decreased the plasmatic VEGF-A level and improved cytotoxic T-lymphocytes responses (68) while simultaneously restoring DC functions.

Ramucirumab. Ramucirumab is a monoclonal antibody targeting VEGFR-2. In patients with advanced gastric cancers, CD45RA⁻ FoxP3⁺ CD4⁺ effector Tregs cells expressing VEGFR-2 are present in higher frequency in TIL than in PBMC (26). In vitro experiments showed that VEGF-A stimulates their proliferation which can be overcome by ramucirumab. Ramucirumab-containing therapies strongly reduce effector Tregs in tumors of advanced gastric cancer patients. A higher frequency of these effector Tregs in tumors before treatment was associated with an enhanced proportion of partial response and a longer progression-free survival. Since VEGFR-2 is highly expressed by this Tregs subset, it could be

TABLE 1 | Modulation of T-cells by anti-angiogenic therapy.

Anti-angiogenic	Target	Effects of anti-angiogenic therapy	
Tyrosine Kinase Inhibitor			
Sunitinib	VEGFRs(+ c-Kit, PDGFR,Flt-3)	Decrease the percentage of splenic Tregs* Decrease the percentage of circulating Tregs (correlated with reduction of MDSC numbers in TME) ^d Suppress the conversion of CD4 ⁺ CD25 ⁻ T cells in Tregs ^d Enhance Th1 cytokine response (IFN-g production) ^d Favor CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T-cells infiltration in the tumor* Reduce PD-1 expression of intra-tumoral CD8 ⁺ T-cells*	(23) (53–58)
Sorafenib	VEGFRs(+ c-Kit PDGFR, Raf-kinases, RET)	Decrease Tregs proportion (correlated with reduction of MDSC numbers in the TME) ^{d,e,*} Enhance effector T-cell functions ^g Reduce PD-1 expression on CD8 ⁺ T-cells ^{e,*}	(59–61) (64, 65)
Axitinib	VEGFR-2	Induce the reversal of T-cell suppression through the suppression of MDSC accumulation* Increase CD8 ⁺ T-cells proportion* Favor immune cells infiltration in the tumor*	(66–68)
Monoclonal antibody			
Bevacizumab	VEGF-A	Decrease the percentage of splenic Tregs* and circulating Tregs ^a Increases CD4, CD8 and CD3 lymphocyte numbers and T-cell proliferation ^a Enhance cytokine production of circulating T-cells ^a Enhance cytotoxic T-lymphocytes responses ^b Reduce PD-1 expression on intra-tumoral CD8 ⁺ T-cells*	(8, 29, 44) (69–71)
Ramucirumab	VEGFR-2	Limit co-expression of inhibitory checkpoint associated with exhaustion* Reduce effector Tregs (CD45RA ⁻ FoxP3 ⁺ CD4 ⁺ Tregs) expressing VEGFR-2 ^c Reduce PD-1 expression on CD8 ⁺ T-cells (only for patients with high frequency of effector Tregs before treatment) ^c	(26)
Fusion Protein			
Aflibercept		Enhance CD8 ⁺ T-cells functions* Reduce PD-1 and Tim3 expression of intra-tumoral CD8 ⁺ T-cells*	(72)

^aColorectal cancer patients.^bNon-small cell lung cancer patient.^cGastric cancer patients.^dRenal cell carcinoma patients.^eHepatocellular carcinoma patients.

*tumor-bearing mice.

envisioned that the proportion of VEGFR-2⁺ effector Tregs in TIL could be a biomarker of favorable clinical response to ramucirumab therapies (26). A decreased expression of PD-1 on CD8⁺ T-cells was also reported after ramucirumab treatment (26).

Fusion Protein

Aflibercept. Aflibercept is a VEGFR fusion protein conjugated to Fc portion of human IgG1, also known as VEGF-Trap. Nowadays the impact of VEGF-Trap treatments on T cells remains poorly described in cancer patients but a recent study highlights the improvement of CD8⁺ T cell functionality in a mouse model of glioma. Indeed, they observed a decrease of PD-1 and Tim3 expression on infiltrating CD8⁺ T-cells. Likewise, they found an improvement of DC maturation demonstrated by the increase of co-stimulation molecules expression including CD80, CD86 and MHC II which are required for T-cell activation (69).

Indirect Impact of Anti-Angiogenic on Immune Cells

An indirect impact of AA treatment on tumor-induced immunosuppression could also be proposed. AA treatments can be responsible of a transient normalization of the vasculature favoring tumor infiltration by immune cells. However, some reports have also indicated a potential enhancement of hypoxia especially during a prolonged AA treatment (72). Hypoxia fuels

tumor progression by selecting more malignant cells and also by inducing an immunosuppressive microenvironment. It can lead myeloid cells toward an immunosuppressive phenotype or potentiate regulatory T cell functions (73). Nevertheless, recent studies highlighted that aggravated hypoxia mediated by anti-VEGF-A treatment directly enhances CD8⁺ T-cell functions in an HIF-1 α dependent manner (74, 75). This aspect of anti-angiogenic impact needs further investigation.

Combination of Anti-VEGF-A/VEGFR Treatments With Immunotherapies

To enhance anti-tumor effects, combining AA therapies with immunotherapies such as immune checkpoint blockade (ICB: anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4) have raised great interest. In mouse tumor models, VEGF-A/VEGFR-2 and PD-1 blockade induces strong and synergic antitumor responses and limits T-cell exhaustion in VEGF-A-expressing tumor compared to monotherapies in mouse models of MSS colorectal cancer (44, 50). Two studies have been carried out in murine lung cancer models using anti-VEGF/VEGFR combined to anti-PD-L1. They have demonstrated strong anti-tumor effects which are associated with an increase of TIL and T-cell responses (48, 76). The association of anti-VEGFR-2 plus anti-PD-L1 could rescue the PD-1/Tim3 exhaustion T-cell phenotype, while improving overall survival (48). In preclinical murine models,

the association of axitinib with ICB (anti-PD-L1 and anti-Tim3 antibodies) resulted in a synergistic therapeutic efficacy (77).

Based on the interesting results from preclinical studies, many clinical trials have been conducted to evaluate combination therapies in cancer patients (78). In 2014, a phase I clinical trial (NCT00790010) investigated the combination of ipilimumab, an anti-CTLA-4 monoclonal antibody, and bevacizumab in 46 patients with a metastatic melanoma (79). The authors observed an upregulation of VCAM-1 and other adhesion molecules on intratumoral endothelial cells leading to endothelial cell activation. Furthermore, the trafficking of CD8⁺ T-cells across tumor vasculature was enhanced. When combined to ipilimumab, bevacizumab seems to influence tumor vasculature morphology and immune responses (79). Although antitumor response efficacy has been demonstrated, important immune-related adverse events are induced. Anti-CTLA-4 antibodies are known to generate autoimmune diseases (80). Meta-analysis revealed that about 70% of patients treated with ipilimumab including 25% of high-grade adverse events develop skin rashes, gastrointestinal dysfunctions such as colitis or less frequently endocrine dysfunctions (81, 82). When ipilimumab was combined to bevacizumab, 29.3% of patients experienced grade 3-4 adverse events. Inflammatory events were higher than expected with ipilimumab alone, but remained manageable. Interestingly, the incidence of colitis was not increased (79). High grade adverse events are less common for anti-PD-1/PD-L1 antibodies alone compared to ipilimumab. A study conducted in a small cohort of mRCC patients explored the effects of an anti-PD-L1 (atezolizumab) plus bevacizumab (NCT01633970) (83). Similar findings were highlighted including an improved migration of antigen-specific T-cells and an increase of cytokines and chemokines production in particular CX3CL1 involved in T-cell trafficking (83). Therapies combining AA agents plus ICB have shown their efficiency in phase III clinical trials (84) and have been recently approved in different locations (i) atezolizumab (anti-PD-L1) and bevacizumab with chemotherapy in NSCLC (85) (ii) atezolizumab and

bevacizumab in unresectable HCC (86) (iii) pembrolizumab (anti-PD-1) plus lenvatinib (TKI) in advanced endometrial cancer (87) (iv) pembrolizumab (anti-PD-1) plus axitinib in RCC (88) and v) axitinib plus avelumab (an anti-PD-L1) in RCC (89). No major increases of adverse events were reported with these combinations compared to each agent alone. Results of these clinical trials are summarized in **Table 2**.

Perspectives for a Better Use of Anti-Angiogenic Agents

The need to find approaches enabling the induction and activation of immune response against cancer remains considerable and in this context, novel approaches are important to consider. A better understanding of the immunomodulatory roles of pro-angiogenic factors produced in tumor-bearing hosts could help to develop new therapeutic strategies or combinations. One of the main issues encountered with AA agents in the development of resistance mechanisms including activation of alternative pro-angiogenic pathways such as Angiopoietin 2 (Ang2)/Tie2, HGF/c-Met or PlGF (90–92). High levels of Ang2 are associated with unfavorable responses to bevacizumab-containing therapies in patients suffering from colorectal cancers and metastatic melanoma treated with ICB (93). Different AA molecules are currently used to treat cancer patients, but the impact of these different treatments on anti-tumor immunity remains unclear. In some tumor locations, combining AA molecules with ICB allowed to improve the outcome of cancer patients, leading to the approval of different anti-angiogenic/ICB combinations by the FDA. However, many questions remain unanswered such as which tumors are sensitive to these associations, or if targeting alternative pro-angiogenic pathways in combination with ICB could also provide interesting anti-tumor effects. Recently, a study has shown in mouse tumor models that the concomitant blocking of VEGF-A and Ang2 with a bi-specific antibody stimulated antitumor immune responses compared with single-agent therapies and could increase the effectiveness of ICB such as anti-PD-1 antibody (94). Currently, multiple clinical trials are

TABLE 2 | Current clinical trials of anti-angiogenic therapies combined with immunotherapies.

Anti-angiogenic	Immunotherapy	Registration number	Phase	Cancer Location	Clinical efficacy	Correlatives
Tyrosine Kinase Inhibitor						
Axitinib	Avelumab ²	NCT02684006	III	Advanced RCC	OS 11.6 months PFS 13.8 months	As first-line treatment, improved PFS among patients with PD- L1-positive tumors (89) (88)
	Pembrolizumab ³	NCT02853331	III	Advanced RCC	OS 89.9%* PFS 15.1 months	
Lenvatinib	Pembrolizumab ³	NCT03517449	III	Advanced EC		(87)
Monoclonal antibody						
Bevacizumab	Ipilimumab ¹	NCT00790010	I	Metastatic melanoma	OS 25.1 months	Enhance the trafficking of CD8 ⁺ T-cells across tumor vasculature (79)
	Atezolizumab ²	NCT01633970	Ib	mRCC		Improve migration of T-cells/increase cytokine and chemokines production (83) (86)
		NCT03434379	III	Unresectable HCC	OS 67.2%* PFS 6.8 months	
Atezolizumab ² + chemotherapy	NCT02366143	III	NSCLC	OS 13.3 months	Improved OS in the subgroup of patient with baseline liver metastasis (85)	

¹anti-CTLA-4 antibody, ²anti-PD-L1 antibody, ³anti-PD-1 antibody; *at 12 months. (m)RCC, (metastatic) renal cell carcinoma; HCC, hepatocellular carcinoma; NSCLC, non-small cell lung cancer; EC, endometrial cancer; OS, overall survival; PFS, progression-free survival.

being conducted to assess dual inhibition of VEGF-A and Ang2 in patients with cancer and to further investigate mechanisms involved in alternative pro-angiogenic pathways (95).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MB and MT designed and wrote the main manuscript. JP and IG-F critically reviewed the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

REFERENCES

- Ho QT, Kuo CJ. Vascular Endothelial Growth Factor: Biology and Therapeutic Applications. *Int J Biochem Cell Biol* (2007) 39:1349. doi: 10.1016/j.biocel.2007.04.010
- Chouaib S, Messai Y, Couve S, Escudier B, Hasmim M, Noman MZ. Hypoxia Promotes Tumor Growth in Linking Angiogenesis to Immune Escape. *Front Immunol* (2012) 3:21. doi: 10.3389/fimmu.2012.00021
- Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, Zanovello P, Bronte V. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol Rev* (2008) 222:162–79. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00602.x
- Voron T, Marcheteau E, Pernot S, Colussi O, Tartour E, Taieb J, et al. Control of the Immune Response by Pro-Angiogenic Factors. *Front Oncol* (2014) 4:70. doi: 10.3389/fonc.2014.00070
- Li Y-L, Zhao H, Ren X-B. Relationship of VEGF/VEGFR with immune and cancer cells: staggering or forward? *Cancer Biol Med* (2016) 13:206–14. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2015.0070
- Lapeyre-Prost A, Terme M, Pernot S, Pointet A-L, Voron T, Tartour E, et al. Chapter Seven - Immunomodulatory Activity of VEGF in Cancer. In: L Galluzzi, editor. *International Review of Cell and Molecular Biology*, vol. 330. United States: Academic Press (2017). p. 295–342. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.09.007
- Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* (2019) 16:356–71. doi: 10.1038/s41571-019-0175-7
- Wada J, Suzuki H, Fuchino R, Yamasaki A, Nagai S, Yanai K, et al. The contribution of vascular endothelial growth factor to the induction of regulatory T-cells in malignant effusions. *Anticancer Res* (2009) 29:881–8.
- Sun L, Xu G, Liao W, Yang H, Xu H, Du S, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Oncotarget* (2017) 8:39658–72. doi: 10.18632/oncotarget.17340
- Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- β -secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* (2005) 202:919–29. doi: 10.1084/jem.20050463
- Gabrilovich DI, Chen HL, Gargis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* (1996) 2:1096–103. doi: 10.1038/nm1096-1096
- Dikov MM, Ohm JE, Ray N, Tchekneva EE, Burlison J, Moghanaki D, et al. Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors 1 and 2 in Dendritic Cell Differentiation. *J Immunol* (2005) 174:215–22. doi: 10.4049/jimmunol.174.1.215
- Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages *in vivo*. *Blood* (1998) 92:4150–66. doi: 10.1182/blood.V92.11.4150.423k45_4150_4166
- Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Affects Dendritic Cell Maturation Through the Inhibition of Nuclear Factor- κ B Activation in Hemopoietic Progenitor Cells. *J Immunol* (1998) 160:1224–32.
- Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, et al. Clinical Significance of Defective Dendritic Cell Differentiation in Cancer. *Clin Cancer Res* (2000) 6:1755–66.
- Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* (2001) 166:678–89. doi: 10.4049/jimmunol.166.1.678
- Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, Lehner F, Krüger C, Manns MP, et al. A New Population of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Hepatocellular Carcinoma Patients Induces CD4+CD25+Foxp3+ T Cells. *Gastroenterology* (2008) 135:234–43. doi: 10.1053/j.gastro.2008.03.020
- Huang B, Pan P-Y, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* (2006) 66:1123–31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1299
- Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, Borrello I. Myeloid derived suppressor cells promote cross-tolerance in B cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res* (2008) 68:5439–49. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6621
- Huang Y, Chen X, Dikov MM, Novitskiy SV, Mosse CA, Yang L, et al. Distinct roles of VEGFR-1 and VEGFR-2 in the aberrant hematopoiesis associated with elevated levels of VEGF. *Blood* (2007) 110:624–31. doi: 10.1182/blood-2007-01-065714
- Horikawa N, Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Baba T, Yamaguchi K, et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Ovarian Cancer Inhibits Tumor Immunity through the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Clin Cancer Res* (2017) 23:587–99. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0387
- Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, Bhattacharya R, Cheng P, Salup R, et al. Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J Immunol* (2004) 172:464–74. doi: 10.4049/jimmunol.172.1.464
- Ko JS, Zea AH, Rini BI, Ireland JL, Elson P, Cohen P, et al. Sunitinib Mediates Reversal of Myeloid-Derived Suppressor Cell Accumulation in Renal Cell Carcinoma Patients. *Clin Cancer Res* (2009) 15:2148–57. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1332
- Suzuki H, Onishi H, Wada J, Yamasaki A, Tanaka H, Nakano K, et al. VEGFR2 is selectively expressed by FOXP3high CD4+ Treg. *Eur J Immunol* (2010) 40:197–203. doi: 10.1002/eji.200939887
- Terme M, Pernot S, Marcheteau E, Sandoval F, Benhamoua N, Colussi O, et al. VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Res* (2013) 73:539–49. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2325
- Tada Y, Togashi Y, Kotani D, Kuwata T, Sato E, Kawazoe A, et al. Targeting VEGFR2 with Ramucirumab strongly impacts effector/activated regulatory T cells and CD8+ T cells in the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer* (2018) 6:106. doi: 10.1186/s40425-018-0403-1
- Suzuki H, Onishi H, Morisaki T, Tanaka M, Katano M. Intratumoral FOXP3 +VEGFR2+ regulatory T cells are predictive markers for recurrence and survival in patients with colorectal cancer. *Clin Immunol* (2013) 146:26–33. doi: 10.1016/j.clim.2012.10.007
- Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* (2005) 5:641–54. doi: 10.1038/nri1668

29. Manzoni M, Rovati B, Ronzoni M, Loupakis F, Mariucci S, Ricci V, et al. Immunological Effects of Bevacizumab-Based Treatment in Metastatic Colorectal Cancer. *Oncology* (2010) 79:187–96. doi: 10.1159/000320609
30. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* (2007) 13:828–35. doi: 10.1038/nm1609
31. Pan P-Y, Ma G, Weber KJ, Ozao-Choy J, Wang G, Yin B, et al. Immune Stimulatory Receptor CD40 Is Required for T-Cell Suppression and T Regulatory Cell Activation Mediated by Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer. *Cancer Res* (2010) 70:99. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1882
32. Noy R, Pollard JW. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* (2014) 41:49–61. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.010
33. Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol* (2000) 192:150–8. doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH687>3.0.CO;2-G
34. Linde N, Lederle W, Depner S, van Rooijen N, Gutschalk CM, Mueller MM. Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and alternative activation of macrophages. *J Pathol* (2012) 227:17–28. doi: 10.1002/path.3989
35. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* (2011) 473:298–307. doi: 10.1038/nature10144
36. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* (2005) 15:102–11. doi: 10.1016/j.gde.2004.12.005
37. Schaaf MB, Garg AD, Agostinis P. Defining the role of the tumor vasculature in antitumor immunity and immunotherapy. *Cell Death Dis* (2018) 9(2):115. doi: 10.1038/s41419-017-0061-0
38. Hamzah J, Jugold M, Kiessling F, Rigby P, Manzur M, Marti HH, et al. Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. *Nature* (2008) 453:410–4. doi: 10.1038/nature06868
39. Dirckx AEM, Egbrink MGA, Kuijpers MJE, Van den Niet ST, Heijnen VVT, Steege JCAB, et al. Tumor Angiogenesis Modulates Leukocyte-Vessel Wall Interactions in Vivo by Reducing Endothelial Adhesion Molecule Expression. *Cancer Res* (2003) 63:2322–9.
40. Bouzin C, Brouet A, De Vriese J, Deweyer J, Feron O. Effects of vascular endothelial growth factor on the lymphocyte-endothelium interactions: identification of caveolin-1 and nitric oxide as control points of endothelial cell energy. *J Immunol* (2007) 178:1505–11. doi: 10.4049/jimmunol.178.3.1505
41. Huang H, Langenkamp E, Georganaki M, Loskog A, Fuchs PF, Dieterich LC, et al. VEGF suppresses T-lymphocyte infiltration in the tumor microenvironment through inhibition of NF- κ B-induced endothelial activation. *FASEB J* (2015) 29:227–38. doi: 10.1096/fj.14-250985
42. Motz GT, Santoro SP, Wang L-P, Garrabrant T, Lastra RR, Hagemann IS, et al. Tumor Endothelium FasL Establishes a Selective Immune Barrier Promoting Tolerance in Tumors. *Nat Med* (2014) 20:607–15. doi: 10.1038/nm.3541
43. Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, Kisseleva E, Parman KS, Nadaf S, et al. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* (2003) 101:4878–86. doi: 10.1182/blood-2002-07-1956
44. Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Pernot S, Nizard M, Pointet A-L, et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J Exp Med* (2015) 212:139–48. doi: 10.1084/jem.20140559
45. Gavalas NG, Tsiatas M, Tsiatsilonis O, Politi E, Ioannou K, Ziogas AC, et al. VEGF directly suppresses activation of T cells from ascites secondary to ovarian cancer via VEGF receptor type 2. *Br J Cancer* (2012) 107:1869–75. doi: 10.1038/bjc.2012.468
46. Ziogas AC, Gavalas NG, Tsiatas M, Tsiatsilonis O, Politi E, Terpos E, et al. VEGF directly suppresses activation of T cells from ovarian cancer patients and healthy individuals via VEGF receptor Type 2. *Int J Cancer* (2012) 130:857–64. doi: 10.1002/ijc.26094
47. Basu A, Hoerning A, Datta D, Edelbauer M, Stack MP, Calzadilla K, et al. Cutting Edge: Vascular Endothelial Growth Factor-Mediated Signaling in Human CD45RO+ CD4+ T Cells Promotes Akt and ERK Activation and Costimulates IFN- γ Production. *J Immunol* (2010) 184:545–9. doi: 10.4049/jimmunol.0900397
48. Meder L, Schuldt P, Thelen M, Schmitt A, Dietlein F, Klein S, et al. Combined VEGF and PD-L1 Blockade Displays Synergistic Treatment Effects in an Autochthonous Mouse Model of Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* (2018) 78:4270–81. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2176
49. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol* (2011) 12:492–9. doi: 10.1038/ni.2035
50. Kim CG, Jang M, Kim Y, Leem G, Kim KH, Lee H, et al. VEGF-A drives TOX-dependent T cell exhaustion in anti-PD-1-resistant microsatellite stable colorectal cancers. *Sci Immunol* (2019) 4(41):eaay0555. doi: 10.1126/sciimmunol.aay0555
51. Yang J, Yan J, Liu B. Targeting VEGF/VEGFR to Modulate Antitumor Immunity. *Front Immunol* (2018) 9:978. doi: 10.3389/fimmu.2018.00978
52. Qin S, Li A, Yi M, Yu S, Zhang M, Wu K. Recent advances on anti-angiogenesis receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Hematol Oncol* (2019) 12(1):27. doi: 10.1186/s13045-019-0718-5
53. Ozao-Choy J, Ma G, Kao J, Wang GX, Meseck M, Sung M, et al. The Novel Role of Tyrosine Kinase Inhibitor in the Reversal of Immune Suppression and Modulation of Tumor Microenvironment for Immune-Based Cancer Therapies. *Cancer Res* (2009) 69:2514–22. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4709
54. Finke JH, Rini B, Ireland J, Rayman P, Richmond A, Golshayan A, et al. Sunitinib Reverses Type-1 Immune Suppression and Decreases T-Regulatory Cells in Renal Cell Carcinoma Patients. *Clin Cancer Res* (2008) 14:6674–82. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5212
55. Adotevi O, Pere H, Ravel P, Haicheur N, Badoual C, Merillon N, et al. A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. *J Immunother* (2010) 33:991–8. doi: 10.1097/CJI.0b013e3181f4c208
56. Xin H, Zhang C, Herrmann A, Du Y, Figlin R, Yu H. Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res* (2009) 69:2506–13. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4323
57. Kujawski M, Zhang C, Herrmann A, Reckamp K, Scuto A, Jensen M, et al. Targeting STAT3 in adoptively transferred T cells promotes their *in vivo* expansion and antitumor effects. *Cancer Res* (2010) 70:9599–610. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1293
58. Cao M, Xu Y, Youn J, Cabrera R, Zhang X, Gabrilovich D, et al. Kinase Inhibitor Sorafenib Modulates Immunosuppressive Cell Populations in a Murine Liver Cancer Model. *Lab Invest* (2011) 91:598–608. doi: 10.1038/labinvest.2010.205
59. Kalathil SG, Lugade AA, Miller A, Iyer R, Thanavala Y. PD-1+ and Foxp3+ T cell reduction correlates with survival of HCC patients after sorafenib therapy. *JCI Insight* 1(11):e86182. doi: 10.1172/jci.insight.86182
60. Busse A, Asemisen AM, Nonnenmacher A, Braun F, Ochsenreither S, Stather D, et al. Immunomodulatory effects of sorafenib on peripheral immune effector cells in metastatic renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* (2011) 47:690–6. doi: 10.1016/j.ejca.2010.11.021
61. Chen M-L, Yan B-S, Lu W-C, Chen M-H, Yu S-L, Yang P-C, et al. Sorafenib relieves cell-intrinsic and cell-extrinsic inhibitions of effector T cells in tumor microenvironment to augment antitumor immunity: Sorafenib Treatment Enhances Antitumor Immunity in Tumor Milieu. *Int J Cancer* (2014) 134:319–31. doi: 10.1002/ijc.28362
62. Kalathil SG, Hutson A, Barbi J, Iyer R, Thanavala Y. Augmentation of IFN- γ + CD8+ T cell responses correlates with survival of HCC patients on sorafenib therapy. *JCI Insight* 4(15):e130116. doi: 10.1172/jci.insight.130116
63. Gross-Goupil M, François L, Quivy A, Ravaud A. Axitinib: A Review of its Safety and Efficacy in the Treatment of Adults with Advanced Renal Cell Carcinoma. *Clin Med Insights Oncol* (2013) 7:269–77. doi: 10.4137/CMO.S10594
64. Yuan H, Cai P, Li Q, Wang W, Sun Y, Xu Q, et al. Axitinib augments antitumor activity in renal cell carcinoma via STAT3-dependent reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation. *BioMed Pharmacother* (2014) 68:751–6. doi: 10.1016/j.biopha.2014.07.002
65. Du Four S, Maenhout SK, De Pierre K, Renmans D, Niclou SP, Thielemans K, et al. Axitinib increases the infiltration of immune cells and reduces the suppressive capacity of monocytic MDSCs in an intracranial mouse melanoma model. *Oncoimmunology* (2015) 4(4):e998107. doi: 10.1080/2162402X.2014.998107
66. Terme M, Tartour E, Taieb J. VEGFA/VEGFR2-targeted therapies prevent the VEGFA-induced proliferation of regulatory T cells in cancer. *Oncoimmunology* (2013) 2:e25156. doi: 10.4161/onci.25156
67. Tsavaris N, Voutsas IF, Kosmas C, Gritzapis AD, Baxevas CN. Combined treatment with Bevacizumab and standard chemotherapy restores abnormal

- immune parameters in advanced colorectal cancer patients. *Invest New Drugs* (2012) 30:395–402. doi: 10.1007/s10637-010-9533-0
68. Martino E, Misso G, Pastina P, Costantini S, Vanni F, Gandolfo C, et al. Immune-modulating effects of bevacizumab in metastatic non-small-cell lung cancer patients. *Cell Death Discovery* (2016) 2:16025. doi: 10.1038/cddiscovery.2016.25
 69. Malo CS, Khadka RH, Ayasoufi K, Jin F, AbouChehade JE, Hansen MJ, et al. Immunomodulation Mediated by Anti-angiogenic Therapy Improves CD8 T Cell Immunity Against Experimental Glioma. *Front Oncol* (2018) 8:320. doi: 10.3389/fonc.2018.00320
 70. Nagai H, Mukozu T, Matsui D, Kanekawa T, Kanayama M, Wakui N, et al. Sorafenib Prevents Escape from Host Immunity in Liver Cirrhosis Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Clin Dev Immunol* (2012) 2012:607851. doi: 10.1155/2012/607851
 71. Zhao W, Gu YH, Song R, Qu BQ, Xu Q. Sorafenib inhibits activation of human peripheral blood T cells by targeting LCK phosphorylation. *Leukemia* (2008) 22:1226–33. doi: 10.1038/leu.2008.58
 72. Ribatti D, Anness T, Ruggieri S, Tammaro R, Crivellato E. Limitations of Anti-Angiogenic Treatment of Tumors. *Trans Oncol* (2019) 12:981–6. doi: 10.1016/j.tranon.2019.04.022
 73. Noman MZ, Hasmin M, Messai Y, Terry S, Kieda C, Janji B, et al. Hypoxia: a key player in antitumor immune response. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol* (2015) 309:C569–79. doi: 10.1152/ajpcell.00207.2015
 74. de Almeida PE, Mak J, Hernandez G, Jesudason R, Herault A, Javinal V, et al. Anti-VEGF Treatment Enhances CD8+ T-cell Antitumor Activity by Amplifying Hypoxia. *Cancer Immunol Res* (2020) 8:806–18. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0360
 75. Palazon A, Tyrakis PA, Macias D, Veliça P, Rundqvist H, Fitzpatrick S, et al. An HIF-1 α /VEGF-A Axis in Cytotoxic T Cells Regulates Tumor Progression. *Cancer Cell* (2017) 32:669–83.e5. doi: 10.1016/j.ccell.2017.10.003
 76. Zhao S, Jiang T, Li X, Zhou C. OA11.07 Combining Anti-Angiogenesis and Immunotherapy Enhances Antitumor Effect by Promoting Immune Response in Lung Cancer. *J Thoracic Oncol* (2017) 12:S288. doi: 10.1016/j.jtho.2016.11.293
 77. Läubli H, Müller P, D'Amico L, Buchi M, Kashyap AS, Zippelius A. The multi-receptor inhibitor axitinib reverses tumor-induced immunosuppression and potentiates treatment with immune-modulatory antibodies in preclinical murine models. *Cancer Immunol Immunother* (2018) 67:815–24. doi: 10.1007/s00262-018-2136-x
 78. Ciciola P, Cascetta P, Bianco C, Formisano L, Bianco R. Combining Immune Checkpoint Inhibitors with Anti-Angiogenic Agents. *J Clin Med* (2020) 9(3):675. doi: 10.3390/jcm9030675
 79. Hodi FS, Lawrence D, Lezcano C, Wu X, Zhou J, Sasada T, et al. Bevacizumab plus ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *Cancer Immunol Res* (2014) 2:632–42. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0053
 80. Teplý BA, Lipson EJ. Identification and management of toxicities from immune checkpoint-blocking drugs. *Oncol (Williston Park)* (2014) 28 Suppl 3:30–8.
 81. Bertrand A, Kostine M, Barnetche T, Truchetet M-E, Schaevebeke T. Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies: systematic review and meta-analysis. *BMC Med* (2015) 13:211. doi: 10.1186/s12916-015-0455-8
 82. Voskens CJ, Goldinger SM, Loquai C, Robert C, Kaehler KC, Berking C, et al. The Price of Tumor Control: An Analysis of Rare Side Effects of Anti-CTLA-4 Therapy in Metastatic Melanoma from the Ipilimumab Network. *PloS One* (2013) 8:e53745. doi: 10.1371/journal.pone.0053745
 83. Wallin JJ, Bendell JC, Funke R, Sznol M, Korski K, Jones S, et al. Atezolizumab in combination with bevacizumab enhances antigen-specific T-cell migration in metastatic renal cell carcinoma. *Nat Commun* (2016) 7:12624. doi: 10.1038/ncomms12624
 84. Yi M, Jiao D, Qin S, Chu Q, Wu K, Li A. Synergistic effect of immune checkpoint blockade and anti-angiogenesis in cancer treatment. *Mol Cancer* (2019) 18:60. doi: 10.1186/s12943-019-0974-6
 85. Reck M, Mok TSK, Nishio M, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, et al. Atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in non-small-cell lung cancer (IMpower150): key subgroup analyses of patients with EGFR mutations or baseline liver metastases in a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Respir Med* (2019) 7:387–401. doi: 10.1016/S2213-2600(19)30084-0
 86. Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim T-Y, et al. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *New Engl J Med* (2020) 382:1894–905. doi: 10.1056/NEJMoa1915745
 87. Makker V, Casado Herraez A, Aghajanian C, Fujiwara K, Pignata S, Penson RT, et al. A phase 3 trial evaluating efficacy and safety of lenvatinib in combination with pembrolizumab in patients with advanced endometrial cancer. *JCO* (2019) 37(15_suppl):TPS5607–TPS5607. doi: 10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.TPS5607
 88. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* (2019) 380:1116–27. doi: 10.1056/NEJMoa1816714
 89. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, et al. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New Engl J Med* (2019) 380:1103–15. doi: 10.1056/NEJMoa1816047
 90. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* (2008) 8:592. doi: 10.1038/nrc2442
 91. Kopetz S, Hoff PM, Morris JS, Wolff RA, Eng C, Glover KY, et al. Phase II Trial of Infusional Fluorouracil, Irinotecan, and Bevacizumab for Metastatic Colorectal Cancer: Efficacy and Circulating Angiogenic Biomarkers Associated With Therapeutic Resistance. *J Clin Oncol* (2010) 28:453. doi: 10.1200/JCO.2009.24.8252
 92. Itatani Y, Kawada K, Yamamoto T, Sakai Y. Resistance to Anti-Angiogenic Therapy in Cancer—Alterations to Anti-VEGF Pathway. *Int J Mol Sci* (2018) 19. doi: 10.3390/ijms19041232
 93. Goede V, Coutelle O, Neuneier J, Reinacher-Schick A, Schnell R, Koslowsky TC, et al. Identification of serum angiopoietin-2 as a biomarker for clinical outcome of colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing therapy. *Br J Cancer* (2010) 103:1407–14. doi: 10.1038/sj.bjc.6605925
 94. Schmittnaegel M, Rigamonti N, Kadioglu E, Cassarà A, Wyser Rmili C, Kiialainen A, et al. Dual angiopoietin-2 and VEGFA inhibition elicits antitumor immunity that is enhanced by PD-1 checkpoint blockade. *Sci Transl Med* (2017) 9:eaak9670. doi: 10.1126/scitranslmed.aak9670
 95. Fukumura D, Kloepper J, Amoozgar Z, Duda DG, Jain RK. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. *Nat Rev Clin Oncol* (2018) 15:325–40. doi: 10.1038/nrclinonc.2018.29

Conflict of Interest: MT reports personal fees from Roche and Gilead and research grant from Sanofi outside the submitted work.

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

Copyright © 2021 Bourhis, Palle, Galy-Fauroux and Terme. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

BIBLIOGRAPHIE

1. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* July 2015;1(4):505–527.
2. Charvat H, Sasazuki S, Inoue M, Iwasaki M, Sawada N, Shimazu T, et al. Prediction of the 10-year probability of gastric cancer occurrence in the Japanese population: the JPHC study cohort II. *Int J Cancer.* January 15, 2016;138(2):320–331.
3. Chen W, Zheng R, Baade PD, Zhang S, Zeng H, Bray F, et al. Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin.* April 2016;66(2):115–132.
4. Helicobacter and Cancer Collaborative Group. Gastric cancer and Helicobacter pylori: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut.* September 2001;49(3):347–353.
5. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature.* March 26, 1998;392(6674):402–405.
6. Hoyo C, Cook MB, Kamangar F, Freedman ND, Whiteman DC, Bernstein L, et al. Body mass index in relation to oesophageal and oesophagogastric junction adenocarcinomas: a pooled analysis from the International BEACON Consortium. *Int J Epidemiol.* December 2012;41(6):1706–1718.
7. Ye W, Chow WH, Lagergren J, Yin L, Nyrén O. Risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia in patients with gastroesophageal reflux diseases and after antireflux surgery. *Gastroenterology.* December 2001;121(6):1286–1293.
8. Kim MA, Lee HS, Yang H-K, Kim WH. Clinicopathologic and protein expression differences between cardia carcinoma and noncardia carcinoma of the stomach. *Cancer.* April 1, 2005;103(7):1439–1446.
9. Riihimäki M, Hemminki A, Sundquist K, Sundquist J, Hemminki K. Metastatic spread in patients with gastric cancer. *Oncotarget.* August 9, 2016;7(32):52307–52316.
10. López-Carrillo L, Vega-Ramos B, Costa-Dias R, Rascón-Pacheco RA. Histological types of gastric cancer in Mexico. *Int J Epidemiol.* December 1997;26(6):1166–1171.
11. Kwon K-J, Shim K-N, Song E-M, Choi J-Y, Kim S-E, Jung H-K, et al. Clinicopathological characteristics and prognosis of signet ring cell carcinoma of the stomach. *Gastric Cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Jpn Gastric Cancer Assoc.* January 2014;17(1):43–53.
12. Piessen G, Messenger M, Leteurtre E, Jean-Pierre T, Mariette C. Signet ring cell histology is an independent predictor of poor prognosis in gastric adenocarcinoma regardless of tumoral clinical presentation. *Ann Surg.* December 2009;250(6):878–887.
13. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* September 11, 2014;513(7517):202–209.

14. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, Kim K-M, Ting JC, Wong SS, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med*. May 2015;21(5):449–456.
15. Chapelle N, Bouvier A-M, Manfredi S, Drouillard A, Lepage C, Faivre J, et al. Early Gastric Cancer: Trends in Incidence, Management, and Survival in a Well-Defined French Population. *Ann Surg Oncol*. October 1, 2016;23(11):3677–3683.
16. Al-Batran S-E, Homann N, Pauligk C, Goetze TO, Meiler J, Kasper S, et al. Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial. *The Lancet*. May 11, 2019;393(10184):1948–1957.
17. Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature*. May 21, 1987;327(6119):239–242.
18. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature*. November 23, 1989;342(6248):440–443.
19. Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, et al. Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J*. December 1992;11(13):4825–4833.
20. Kirchhofer D, Yao X, Peek M, Eigenbrot C, Lipari MT, Billeci KL, et al. Structural and Functional Basis of the Serine Protease-like Hepatocyte Growth Factor β -Chain in Met Binding and Signaling*. *J Biol Chem*. September 17, 2004;279(38):39915–39924.
21. Miyazawa K, Tsubouchi H, Naka D, Takahashi K, Okigaki M, Arakaki N, et al. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. September 15, 1989;163(2):967–973.
22. Zarnegar R, Michalopoulos G. Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, a polypeptide growth factor for hepatocytes. *Cancer Res*. June 15, 1989;49(12):3314–3320.
23. Gak E, Taylor WG, Chan AM, Rubin JS. Processing of hepatocyte growth factor to the heterodimeric form is required for biological activity. *FEBS Lett*. October 12, 1992;311(1):17–21.
24. Naka D, Ishii T, Yoshiyama Y, Miyazawa K, Hara H, Hishida T, et al. Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of a single chain form to a heterodimer. *J Biol Chem*. October 5, 1992;267(28):20114–20119.
25. Kawaguchi M, Kataoka H. Mechanisms of Hepatocyte Growth Factor Activation in Cancer Tissues. *Cancers*. September 29, 2014;6(4):1890–1904.
26. Chan AM-L, Rubin JS, Bottaro DP, Hirschfield DW, Chedid M, Aaronson SA. Identification of a Competitive HGF Antagonist Encoded by an Alternative Transcript. *Science*.

November 29, 1991 [cited February 25, 2022]; Available at: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1720571>

27. Cioco V, Csaky KG, Chan AM-L, Bottaro DP, Taylor WG, Jensen R, et al. Hepatocyte Growth Factor (HGF)/NK1 Is a Naturally Occurring HGF/Scatter Factor Variant with Partial Agonist/Antagonist Activity*. *J Biol Chem.* mai 1996;271(22):13110–13115.
28. Jakubczak JL, Larochelle WJ, Merlino G. NK1, a Natural Splice Variant of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor, Is a Partial Agonist In Vivo. *Mol Cell Biol.* March 1998;18(3):1275–1283.
29. Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, et al. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature.* September 1984;311(5981):29–33.
30. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, Vande Woude GF, et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science.* February 15, 1991;251(4995):802–804.
31. Gherardi E, Sandin S, Petoukhov MV, Finch J, Youles ME, Öfverstedt L-G, et al. Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. *Proc Natl Acad Sci.* March 14, 2006;103(11):4046–4051.
32. Fixman ED, Fournier TM, Kamikura DM, Naujokas MA, Park M. Pathways Downstream of Shc and Grb2 Are Required for Cell Transformation by the Tpr-Met Oncoprotein*. *J Biol Chem.* mai 1996;271(22):13116–13122.
33. Zhang Y-W, Wang L-M, Jove R, Vande Woude GF. Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis. *Oncogene.* January 2002;21(2):217–226.
34. Sipeki S, Bander E, Buday L, Farkas G, Bácsy E, Ways DK, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase Contributes to Erk1/Erk2 MAP Kinase Activation Associated with Hepatocyte Growth Factor-induced Cell Scattering. *Cell Signal.* décembre 1999;11(12):885–890.
35. Lock LS, Royal I, Naujokas MA, Park M. Identification of an Atypical Grb2 Carboxyl-terminal SH3 Domain Binding Site in Gab Docking Proteins Reveals Grb2-dependent and -independent Recruitment of Gab1 to Receptor Tyrosine Kinases*. *J Biol Chem.* October 6, 2000;275(40):31536–31545.
36. Schaeper U, Gehring NH, Fuchs KP, Sachs M, Kempkes B, Birchmeier W. Coupling of Gab1 to C-Met, Grb2, and Shp2 Mediates Biological Responses. *J Cell Biol.* June 26, 2000;149(7):1419–1432.
37. Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP, Herrlich P, Ponta H. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev.* December 1, 2002;16(23):3074–3086.
38. Orian-Rousseau V, Morrison H, Matzke A, Kastilan T, Pace G, Herrlich P, et al. Hepatocyte Growth Factor-induced Ras Activation Requires ERM Proteins Linked to Both CD44v6 and F-Actin. *Mol Biol Cell.* January 2007;18(1):76–83.

39. Bertotti A, Comoglio PM, Trusolino L. β 4 integrin activates a Shp2–Src signaling pathway that sustains HGF-induced anchorage-independent growth. *J Cell Biol.* December 18, 2006;175(6):993–1003.
40. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. A Signaling Adapter Function for α 6 β 4 Integrin in the Control of HGF-Dependent Invasive Growth. *Cell.* November 30, 2001;107(5):643–654.
41. Hammond DE, Carter S, Clague MJ. Met Receptor Dynamics and Signalling. In Madhus IH (ed): *Signalling from Internalized Growth Factor Receptors* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2004; 21–44. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-540-69494-6_2
42. Carter S, Urbé S, Clague MJ. The Met Receptor Degradation Pathway: REQUIREMENT FOR LYS48-LINKED POLYUBIQUITIN INDEPENDENT OF PROTEASOME ACTIVITY*. *J Biol Chem.* décembre 2004;279(51):52835–52839.
43. Hammond DE, Urbé S, Vande Woude GF, Clague MJ. Down-regulation of MET, the receptor for hepatocyte growth factor. *Oncogene.* May 2001;20(22):2761–2770.
44. Nath D, Williamson NJ, Jarvis R, Murphy G. Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase. *J Cell Sci.* March 15, 2001;114(6):1213–1220.
45. Foveau B, Ancot F, Leroy C, Petrelli A, Reiss K, Vingtheux V, et al. Down-Regulation of the Met Receptor Tyrosine Kinase by Presenilin-dependent Regulated Intramembrane Proteolysis. *Mol Biol Cell.* May 1, 2009;20(9):2495–2507.
46. Michieli P, Mazzone M, Basilico C, Cavassa S, Sottile A, Naldini L, et al. Targeting the tumor and its microenvironment by a dual-function decoy Met receptor. *Cancer Cell.* juillet 2004;6(1):61–73.
47. Identification of functional domains in the hepatocyte growth factor and its receptor by molecular engineering. *J Biotechnol.* September 30, 1994;37(2):109–122.
48. Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature.* August 1995;376(6543):768–771.
49. Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, et al. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature.* February 1995;373(6516):702–705.
50. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature.* February 1995;373(6516):699–702.
51. Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *J Cell Biol.* July 2, 1996;134(2):559–572.

52. Schmits R, Filmus J, Gerwin N, Senaldi G, Kiefer F, Kundig T, et al. CD44 Regulates Hematopoietic Progenitor Distribution, Granuloma Formation, and Tumorigenicity. *Blood*. September 15, 1997;90(6):2217–2233.
53. Sachs M, Brohmann H, Zechner D, Müller T, Hülsken J, Walther I, et al. Essential Role of Gab1 for Signaling by the C-Met Receptor in Vivo. *J Cell Biol*. September 18, 2000;150(6):1375–1384.
54. Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol*. October 1, 1993;123(1):223–235.
55. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell*. November 29, 1991;67(5):901–908.
56. Soriano JV, Pepper MS, Nakamura T, Orci L, Montesano R. Hepatocyte growth factor stimulates extensive development of branching duct-like structures by cloned mammary gland epithelial cells. *J Cell Sci*. February 1, 1995;108(2):413–430.
57. Rosário M, Birchmeier W. How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends Cell Biol*. juin 2003;13(6):328–335.
58. Brand-Saberi B, Müller TS, Wilting J, Christ B, Birchmeier C. Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor (SF/HGF) Induces Emigration of Myogenic Cells at Interlimb Level in Vivo. *Dev Biol*. October 10, 1996;179(1):303–308.
59. Heymann S, Koudrova M, Arnold H-H, Köster M, Braun T. Regulation and Function of SF/HGF during Migration of Limb Muscle Precursor Cells in Chicken. *Dev Biol*. décembre 1996;180(2):566–578.
60. Maina F, Klein R. Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nat Neurosci*. March 1999;2(3):213–217.
61. Ebens A, Brose K, Leonardo ED, Jr MGH, Bladt F, Birchmeier C, et al. Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Is an Axonal Chemoattractant and a Neurotrophic Factor for Spinal Motor Neurons. *Neuron*. décembre 1996;17(6):1157–1172.
62. Ohya W, Funakoshi H, Kurosawa T, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) promotes oligodendrocyte progenitor cell proliferation and inhibits its differentiation during postnatal development in the rat. *Brain Res*. mai 2007;1147:51–65.
63. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver Regeneration. *Science*. April 4, 1997 [cited March 4, 2022]; Available at: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.276.5309.60>
64. Weidner KM, Di Cesare S, Sachs M, Brinkmann V, Behrens J, Birchmeier W. Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature*. November 1996;384(6605):173–176.
65. Takada S, Takahara S, Nishimura K, Ichimaru N, Hongsi J, Kokado Y, et al. Effect of hepatocyte growth factor on tacrolimus-induced nephrotoxicity in spontaneously hypertensive rats. *Transpl Int*. January 1999;12(1):27–32.

66. Mizuno S, Kurosawa T, Matsumoto K, Mizuno-Horikawa Y, Okamoto M, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. *J Clin Invest*. May 1, 1998;101(9):1827–1834.
67. DOHI M, HASEGAWA T, YAMAMOTO K, MARSHALL BC. Hepatocyte Growth Factor Attenuates Collagen Accumulation in a Murine Model of Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. December 14, 2012 [cited March 7, 2022]; Available at: https://www-atsjournals-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1164/ajrccm.162.6.9908097?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed
68. Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature*. May 1987;327(6119):239–242.
69. Stella MC, Comoglio PM. HGF: a multifunctional growth factor controlling cell scattering. *Int J Biochem Cell Biol*. décembre 1999;31(12):1357–1362.
70. Potempa S, Ridley AJ. Activation of Both MAP Kinase and Phosphatidylinositide 3-Kinase by Ras Is Required for Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor–induced Adherens Junction Disassembly. *Mol Biol Cell*. August 1998;9(8):2185–2200.
71. The motility signal of scatter factor/hepatocyte growth factor mediated through the receptor tyrosine kinase met requires intracellular action of Ras. *J Biol Chem*. September 2, 1994;269(35):21936–21939.
72. Paumelle R, Tulashe D, Kherrouche Z, Plaza S, Leroy C, Reveneau S, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene*. April 2002;21(15):2309–2319.
73. Kosai K, Matsumoto K, Nagata S, Tsujimoto Y, Nakamura T. Abrogation of Fas-Induced Fulminant Hepatic Failure in Mice by Hepatocyte Growth Factor. *Biochem Biophys Res Commun*. March 27, 1998;244(3):683–690.
74. Kosai K, Matsumoto K, Funakoshi H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice. *Hepatology*. 1999;30(1):151–159.
75. Motoi S, Toyoda H, Obara T, Ohta E, Arita Y, Negishi K, et al. Anti-Apoptotic Effects of Recombinant Human Hepatocyte Growth Factor on Hepatocytes Were Associated with Intrahepatic Hemorrhage Suppression Indicated by the Preservation of Prothrombin Time. *Int J Mol Sci*. April 12, 2019;20(8). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6514566/>
76. Yamasaki N, Nagano T, Mori-Kudo I, Tsuchida A, Kawamura T, Seki H, et al. Hepatocyte Growth Factor Protects Functional and Histological Disorders of HgCl₂-Induced Acute Renal Failure Mice. *Nephron*. 2002;90(2):195–205.
77. Makiuchi A, Yamaura K, Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T, Amano J, et al. Hepatocyte Growth Factor Prevents Pulmonary Ischemia–Reperfusion Injury in Mice. *J Heart Lung Transplant*. September 1, 2007;26(9):935–943.

78. Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J Clin Invest*. December 15, 2000;106(12):1511–1519.
79. Shang J, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Zhang H, Morimoto N, et al. Antiapoptotic and antiautophagic effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and hepatocyte growth factor after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Res*. 2010;88(10):2197–2206.
80. Machida S, Tanaka M, Ishii T, Ohtaka K, Takahashi T, Tazawa Y. Neuroprotective Effect of Hepatocyte Growth Factor against Photoreceptor Degeneration in Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. November 1, 2004;45(11):4174–4182.
81. Xiao G-H, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsuuchi Y, Vande Woude GF, Testa JR. Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. January 2, 2001;98(1):247–252.
82. Fan S, Ma YX, Gao M, Yuan R-Q, Meng Q, Goldberg ID, et al. The Multisubstrate Adapter Gab1 Regulates Hepatocyte Growth Factor (Scatter Factor)–c-Met Signaling for Cell Survival and DNA Repair. *Mol Cell Biol*. August 2001;21(15):4968–4984.
83. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver Regeneration. *Science*. April 4, 1997 [cited March 7, 2022]; Available at: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.276.5309.60>
84. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: Renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int*. juin 2001;59(6):2023–2038.
85. Borowiak M, Garratt AN, Wüstefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. July 20, 2004;101(29):10608–10613.
86. Jayasankar V, Woo YJ, Pirolli TJ, Bish LT, Berry MF, Burdick J, et al. Induction of Angiogenesis and Inhibition of Apoptosis by Hepatocyte Growth Factor Effectively Treats Postischemic Heart Failure. *J Card Surg*. 2005;20(1):93–101.
87. Giebeler A, Boekschoten MV, Klein C, Borowiak M, Birchmeier C, Gassler N, et al. c-Met Confers Protection Against Chronic Liver Tissue Damage and Fibrosis Progression After Bile Duct Ligation in Mice. *Gastroenterology*. juillet 2009;137(1):297–308.e4.
88. Ma H, Saenko M, Opuko A, Togawa A, Soda K, Marlier A, et al. Deletion of the Met receptor in the collecting duct decreases renal repair following ureteral obstruction. *Kidney Int*. October 2, 2009;76(8):868–876.
89. Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, Stradal T, Munz B, Werner S, et al. c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol*. April 9, 2007;177(1):151–162.
90. Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Int*. avril 2001;59(4):1304–1314.

91. Yamaura K, Ito K, Tsukioka K, Wada Y, Makiuchi A, Sakaguchi M, et al. Suppression of Acute and Chronic Rejection by Hepatocyte Growth Factor in a Murine Model of Cardiac Transplantation. *Circulation*. September 21, 2004 [cited March 8, 2022]; Available at: <https://www-ahajournals-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/abs/10.1161/01.CIR.0000143052.45956.71>
92. Nakamura T, Matsumoto K, Mizuno S, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents tissue fibrosis, remodeling, and dysfunction in cardiomyopathic hamster hearts. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. May 2005;288(5):H2131–H2139.
93. Taniyama Y, Morishita R, Nakagami H, Moriguchi A, Sakonjo H, Shokei-Kim, et al. Potential Contribution of a Novel Antifibrotic Factor, Hepatocyte Growth Factor, to Prevention of Myocardial Fibrosis by Angiotensin II Blockade in Cardiomyopathic Hamsters. *Circulation*. July 11, 2000 [cited March 8, 2022]; Available at: <https://www-ahajournals-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/abs/10.1161/01.cir.102.2.246>
94. Schoedel KE, Tyner VZ, Kim T-H, Michalopoulos GK, Mars WM. HGF, MET, and Matrix-Related Proteases in Hepatocellular Carcinoma, Fibrolamellar Variant, Cirrhotic and Normal Liver. *Mod Pathol*. January 2003;16(1):14–21.
95. Mizuno S, Matsumoto K, Li M-Y, Nakamura T. HGF reduces advancing lung fibrosis in mice: a potential role for MMP-dependent myofibroblast apoptosis. *FASEB J*. 2005;19(6):1–18.
96. Wang R, Ferrell LD, Faouzi S, Maher JJ, Bishop JM. Activation of the Met Receptor by Cell Attachment Induces and Sustains Hepatocellular Carcinomas in Transgenic Mice. *J Cell Biol*. May 28, 2001;153(5):1023–1034.
97. Takayama H, LaRochelle WJ, Sharp R, Otsuka T, Kriebel P, Anver M, et al. Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. January 21, 1997;94(2):701–706.
98. A B, Q C, Mc D, Gk M, R Z. The five amino acid-deleted isoform of hepatocyte growth factor promotes carcinogenesis in transgenic mice. *Oncogene*. January 28, 1999 [cited January 24, 2023];18(4). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10023664/>
99. Mf DR, M O, A G, H P, E C, L M, et al. Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. February 1995 [cited January 31, 2023];1(2). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9815967/>
100. Yao J, Li X, Yan L, He S, Zheng J, Wang X, et al. Role of HGF/c-Met in the treatment of colorectal cancer with liver metastasis. *J Biochem Mol Toxicol*. June 2019;33(6). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6617765/>
101. Zhang Y, Gao X, Zhu Y, Kadel D, Sun H, Chen J, et al. The dual blockade of MET and VEGFR2 signaling demonstrates pronounced inhibition on tumor growth and metastasis of hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res CR*. April 30, 2018;37. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5925844/>

102. Ciccarese C, Brunelli M, Montironi R, Fiorentino M, Iacovelli R, Heng D, et al. The prospect of precision therapy for renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev*. September 1, 2016;49:37–44.
103. Silva Paiva R, Gomes I, Casimiro S, Fernandes I, Costa L. c-Met expression in renal cell carcinoma with bone metastases. *J Bone Oncol*. September 16, 2020;25. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7527574/>
104. Scarpino S, d'Alena FC, Napoli AD, Pasquini A, Marzullo A, Ruco LP. Increased expression of Met protein is associated with up-regulation of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) in tumour cells in papillary carcinoma of the thyroid. *J Pathol*. 2004;202(3):352–358.
105. Toiyama Y, Yasuda H, Saigusa S, Matushita K, Fujikawa H, Tanaka K, et al. Co-expression of hepatocyte growth factor and c-Met predicts peritoneal dissemination established by autocrine hepatocyte growth factor/c-Met signaling in gastric cancer. *Int J Cancer*. 2012;130(12):2912–2921.
106. Wang X, Chen X, Fang J, Yang C. Lentivirus-mediated RNA silencing of c-Met markedly suppresses peritoneal dissemination of gastric cancer in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol Sin*. April 2012;33(4):513–522.
107. Koh SA, Lee KH. Function of hepatocyte growth factor in gastric cancer proliferation and invasion. *Yeungnam Univ J Med*. February 20, 2020;37(2):73–78.
108. Cheng Y, Song Y, Qu J, Che X, Song N, Fan Y, et al. The Chemokine Receptor CXCR4 and c-MET Cooperatively Promote Epithelial-Mesenchymal Transition in Gastric Cancer Cells. *Transl Oncol*. February 27, 2018;11(2):487–497.
109. Hao N-B, Tang B, Wang G-Z, Xie R, Hu C-J, Wang S-M, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) upregulates heparanase expression via the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway for gastric cancer metastasis. *Cancer Lett*. mai 2015;361(1):57–66.
110. Boroughs LK, DeBerardinis RJ. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol*. April 2015;17(4):351–359.
111. Huang X, Gan G, Wang X, Xu T, Xie W. The HGF-MET axis coordinates liver cancer metabolism and autophagy for chemotherapeutic resistance. *Autophagy*. February 20, 2019;15(7):1258–1279.
112. Yan B, Jiang Z, Cheng L, Chen K, Zhou C, Sun L, et al. Paracrine HGF/c-MET enhances the stem cell-like potential and glycolysis of pancreatic cancer cells via activation of YAP/HIF-1 α . *Exp Cell Res*. October 1, 2018;371(1):63–71.
113. Zhang Y, Nguyen TTT, Shang E, Mela A, Humala N, Mahajan A, et al. MET Inhibition Elicits PGC1 α -Dependent Metabolic Reprogramming in Glioblastoma. *Cancer Res*. January 1, 2020;80(1):30–43.
114. Nassar D, Blanpain C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. mai 2016;11(1):47–76.

115. Flores-Téllez TN, Villa-Treviño S, Piña-Vázquez C. Road to stemness in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. October 7, 2017;23(37):6750–6776.
116. Dang H, Steinway SN, Ding W, Rountree CB. Induction of tumor initiation is dependent on CD44s in c-Met+ hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. March 21, 2015;15. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4380258/>
117. Rosen EM, Goldberg ID. Scatter Factor and Angiogenesis. In Vande Woude GF, Klein G (eds): *Advances in Cancer Research* Academic Press 1995; 257–279. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065230X08607150>
118. Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL, et al. Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. March 1, 1993;90(5):1937–1941.
119. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol*. November 1, 1992;119(3):629–641.
120. Abounader R, Laterra J. Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumor growth and angiogenesis. *Neuro-Oncol*. October 2005;7(4):436–451.
121. Zhang Y-W, Su Y, Volpert OV, Woude GFV. Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. October 28, 2003;100(22):12718–12723.
122. G D, Z C, Zy L, Nt Y, Cc B, C VW. Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma [Internet]. *Cancer research*. 2001 [cited March 17, 2023]. Available at: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.ezproxy.u-paris.fr/11479233/>
123. Kaga T, Kawano H, Sakaguchi M, Nakazawa T, Taniyama Y, Morishita R. Hepatocyte growth factor stimulated angiogenesis without inflammation: Differential actions between hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Vascul Pharmacol*. août 2012;57(1):3–9.
124. Gerritsen ME, Tomlinson JE, Zlot C, Ziman M, Hwang S. Using gene expression profiling to identify the molecular basis of the synergistic actions of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Br J Pharmacol*. October 2003;140(4):595–610.
125. Shojaei F, Lee JH, Simmons BH, Wong A, Esparza CO, Plumlee PA, et al. HGF/c-Met Acts as an Alternative Angiogenic Pathway in Sunitinib-Resistant Tumors. *Cancer Res*. December 15, 2010;70(24):10090–10100.
126. Shojaei F, Simmons BH, Lee JH, Lappin PB, Christensen JG. HGF/c-Met pathway is one of the mediators of sunitinib-induced tumor cell type-dependent metastasis. *Cancer Lett*. juillet 2012;320(1):48–55.

127. Mahdi A, Darvishi B, Majidzadeh-A K, Salehi M, Farahmand L. Challenges facing antiangiogenesis therapy: The significant role of hypoxia-inducible factor and MET in development of resistance to anti-vascular endothelial growth factor-targeted therapies. *J Cell Physiol.* 2019;234(5):5655–5663.
128. Okuda T, Tasaki T, Nakata S, Yamashita K, Yoshioka H, Izumoto S, et al. Efficacy of Combination Therapy with MET and VEGF Inhibitors for MET-overexpressing Glioblastoma. *Anticancer Res.* July 1, 2017;37(7):3871–3876.
129. Kasai S, Kuwayama N, Motoo Y, Kawashima A, Matsumoto K, Yano S, et al. Dual blockade of MET and VEGFR2 signaling pathways as a potential therapeutic maneuver for peritoneal carcinomatosis in scirrhous gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* avril 2022;600:80–86.
130. Ciamporcero E, Miles KM, Adelaiye R, Ramakrishnan S, Shen L, Ku SY, et al. Combination strategy targeting VEGF and HGF/c-met in human renal cell carcinoma models. *Mol Cancer Ther.* January 2015;14(1):101–110.
131. Van Adelsberg J, Sehgal S, Kukes A, Brady C, Barasch J, Yang J, et al. Activation of hepatocyte growth factor (HGF) by endogenous HGF activator is required for metanephric kidney morphogenesis in vitro. *J Biol Chem.* May 4, 2001;276(18):15099–15106.
132. Hayashi T, Abe K, Sakurai M, Itoyama Y. Inductions of hepatocyte growth factor and its activator in rat brain with permanent middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* July 20, 1998;799(2):311–316.
133. Itoh H, Kataoka H. Roles of hepatocyte growth factor activator (HGFA) and its inhibitor HAI-1 in the regeneration of injured gastrointestinal mucosa. *J Gastroenterol.* November 2002;37 Suppl 14:15–21.
134. Nierodzik ML, Karpatkin S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell.* November 2006;10(5):355–362.
135. Mukai S, Fukushima T, Naka D, Tanaka H, Osada Y, Kataoka H. Activation of hepatocyte growth factor activator zymogen (pro-HGFA) by human kallikrein 1-related peptidases. *FEBS J.* March 2008;275(5):1003–1017.
136. Moriyama T, Kataoka H, Tsubouchi H, Koono M. Concomitant expression of hepatocyte growth factor (HGF), HGF activator and c-met genes in human glioma cells in vitro. *FEBS Lett.* September 18, 1995;372(1):78–82.
137. Parr C, Jiang WG. Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor, its activator, inhibitors and the c-Met receptor in human cancer cells. *Int J Oncol.* October 1, 2001;19(4):857–863.
138. Tjin EPM, Groen RWJ, Vogelzang I, Derksen PWB, Klok MD, Meijer HP, et al. Functional analysis of HGF/MET signaling and aberrant HGF-activator expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* January 15, 2006;107(2):760–768.

139. Wader KF, Fagerli UM, Holt RU, Stordal B, Børset M, Sundan A, et al. Elevated serum concentrations of activated hepatocyte growth factor activator in patients with multiple myeloma. *Eur J Haematol*. November 2008;81(5):380–383.
140. Nagakawa O, Yamagishi T, Fujiuchi Y, Junicho A, Akashi T, Nagaike K, et al. Serum Hepatocyte Growth Factor Activator (HGFA) in Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer. *Eur Urol*. October 1, 2005;48(4):686–690.
141. Tjin EPM, Derksen PWB, Kataoka H, Spaargaren M, Pals ST. Multiple myeloma cells catalyze hepatocyte growth factor (HGF) activation by secreting the serine protease HGF-activator. *Blood*. October 1, 2004;104(7):2172–2175.
142. Kitajima Y, Ide T, Ohtsuka T, Miyazaki K. Induction of hepatocyte growth factor activator gene expression under hypoxia activates the hepatocyte growth factor/c-Met system via hypoxia inducible factor-1 in pancreatic cancer. *Cancer Sci*. 2008;99(7):1341–1347.
143. Kataoka H, Suganuma T, Shimomura T, Itoh H, Kitamura N, Nabeshima K, et al. Distribution of Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor Type 1 (HAI-1) in Human Tissues: Cellular Surface Localization of HAI-1 in Simple Columnar Epithelium and Its Modulated Expression in Injured and Regenerative Tissues. *J Histochem Cytochem*. mai 1999;47(5):673–682.
144. Oberst MD, Johnson MD, Dickson RB, Lin C-Y, Singh B, Stewart M, et al. Expression of the Serine Protease Matriptase and Its Inhibitor HAI-1 in Epithelial Ovarian Cancer Correlation with Clinical Outcome and Tumor Clinicopathological Parameters. *Clin Cancer Res*. April 1, 2002;8(4):1101–1107.
145. Kang JY, Dolled-Filhart M, Ocal IT, Singh B, Lin C-Y, Dickson RB, et al. Tissue Microarray Analysis of Hepatocyte Growth Factor/Met Pathway Components Reveals a Role for Met, Matriptase, and Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor 1 in the Progression of Node-negative Breast Cancer. *Cancer Res*. March 1, 2003;63(5):1101–1105.
146. Cheng H, Fukushima T, Takahashi N, Tanaka H, Kataoka H. Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor Type 1 Regulates Epithelial to Mesenchymal Transition through Membrane-Bound Serine Proteinases. *Cancer Res*. March 1, 2009;69(5):1828–1835.
147. Tomioka D, Maehara N, Kuba K, Mizumoto K, Tanaka M, Matsumoto K, et al. Inhibition of Growth, Invasion, and Metastasis of Human Pancreatic Carcinoma Cells by NK4 in an Orthotopic Mouse Model. *Cancer Res*. October 15, 2001;61(20):7518–7524.
148. Parr C, Jiang WG. Hepatocyte growth factor activation inhibitors (HAI-1 and HAI-2) regulate HGF-induced invasion of human breast cancer cells. *Int J Cancer*. 2006;119(5):1176–1183.
149. Yamauchi Masamichi, Kataoka Hiroaki, Itoh Hiroshi, Seguchi Tomoko, Hasui Yoshihiro, Osada Yukio. Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor Types 1 and 2 are Expressed by Tubular Epithelium in Kidney and Down-regulated in Renal Cell Carcinoma. *J Urol*. février 2004;171(2):890–896.

150. Dong W, Chen X, Xie J, Sun P, Wu Y. Epigenetic inactivation and tumor suppressor activity of HAI-2/SPINT2 in gastric cancer. *Int J Cancer*. 2010;127(7):1526–1534.
151. Yue D, Fan Q, Chen X, Li F, Wang L, Huang L, et al. Epigenetic inactivation of SPINT2 is associated with tumor suppressive function in esophageal squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res*. March 10, 2014;322(1):149–158.
152. Bergum C, List K. Loss of the matriptase inhibitor HAI-2 during prostate cancer progression. *The Prostate*. 2010;70(13):1422–1428.
153. Weng J, Mohan RR, Li Q, Wilson SE. IL-1 upregulates keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor mRNA and protein production by cultured stromal fibroblast cells: interleukin-1 beta expression in the cornea. *Cornea*. July 1997;16(4):465–471.
154. Gohda E, Matsunaga T, Kataoka H, Takebe T, Yamamoto I. Induction of hepatocyte growth factor in human skin fibroblasts by epidermal growth factor, platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor. *Cytokine*. November 1994;6(6):633–640.
155. Nandi B, Valle JPD, Samur MK, Gibbons AJ, Prabhala RH, Munshi NC, et al. CCL20 induces colorectal cancer neoplastic epithelial cell proliferation, migration, and further CCL20 production through autocrine HGF-c-Met and MSP-MSPR signaling pathways. *Oncotarget*. November 23, 2021;12(24):2323–2337.
156. T N, N K, H S, Y F, M O, T M, et al. gamma-Carboxyglutamic acid content of hepatocellular carcinoma-associated des-gamma-carboxy prothrombin. *Biochim Biophys Acta*. April 24, 2002 [cited January 24, 2023];1586(3). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11997080/>
157. Mf Y, Cl L. Serological markers of liver cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. February 2005 [cited January 24, 2023];19(1). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15757806/>
158. Ha L, Bc F, Mj T, Ra B, Kj L, Sd L, et al. Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. May 31, 1984 [cited January 24, 2023];310(22). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6201741/>
159. M S, Y Y, T H, H H, T U, S A, et al. The role of des-gamma-carboxy prothrombin levels in hepatocellular carcinoma and liver tissues. *Cancer Lett*. October 16, 2000 [cited January 24, 2023];159(1). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10974410/>
160. Ando E, Oriishi T, Toyonaga A, Tobaru T, Tanaka M, Shimamura R, et al. Alpha-fetoprotein- and des-gamma-carboxy prothrombin-producing advanced gastric cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. June 2002;14(6):687–691.
161. M G, T N, T M, Y M, M S, R T, et al. Prediction of invasive activities in hepatocellular carcinomas with special reference to alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxyprothrombin. *Jpn J Clin Oncol*. October 2003 [cited January 24, 2023];33(10). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14623921/>

162. P Y, Zh G, X X, Sx C, Cr Z, Y Y, et al. Des- γ -carboxyl prothrombin induces matrix metalloproteinase activity in hepatocellular carcinoma cells by involving the ERK1/2 MAPK signalling pathway. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. May 2011 [cited January 24, 2023];47(7). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21349701/>
163. J G, X F, Y I, P S, N K, K H, et al. Des- γ -carboxy prothrombin and c-Met were concurrently and extensively expressed in hepatocellular carcinoma and associated with tumor recurrence. *Biosci Trends*. August 2012 [cited January 24, 2023];6(4). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23006961/>
164. Chang K, Karnad A, Zhao S, Freeman JW. Roles of c-Met and RON kinases in tumor progression and their potential as therapeutic targets. *Oncotarget*. February 28, 2015;6(6):3507–3518.
165. Hara S, Nakashiro K, Klosek SK, Ishikawa T, Shintani S, Hamakawa H. Hypoxia enhances c-Met/HGF receptor expression and signaling by activating HIF-1 α in human salivary gland cancer cells. *Oral Oncol*. juillet 2006;42(6):593–598.
166. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell*. April 2003;3(4):347–361.
167. Gambarotta G, Boccaccio C, Giordano S, Andö M, Stella MC, Comoglio PM. Ets up-regulates MET transcription. *Oncogene*. November 7, 1996;13(9):1911–1917.
168. Giglio S, Vecchione A. c-Met and miRs in Cancer. *Biomedicines*. January 5, 2015;3(1):32–44.
169. Park C-K, Oh I-J, Choi Y-D, Jang T-W, Lee J-E, Ryu J-S, et al. A Prospective Observational Study Evaluating the Correlation of c-MET Expression and EGFR Gene Mutation with Response to Erlotinib as Second-Line Treatment for Patients with Advanced/Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *Oncology*. 2018;94(6):373–382.
170. Catenacci DVT, Ang A, Liao W-L, Shen J, O'Day E, Loberg RD, et al. MET tyrosine kinase receptor expression and amplification as prognostic biomarkers of survival in gastroesophageal adenocarcinoma. *Cancer*. May 15, 2017;123(6):1061–1070.
171. Kim HS, Chon HJ, Kim H, Shin S-J, Wacheck V, Gruver AM, et al. MET in gastric cancer with liver metastasis: The relationship between MET amplification and Met overexpression in primary stomach tumors and liver metastasis. *J Surg Oncol*. June 2018;117(8):1679–1686.
172. Ho-Yen CM, Jones JL, Kermorgant S. The clinical and functional significance of c-Met in breast cancer: a review. *Breast Cancer Res BCR*. April 8, 2015;17(1):52.
173. Schiefer A-I, Mesteri I, Berghoff AS, Haitel A, Schmidinger M, Preusser M, et al. Evaluation of tyrosine kinase receptors in brain metastases of clear cell renal cell carcinoma reveals cMet as a negative prognostic factor. *Histopathology*. December 2015;67(6):799–805.
174. Shi J, Yao D, Liu W, Wang N, Lv H, He N, et al. Frequent gene amplification predicts poor prognosis in gastric cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(4):4714–4726.

175. Heist RS, Shim HS, Gingipally S, Mino-Kenudson M, Le L, Gainor JF, et al. MET Exon 14 Skipping in Non-Small Cell Lung Cancer. *The Oncologist*. April 2016;21(4):481–486.
176. Kim EK, Kim KA, Lee CY, Kim S, Chang S, Cho BC, et al. Molecular Diagnostic Assays and Clinicopathologic Implications of MET Exon 14 Skipping Mutation in Non-small-cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. January 2019;20(1):e123–e132.
177. Tovar EA, Graveel CR. MET in human cancer: germline and somatic mutations. *Ann Transl Med*. May 2017;5(10):205.
178. Fu J, Su X, Li Z, Deng L, Liu X, Feng X, et al. HGF/c-MET pathway in cancer: from molecular characterization to clinical evidence. *Oncogene*. July 2021;40(28):4625–4651.
179. Gupta A, Karakiewicz PI, Roehrborn CG, Lotan Y, Zlotta AR, Shariat SF. Predictive Value of Plasma Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Levels in Patients with Clinically Localized Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. November 15, 2008;14(22):7385–7390.
180. Y T, C M, Y I, Y O, K T, M K. Serum hepatocyte growth factor as a prognostic marker for stage II or III colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. October 1, 2009 [cited January 24, 2023];125(7). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19569242/>
181. Taniguchi T, Kitamura M, Arai K, Iwasaki Y, Yamamoto Y, Igari A, et al. Increase in the circulating level of hepatocyte growth factor in gastric cancer patients. *Br J Cancer*. 1997;75(5):673–677.
182. K T, C M, R W, M K, H T, M K. Circulating level of hepatocyte growth factor as a useful tumor marker in patients with early-stage gastric carcinoma. *Scand J Gastroenterol*. August 2004 [cited March 13, 2023];39(8). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15513361/>
183. Park DJ, Yoon C, Thomas N, Ku GY, Janjigian YY, Kelsen DP, et al. Prognostic Significance of Targetable Angiogenic and Growth Factors in Patients Undergoing Resection for Gastric and Gastroesophageal Junction Cancers. *Ann Surg Oncol*. April 1, 2014;21(4):1130–1137.
184. K B, A U, T M, K N, H N, K M, et al. Elevation of serum hepatocyte growth factor concentration in patients with gastric cancer is mediated by production from tumor tissue. *Anticancer Res*. April 2000 [cited March 13, 2023];20(2B). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10810432/>
185. Lee HE, Kim MA, Lee HS, Jung E-J, Yang H-K, Lee BL, et al. MET in gastric carcinomas: comparison between protein expression and gene copy number and impact on clinical outcome. *Br J Cancer*. July 10, 2012;107(2):325–333.
186. Ha SY, Lee J, Kang SY, Do I-G, Ahn S, Park JO, et al. MET overexpression assessed by new interpretation method predicts gene amplification and poor survival in advanced gastric carcinomas. *Mod Pathol*. December 1, 2013;26(12):1632–1641.
187. Ma J, Ma J, Meng Q, Zhao Z-S, Xu W. Prognostic value and clinical pathology of MACC-1 and c-MET expression in gastric carcinoma. *Pathol Oncol Res POR*. October 2013;19(4):821–832.

188. Yu S, Yu Y, Zhao N, Cui J, Li W, Liu T. c-Met as a Prognostic Marker in Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. November 4, 2013;8(11):e79137.
189. Dulak AM, Stojanov P, Peng S, Lawrence MS, Fox C, Stewart C, et al. Exome and whole genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity. *Nat Genet*. May 2013;45(5):478–486.
190. Lennerz JK, Kwak EL, Ackerman A, Michael M, Fox SB, Bergethon K, et al. MET Amplification Identifies a Small and Aggressive Subgroup of Esophagogastric Adenocarcinoma With Evidence of Responsiveness to Crizotinib. *J Clin Oncol*. December 20, 2011;29(36):4803–4810.
191. Della Corte CM, Fasano M, Papaccio F, Ciardiello F, Morgillo F. Role of HGF–MET Signaling in Primary and Acquired Resistance to Targeted Therapies in Cancer. *Biomedicines*. November 25, 2014;2(4):345–358.
192. Karagonlar ZF, Koc D, Iscan E, Erdal E, Atabey N. Elevated hepatocyte growth factor expression as an autocrine c-Met activation mechanism in acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci*. April 2016;107(4):407.
193. Oo O, C L. Hepatocyte growth factor upregulation promotes carcinogenesis and epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via Akt and COX-2 pathways. *Clin Exp Metastasis*. December 2011 [cited March 13, 2023];28(8). Available at: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.ezproxy.u-paris.fr/21744257/>
194. Cañadas I, Rojo F, Taus Á, Arpí O, Arumí-Uría M, Pijuan L, et al. Targeting Epithelial-to-Mesenchymal Transition with Met Inhibitors Reverts Chemoresistance in Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. February 15, 2014;20(4):938–950.
195. Kim J, Fox C, Peng S, Pusung M, Pectasides E, Matthee E, et al. Preexisting oncogenic events impact trastuzumab sensitivity in ERBB2-amplified gastroesophageal adenocarcinoma. *J Clin Invest*. December 1, 2014;124(12):5145–5158.
196. Chen C-T, Kim H, Liska D, Gao S, Christensen JG, Weiser MR. MET activation mediates resistance to lapatinib inhibition of HER2-amplified gastric cancer cells. *Mol Cancer Ther*. March 2012;11(3):660–669.
197. Liu M. Combination treatment with trastuzumab and crizotinib in metastatic gastric cancer harboring Her-2 amplification and c-MET amplification. *Medicine (Baltimore)*. September 10, 2021;100(36). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8428754/>
198. Apicella M, Giannoni E, Fiore S, Ferrari KJ, Fernández-Pérez D, Isella C, et al. Increased Lactate Secretion by Cancer Cells Sustains Non-cell-autonomous Adaptive Resistance to MET and EGFR Targeted Therapies. *Cell Metab*. décembre 2018;28(6):848–865.e6.
199. Spigel DR, Ervin TJ, Ramlau RA, Daniel DB, Goldschmidt JH, Blumenschein GR, et al. Randomized Phase II Trial of Onartuzumab in Combination With Erlotinib in Patients With Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. November 10, 2013;31(32):4105–4114.

200. Wang J, Goetsch L, Tucker L, Zhang Q, Gonzalez A, Vaidya KS, et al. Anti-c-Met monoclonal antibody ABT-700 breaks oncogene addiction in tumors with MET amplification. *BMC Cancer*. February 16, 2016;16. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4755020/>
201. Finisguerra V, Di Conza G, Di Matteo M, Serneels J, Costa S, Thompson AAR, et al. MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils. *Nature*. June 18, 2015;522(7556):349–353.
202. Gx H, Bb S. Gastric cancer patient with c-MET amplification treated with crizotinib after failed multi-line treatment: A case report and literature review. *Math Biosci Eng MBE*. June 25, 2019 [cited March 14, 2023];16(5). Available at: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.ezproxy.u-paris.fr/31499745/>
203. Van Cutsem E, Karaszewska B, Kang Y-K, Chung HC, Shankaran V, Siena S, et al. A Multicenter Phase II Study of AMG 337 in Patients with MET-Amplified Gastric/Gastroesophageal Junction/Esophageal Adenocarcinoma and Other MET-Amplified Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. April 15, 2019;25(8):2414–2423.
204. Aparicio T, Cozic N, de la Fouchardière C, Meriaux E, Plaza J, Mineur L, et al. The Activity of Crizotinib in Chemo-Refractory MET-Amplified Esophageal and Gastric Adenocarcinomas: Results from the AcSé-Crizotinib Program. *Target Oncol*. 2021;16(3):381–388.
205. Lee J, Kim ST, Kim K, Lee H, Kozarewa I, Mortimer PGS, et al. Tumor Genomic Profiling Guides Patients with Metastatic Gastric Cancer to Targeted Treatment: The VIKTORY Umbrella Trial. *Cancer Discov*. October 1, 2019;9(10):1388–1405.
206. Wang Y, Liu T, Chen G, Gong J, Bai Y, Zhang T, et al. Phase Ia/Ib Study of the Selective MET Inhibitor, Savolitinib, in Patients with Advanced Solid Tumors: Safety, Efficacy, and Biomarkers. *The Oncologist*. April 21, 2022;27(5):342–e383.
207. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. January 7, 2000;100(1):57–70.
208. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. April 26, 2001;410(6832):1107–1111.
209. Gatti RA, Good RA. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer*. July 1971;28(1):89–98.
210. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou F-S, Bifulco C, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *The Lancet*. May 26, 2018;391(10135):2128–2139.
211. Bernardini G, Antonangeli F, Bonanni V, Santoni A. Dysregulation of Chemokine/Chemokine Receptor Axes and NK Cell Tissue Localization during Diseases. *Front Immunol*. October 6, 2016;7:402.

212. Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front Immunol*. May 4, 2018;9:847.
213. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annu Rev Immunol*. March 21, 2015;33(1):643–675.
214. Lavin Y, Merad M. Macrophages: Gatekeepers of Tissue Integrity. *Cancer Immunol Res*. October 2013;1(4):201–209.
215. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. December 2008;8(12):958–969.
216. Van Dalen FJ, van Stevendaal MHME, Fennemann FL, Verdoes M, Iliina O. Molecular Repolarisation of Tumour-Associated Macrophages. *Molecules*. December 20, 2018;24(1):9.
217. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*. October 17, 2014;5:514.
218. Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK, et al. Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration. *Am J Pathol*. October 2015;185(10):2596–2606.
219. Wang L, Zhang S, Wu H, Rong X, Guo J. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol*. August 2019;106(2):345–358.
220. Ge Z, Ding S. The Crosstalk Between Tumor-Associated Macrophages (TAMs) and Tumor Cells and the Corresponding Targeted Therapy. *Front Oncol*. November 3, 2020;10:590941.
221. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumor-Associated Macrophages as Treatment Targets in Oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. July 2017;14(7):399–416.
222. Pittet MJ, Michielin O, Migliorini D. Clinical relevance of tumour-associated macrophages. *Nat Rev Clin Oncol*. June 2022;19(6):402–421.
223. Liu J, Geng X, Hou J, Wu G. New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression. *Cancer Cell Int*. July 21, 2021;21:389.
224. Kumari N, Choi SH. Tumor-associated macrophages in cancer: recent advancements in cancer nanoimmunotherapies. *J Exp Clin Cancer Res CR*. February 19, 2022;41:68.
225. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. October 10, 2011;11(11):762–774.
226. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. October 21, 2010;116(16):e74–e80.
227. Zhao C, Zhang H, Wong W-C, Sem X, Han H, Ong S-M, et al. Identification of novel functional differences in monocyte subsets using proteomic and transcriptomic methods. *J Proteome Res*. August 2009;8(8):4028–4038.
228. Villani A-C, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes and progenitors. *Science*. April 21, 2017;356(6335):eaah4573.

229. Kawamura S, Onai N, Miya F, Sato T, Tsunoda T, Kurabayashi K, et al. Identification of a Human Clonogenic Progenitor with Strict Monocyte Differentiation Potential: A Counterpart of Mouse cMoPs. *Immunity*. May 16, 2017;46(5):835–848.e4.
230. Zhu YP, Thomas GD, Hedrick CC. Transcriptional Control of Monocyte Development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. September 2016;36(9):1722–1733.
231. Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. January 24, 2013;38(1):79–91.
232. T S, K N, F S, R K, M A, F Y, et al. Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. *Nature*. January 5, 2017 [cited March 6, 2023];541(7635). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28002407/>
233. Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, et al. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J Exp Med*. July 3, 2017;214(7):1913–1923.
234. Cg B, M H, Nm K, X W, Dj T, W K, et al. Distinct Transcriptional Programs Control Cross-Priming in Classical and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Cell Rep*. June 14, 2016 [cited March 6, 2023];15(11). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27264183/>
235. Nv S, Eg P. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*. March 2006 [cited March 6, 2023];7(3). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16462739/>
236. Carlin LM, Stamatiades EG, Auffray C, Hanna RN, Glover L, Vizcay-Barrena G, et al. Nr4a1-Dependent Ly6Clow Monocytes Monitor Endothelial Cells and Orchestrate Their Disposal. *Cell*. April 11, 2013;153(2):362–375.
237. Olingy CE, San Emeterio CL, Ogle ME, Krieger JR, Bruce AC, Pfau DD, et al. Non-classical monocytes are biased progenitors of wound healing macrophages during soft tissue injury. *Sci Rep*. March 27, 2017;7. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5428475/>
238. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell R-R, Fliser D, et al. SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood*. September 22, 2011;118(12):e50–e61.
239. Io G, Rs F. Defective antitumor function of monocyte-derived macrophages from epithelial ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. March 1, 2006 [cited March 6, 2023];12(5). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16533776/>
240. Yeap WH, Wong KL, Shimasaki N, Teo ECY, Quek JKS, Yong HX, et al. CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci Rep*. September 27, 2016;6. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5037471/>

241. Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR, Fanger NA. Monocyte-mediated Tumoricidal Activity via the Tumor Necrosis Factor–related Cytokine, TRAIL. *J Exp Med*. April 19, 1999;189(8):1343–1354.
242. Plebanek MP, Angeloni NL, Vinokour E, Li J, Henkin A, Martinez-Marin D, et al. Pre-metastatic cancer exosomes induce immune surveillance by patrolling monocytes at the metastatic niche. *Nat Commun*. November 6, 2017;8. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5673063/>
243. Li X, Yao W, Yuan Y, Chen P, Li B, Li J, et al. Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma. *Gut*. January 1, 2017;66(1):157–167.
244. Sanford DE, Belt BA, Panni RZ, Mayer A, Deshpande AD, Carpenter D, et al. Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: a role for targeting the CCL2/CCR2 axis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. July 1, 2013;19(13):3404–3415.
245. E S, A S, C E, C Q, Cs F, V U, et al. Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth [Internet]. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2012 [cited March 6, 2023]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23152559/>
246. Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJC, John S, Taams LS. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. December 4, 2007;104(49):19446–19451.
247. Romano E, Kusio-Kobialka M, Foukas PG, Baumgaertner P, Meyer C, Ballabeni P, et al. Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 12, 2015;112(19):6140–6145.
248. Chittechath M, Dhillon MK, Lim JY, Laoui D, Shalova IN, Teo YL, et al. Molecular Profiling Reveals a Tumor-Promoting Phenotype of Monocytes and Macrophages in Human Cancer Progression. *Immunity*. November 20, 2014;41(5):815–829.
249. Palma MD, Venneri MA, Galli R, Sergi LS, Politi LS, Sampaolesi M, et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell*. September 1, 2005;8(3):211–226.
250. Venneri MA, Palma MD, Ponzoni M, Pucci F, Scielzo C, Zonari E, et al. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood*. juin 2007;109(12):5276–5285.
251. Coffelt SB, Tal AO, Scholz A, De Palma M, Patel S, Urbich C, et al. Angiopoietin-2 Regulates Gene Expression in TIE2-Expressing Monocytes and Augments Their Inherent Proangiogenic Functions. *Cancer Res*. July 1, 2010;70(13):5270–5280.

252. Franklin RA, Liao W, Sarkar A, Kim MV, Bivona MR, Liu K, et al. The Cellular and Molecular Origin of Tumor-associated Macrophages. *Science*. May 23, 2014;344(6186):921–925.
253. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. February 5, 2010;327(5966):656–661.
254. Worbs T, Hammerschmidt SI, Förster R. Dendritic cell migration in health and disease. *Nat Rev Immunol*. January 2017;17(1):30–48.
255. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. March 1998;392(6673):245–252.
256. Patente TA, Pinho MP, Oliveira AA, Evangelista GCM, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2019 [cited August 25, 2020];9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.03176/full>
257. Stuart LM, Lucas M, Simpson C, Lamb J, Savill J, Lacy-Hulbert A. Inhibitory Effects of Apoptotic Cell Ingestion upon Endotoxin-Driven Myeloid Dendritic Cell Maturation1. *J Immunol*. février 2002;168(4):1627–1635.
258. Wallet MA, Sen P, Flores RR, Wang Y, Yi Z, Huang Y, et al. MerTK is required for apoptotic cell-induced T cell tolerance. *J Exp Med*. January 21, 2008;205(1):219–232.
259. Liu K, Iyoda T, Saternus M, Kimura Y, Inaba K, Steinman RM. Immune Tolerance After Delivery of Dying Cells to Dendritic Cells In Situ. *J Exp Med*. October 21, 2002;196(8):1091–1097.
260. Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, et al. Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. *J Exp Med*. February 14, 2011;208(2):235–249.
261. Sela U, Park CG, Park A, Olds P, Wang S, Steinman RM, et al. Dendritic Cells Induce a Subpopulation of IL-12R β 2-Expressing Treg that Specifically Consumes IL-12 to Control Th1 Responses. *PLoS ONE*. January 8, 2016;11(1):e0146412.
262. O’Keeffe M, Mok WH, Radford KJ. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cell Mol Life Sci*. November 1, 2015;72(22):4309–4325.
263. Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P, et al. Human Tissues Contain CD141^{hi} Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103⁺ Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity*. July 27, 2012;37(1):60–73.
264. Williams M, Dutertre C-A, Scott CL, McGovern N, Sichien D, Chakarov S, et al. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity*. September 20, 2016;45(3):669–684.
265. Leal Rojas IM, Mok W-H, Pearson FE, Minoda Y, Kenna TJ, Barnard RT, et al. Human Blood CD1c⁺ Dendritic Cells Promote Th1 and Th17 Effector Function in Memory CD4⁺ T Cells. *Front Immunol*. August 17, 2017;8:971.

266. Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu M-H, Sastre-Garau X, Soumelis V, Amigorena S. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med*. April 9, 2012;209(4):653–660.
267. Bamboat ZM, Stableford JA, Plitas G, Burt BM, Nguyen HM, Welles AP, et al. Human Liver Dendritic Cells Promote T Cell Hyporesponsiveness. *J Immunol Baltim Md 1950*. February 15, 2009;182(4):1901–1911.
268. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid Dendritic Cells: Recent Progress and Open Questions. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:163–183.
269. Salmon H, Idoyaga J, Rahman A, Leboeuf M, Remark R, Jordan S, et al. Expansion and activation of CD103+ dendritic cell progenitors at the tumor site enhances tumor responses to therapeutic PD-L1 and BRAF inhibition. *Immunity*. April 19, 2016;44(4):924–938.
270. Barry KC, Hsu J, Broz ML, Cueto FJ, Binnewies M, Combes AJ, et al. A Natural Killer/Dendritic Cell Axis Defines Responsive Tumor Microenvironments in Melanoma. *Nat Med*. August 2018;24(8):1178–1191.
271. Böttcher JP, Bonavita E, Chakravarty P, Blees H, Cabeza-Cabrero M, Sammicheli S, et al. NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell*. February 22, 2018;172(5):1022–1037.e14.
272. Montoya M, Schiavoni G, Mattei F, Gresser I, Belardelli F, Borrow P, et al. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood*. mai 2002;99(9):3263–3271.
273. Mikucki M, Fisher D, Matsuzaki J, Skitzki J, Gaulin N, Muhitch J, et al. Non-redundant Requirement for CXCR3 Signaling during Tumoricidal T Cell Trafficking across Tumor Vascular Checkpoints. *Nat Commun*. June 25, 2015;6:7458.
274. Cheng S, Li Z, Gao R, Xing B, Gao Y, Yang Y, et al. A pan-cancer single-cell transcriptional atlas of tumor infiltrating myeloid cells. *Cell*. February 4, 2021;184(3):792–809.e23.
275. Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother Cll*. August 2005;54(8):721–728.
276. Kim H-J, Cantor H. CD4 T-cell Subsets and Tumor Immunity: The Helpful and the Not-so-Helpful. *Cancer Immunol Res*. February 1, 2014;2(2):91–98.
277. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. April 2012;12(4):298–306.
278. Ellyard JI, Simson L, Parish CR. Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens*. 2007;70(1):1–11.
279. Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell*. October 12, 2012;151(2):289–303.
280. Qian X, Chen H, Wu X, Hu L, Huang Q, Jin Y. Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis. *Cytokine*. January 1, 2017;89:34–44.

281. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. November 2002;3(11):991–998.
282. Maggs L, Sadagopan A, Moghaddam AS, Ferrone S. HLA Class-I Antigen Processing Machinery Defects in Antitumor Immunity and Immunotherapy. *Trends Cancer*. December 2021;7(12):1089–1101.
283. Chang C-C, Campoli M, Ferrone S. HLA class I defects in malignant lesions: What have we learned? *Keio J Med*. 2003;52(4):220–229.
284. Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, Sandberg C, Beckmann S, Bayer E, et al. Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene*. November 2000;19(48):5477–5486.
285. Tan GMY, Poudel A, Ali Hosseini Rad SM, McLellan AD. Anti-Apoptotic c-FLIP Reduces the Anti-Tumour Activity of Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Cancers*. October 4, 2022;14(19). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9564159/>
286. Lee SH, Shin MS, Kim HS, Lee HK, Park WS, Kim SY, et al. Somatic mutations of TRAIL-receptor 1 and TRAIL-receptor 2 genes in non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*. January 2001;20(3):399–403.
287. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol*. June 2010;31(6):220–227.
288. L S. Tumor-suppressive and promoting function of transforming growth factor beta [Internet]. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2004 [cited July 14, 2023]. Available at: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.ezproxy.u-paris.fr/14977598/>
289. Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol*. October 4, 2005;78(5):1043–1051.
290. Dennis KL, Blatner NR, Gounari F, Khazaie K. Current status of IL-10 and regulatory T-cells in cancer. *Curr Opin Oncol*. November 2013;25(6):637.
291. Tucci M, Stucci LS, Mannavola F, Passarelli A, D'Oronzo S, Lospalluti L, et al. Defective levels of both circulating dendritic cells and T-regulatory cells correlate with risk of recurrence in cutaneous melanoma. *Clin Transl Oncol*. July 1, 2019;21(7):845–854.
292. Ye F, Yu Y, Hu Y, Lu W, Xie X. Alterations of dendritic cell subsets in the peripheral circulation of patients with cervical carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res CR*. June 18, 2010;29(1):78.
293. E O, A G, S C, Fr M, R F. The circulating dendritic cell compartment in patients with chronic lymphocytic leukemia is severely defective and unable to stimulate an effective T-cell response [Internet]. *Cancer research*. 2003 [cited July 14, 2023]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12907623/>
294. Orsini G, Legitimo A, Failli A, Ferrari P, Nicolini A, Spisni R, et al. Defective Generation and Maturation of Dendritic Cells from Monocytes in Colorectal Cancer Patients during the Course of Disease. *Int J Mol Sci*. November 7, 2013;14(11):22022–22041.

295. Motta JM, Rumjanek VM. Modulation of cytokine production by monocytes and developing-dendritic cells under the influence of leukemia and lymphoma cell products. *Cell Biol Int*. 2021;45(4):890–897.
296. Kuang D-M, Zhao Q, Xu J, Yun J-P, Wu C, Zheng L. Tumor-Educated Tolerogenic Dendritic Cells Induce CD3 ϵ Down-Regulation and Apoptosis of T Cells through Oxygen-Dependent Pathways. *J Immunol*. September 1, 2008;181(5):3089–3098.
297. Clavijo-Salomon MA, Ramos RN, Crippa A, Pizzo CR, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. Monocyte-derived dendritic cells reflect the immune functional status of a chromophobe renal cell carcinoma patient: Could it be a general phenomenon? *Cancer Immunol Immunother*. February 1, 2015;64(2):161–171.
298. Shurin MR, Yurkovetsky ZR, Tourkova IL, Balkir L, Shurin GV. Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic cell function by tumor-derived IL-10. *Int J Cancer*. 2002;101(1):61–68.
299. Han Z, Dong Y, Lu J, Yang F, Zheng Y, Yang H. Role of hypoxia in inhibiting dendritic cells by VEGF signaling in tumor microenvironments: mechanism and application. *Am J Cancer Res*. August 15, 2021;11(8):3777–3793.
300. Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev*. April 2008;222:180–191.
301. Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. Cancer-Expanded Myeloid-Derived Suppressor Cells Induce Anergy of NK Cells through Membrane-Bound TGF- β 1. *J Immunol*. January 1, 2009;182(1):240–249.
302. Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S. Cross-Talk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Macrophages Subverts Tumor Immunity toward a Type 2 Response. *J Immunol*. July 15, 2007;179(2):977–983.
303. Dysthe M, Parihar R. Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. In Birbrair A (ed): *Tumor Microenvironment: Hematopoietic Cells – Part A* Cham: Springer International Publishing 2020; 117–140. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-030-35723-8_8
304. Kim J, Bae J-S. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediators Inflamm*. 2016;2016. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4757693/>
305. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil (TAN) Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*. September 8, 2009;16(3):183–194.
306. Masucci MT, Minopoli M, Carriero MV. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Front Oncol*. November 15, 2019;9. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6874146/>

307. Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio C-W, Santacruz N, et al. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*. September 21, 2011;478(7368):250–254.
308. Hadis U, Wahl B, Schulz O, Hardtke-Wolenski M, Schippers A, Wagner N, et al. Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3+ Regulatory T Cells in the Lamina Propria. *Immunity*. février 2011;34(2):237–246.
309. Gaffen SL, Liu KD. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*. November 7, 2004;28(3):109–123.
310. Zheng SG. The Critical Role of TGF- β 1 in the Development of Induced Foxp3+ Regulatory T Cells. *Int J Clin Exp Med*. June 10, 2008;1(3):192–202.
311. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K, Li L, Marinos N, et al. Conversion of Peripheral CD4+CD25– Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J Exp Med*. December 15, 2003;198(12):1875–1886.
312. Lv K, Zhang Y, Zhang M, Zhong M, Suo Q. Galectin-9 promotes TGF- β 1-dependent induction of regulatory T cells via the TGF- β /Smad signaling pathway. *Mol Med Rep*. January 1, 2013;7(1):205–210.
313. Besin G, Gaudreau S, Ménard M, Guindi C, Dupuis G, Amrani A. Thymic Stromal Lymphopoietin and Thymic Stromal Lymphopoietin–Conditioned Dendritic Cells Induce Regulatory T-Cell Differentiation and Protection of NOD Mice Against Diabetes. *Diabetes*. August 2008;57(8):2107–2117.
314. Brandum EP, Jørgensen AS, Rosenkilde MM, Hjortø GM. Dendritic Cells and CCR7 Expression: An Important Factor for Autoimmune Diseases, Chronic Inflammation, and Cancer. *Int J Mol Sci*. August 3, 2021;22(15):8340.
315. Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol*. 2010;108:111–165.
316. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*. December 2005;6(12):1219–1227.
317. Apostolou I, von Boehmer H. In Vivo Instruction of Suppressor Commitment in Naive T Cells. *J Exp Med*. May 17, 2004;199(10):1401–1408.
318. Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H, et al. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol*. November 2009;10(11):1178–1184.
319. Vlad G, Chang C-C, Colovai AI, Vasilescu ER, Cortesini R, Suci-Foca N. Membrane and Soluble ILT3 Are Critical to the Generation of T Suppressor Cells and Induction of Immunological Tolerance. *Int Rev Immunol*. March 1, 2010;29(2):119–132.

320. Gregori S, Magnani CF, Roncarolo M-G. Role of human leukocyte antigen-G in the induction of adaptive type 1 regulatory T cells. *Hum Immunol*. décembre 2009;70(12):966–969.
321. Mellor AL, Munn DH. Ido expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. October 2004;4(10):762–774.
322. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity*. juin 2009;30(6):899–911.
323. Seddiki N, Santner-Nanan B, Tangye SG, Alexander SI, Solomon M, Lee S, et al. Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life. *Blood*. avril 2006;107(7):2830–2838.
324. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and Induced CD4+CD25+ Cells Educate CD4+CD25– Cells to Develop Suppressive Activity: The Role of IL-2, TGF- β , and IL-10. *J Immunol*. May 1, 2004;172(9):5213–5221.
325. Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T Lymphocyte–Associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of Cd25+Cd4+ Regulatory Cells That Control Intestinal Inflammation. *J Exp Med*. July 17, 2000;192(2):295–302.
326. Huang C-T, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in Regulatory T Cells. *Immunity*. October 1, 2004;21(4):503–513.
327. Gondek DC, Lu L-F, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4+CD25+ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism. *J Immunol*. February 15, 2005;174(4):1783–1786.
328. Duthoit CT, Mekala DJ, Alli RS, Geiger TL. Uncoupling of IL-2 Signaling from Cell Cycle Progression in Naive CD4+ T Cells by Regulatory CD4+CD25+ T Lymphocytes. *J Immunol*. January 1, 2005;174(1):155–163.
329. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell extrinsic function of CTLA-4. *Science*. April 29, 2011;332(6029):600–603.
330. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstein B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. February 2003;9(2):606–612.
331. Ha T-Y. The Role of Regulatory T Cells in Cancer. *Immune Netw*. December 2009;9(6):209–235.
332. Gallimore A, Quezada SA, Roychoudhuri R. Regulatory T cells in cancer: where are we now? *Immunology*. July 2019;157(3):187–189.
333. Ménétrier-Caux C, Curiel T, Faget J, Manuel M, Caux C, Zou W. Targeting regulatory T cells. *Target Oncol*. March 1, 2012;7(1):15–28.

334. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. September 2004;10(9):942–949.
335. Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer*. 2008;122(10):2286–2293.
336. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang L-P, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and Treg cells. *Nature*. July 2011;475(7355):226–230.
337. Terme M, Pernet S, Marcheteau E, Sandoval F, Benhamouda N, Colussi O, et al. VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Res*. January 15, 2013;73(2):539–549.
338. Zhou G, Levitsky HI. Natural Regulatory T Cells and De Novo-Induced Regulatory T Cells Contribute Independently to Tumor-Specific Tolerance. *J Immunol*. February 15, 2007;178(4):2155–2162.
339. Valzasina B, Piconese S, Guiducci C, Colombo MP. Tumor-Induced Expansion of Regulatory T Cells by Conversion of CD4+CD25– Lymphocytes Is Thymus and Proliferation Independent. *Cancer Res*. April 15, 2006;66(8):4488–4495.
340. Schwartz RH. T Cell Anergy. *Annu Rev Immunol*. avril 2003;21(1):305–334.
341. Baitsch L, Baumgaertner P, Devèvre E, Raghav SK, Legat A, Barba L, et al. Exhaustion of tumor-specific CD8+ T cells in metastases from melanoma patients. *J Clin Invest*. June 1, 2011;121(6):2350–2360.
342. Tamura, Sugawara, Tokoro, Taniguchi, Fukao, Nakauchi, et al. Expression and Function of c-Met, a Receptor for Hepatocyte Growth Factor, During T-Cell Development. *Scand J Immunol*. 1998;47(4):296–301.
343. Carrio R, Lopez DM. Insights into thymic involution in tumor-bearing mice. *Immunol Res*. December 1, 2013;57(1):106–114.
344. Song Y, Su M, Panchatsharam P, Rood D, Lai L. c-Met signalling is required for efficient postnatal thymic regeneration and repair. *Immunology*. February 2015;144(2):245–253.
345. Adams DH, Harvath L, Bottaro DP, Interrante R, Catalano G, Tanaka Y, et al. Hepatocyte growth factor and macrophage inflammatory protein 1 beta: structurally distinct cytokines that induce rapid cytoskeletal changes and subset-preferential migration in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. July 19, 1994;91(15):7144–7148.
346. Komarowska I, Coe D, Wang G, Haas R, Mauro C, Kishore M, et al. Hepatocyte Growth Factor Receptor c-Met Instructs T Cell Cardiotropism and Promotes T Cell Migration to the Heart via Autocrine Chemokine Release. *Immunity*. juin 2015;42(6):1087–1099.

347. Benkhoucha M, Molnarfi N, Kaya G, Belnoue E, Bjarnadóttir K, Dietrich P, et al. Identification of a novel population of highly cytotoxic c-Met-expressing CD8⁺ T lymphocytes. *EMBO Rep*. September 2017;18(9):1545–1558.
348. Van der Voort R, Taher TEI, Keehnen RMJ, Smit L, Groenink M, Pals ST. Paracrine Regulation of Germinal Center B Cell Adhesion through the c-Met–Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Pathway. *J Exp Med*. June 16, 1997;185(12):2121–2131.
349. St P, Te T, R van der V, L S, Rm K. Regulation of adhesion and migration in the germinal center microenvironment [Internet]. Cell adhesion and communication. 1998 [cited July 14, 2023]. Available at: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.ezproxy.u-paris.fr/9823461/>
350. Gordin M, Tesio M, Cohen S, Gore Y, Lantner F, Leng L, et al. c-Met and its ligand HGF regulate mature B cell survival in a pathway induced by CD74. *J Immunol Baltim Md 1950*. August 15, 2010;185(4):2020–2031.
351. Beilmann M, Odenthal M, Jung W, Vande Woude GF, Dienes H-P, Schirmacher P. Neoexpression of the c-met/Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor Receptor Gene in Activated Monocytes. *Blood*. décembre 1997;90(11):4450–4458.
352. Molnarfi N, Benkhoucha M, Bjarnadóttir K, Juillard C, Lalive PH. Interferon- β Induces Hepatocyte Growth Factor in Monocytes of Multiple Sclerosis Patients. *PLoS ONE*. November 14, 2012;7(11). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3498184/>
353. Zhao L, Wu Y, Xie X-D, Chu Y-F, Li J-Q, Zheng L. c-Met identifies a population of matrix metalloproteinase 9-producing monocytes in peritumoural stroma of hepatocellular carcinoma. *J Pathol*. 2015;237(3):319–329.
354. Coudriet GM, He J, Trucco M, Mars WM, Piganelli JD. Hepatocyte Growth Factor Modulates Interleukin-6 Production in Bone Marrow Derived Macrophages: Implications for Inflammatory Mediated Diseases. *PLoS ONE*. November 2, 2010;5(11):e15384.
355. Kusunoki H, Taniyama Y, Otsu R, Rakugi H, Morishita R. Anti-inflammatory effects of hepatocyte growth factor on the vicious cycle of macrophages and adipocytes. *Hypertens Res*. June 2014;37(6):500–506.
356. Hiratsuka A, Adachi H, Fujiura Y, Yamagishi S-I, Hirai Y, Enomoto M, et al. Strong Association between Serum Hepatocyte Growth Factor and Metabolic Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. May 1, 2005;90(5):2927–2931.
357. Flaquer M, Franquesa M, Vidal A, Bolaños N, Torras J, Lloberas N, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy enhances infiltration of macrophages and may induce kidney repair in db/db mice as a model of diabetes. *Diabetologia*. 2012;55(7):2059–2068.
358. Kurz SM, Diebold SS, Hieronymus T, Gust TC, Bartunek P, Sachs M, et al. The impact of c-met/scatter factor receptor on dendritic cell migration. *Eur J Immunol*. 2002;32(7):1832–1838.

359. Baek J-H, Birchmeier C, Zenke M, Hieronymus T. The HGF Receptor/Met Tyrosine Kinase Is a Key Regulator of Dendritic Cell Migration in Skin Immunity. *J Immunol*. August 15, 2012;189(4):1699–1707.
360. Rutella S, Bonanno G, Procoli A, Mariotti A, de Ritis DG, Curti A, et al. Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10++IL-12low/neg accessory cells with dendritic-cell features. *Blood*. July 1, 2006;108(1):218–227.
361. Benkhoucha M, Santiago-Raber M-L, Schneiter G, Chofflon M, Funakoshi H, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci*. April 6, 2010;107(14):6424–6429.
362. Benkhoucha M, Santiago-Raber M-L, Schneiter G, Chofflon M, Funakoshi H, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. April 6, 2010;107(14):6424–6429.
363. Yamaura K, Ito K, Tsukioka K, Wada Y, Makiuchi A, Sakaguchi M, et al. Suppression of Acute and Chronic Rejection by Hepatocyte Growth Factor in a Murine Model of Cardiac Transplantation. *Circulation*. September 21, 2004;110(12):1650–1657.
364. Benkhoucha M, Molnarfi N, Dunand-Sauthier I, Merkler D, Schneiter G, Bruscoli S, et al. Hepatocyte Growth Factor Limits Autoimmune Neuroinflammation via Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Expression in Dendritic Cells. *J Immunol*. September 15, 2014;193(6):2743–2752.
365. S M, Y T, M S, M A, T F, S Y, et al. Hepatocyte growth factor is a potent trigger of neutrophil adhesion through rapid activation of lymphocyte function-associated antigen-1 [Internet]. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1998 [cited July 14, 2023]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9840614/>
366. Grenier A, Chollet-Martin S, Crestani B, Delarche C, El Benna J, Boutten A, et al. Presence of a mobilizable intracellular pool of hepatocyte growth factor in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood*. avril 2002;99(8):2997–3004.
367. Taïeb J, Delarche C, Paradis V, Mathurin P, Grenier A, Crestani B, et al. Polymorphonuclear neutrophils are a source of hepatocyte growth factor in patients with severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol*. March 1, 2002;36(3):342–348.
368. Jaffré S, Dehoux M, Paugam C, Grenier A, Chollet-Martin S, Stern J-B, et al. Hepatocyte growth factor is produced by blood and alveolar neutrophils in acute respiratory failure. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. février 2002;282(2):L310–L315.
369. Schag K, Schmidt SM, Müller MR, Weinschenk T, Appel S, Weck MM, et al. Identification of C-Met Oncogene as a Broadly Expressed Tumor-Associated Antigen Recognized by Cytotoxic T-Lymphocytes. *Clin Cancer Res*. June 1, 2004;10(11):3658–3666.

370. Lai L, Jin J, Goldschneider I. In vivo Antitumor Activity of a Recombinant IL-7/HGF β Hybrid Cytokine in Mice. *Cancer Res.* January 1, 2011;71(1):61–67.
371. Glodde N, Bald T, van den Boorn-Konijnenberg D, Nakamura K, O'Donnell JS, Szczepanski S, et al. Reactive Neutrophil Responses Dependent on the Receptor Tyrosine Kinase c-MET Limit Cancer Immunotherapy. *Immunity.* October 17, 2017;47(4):789–802.e9.
372. He M, Peng A, Huang X-Z, Shi D-C, Wang J-C, Zhao Q, et al. Peritumoral stromal neutrophils are essential for c-Met-elicited metastasis in human hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology.* September 27, 2016;5(10). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5087290/>
373. Wislez M, Rabbe N, Marchal J, Milleron B, Crestani B, Mayaud C, et al. Hepatocyte Growth Factor Production by Neutrophils Infiltrating Bronchioloalveolar Subtype Pulmonary Adenocarcinoma. *Cancer Res.* March 15, 2003;63(6):1405–1412.
374. Saigi M, Alburquerque-Bejar JJ, Mc Leer-Florin A, Pereira C, Pros E, Romero OA, et al. MET-Oncogenic and JAK2-Inactivating Alterations Are Independent Factors That Affect Regulation of PD-L1 Expression in Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* September 15, 2018;24(18):4579–4587.
375. Albitar M, Sudarsanam S, Ma W, Jiang S, Chen W, Funari V, et al. Correlation of MET gene amplification and TP53 mutation with PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* February 8, 2018;9(17):13682–13693.
376. Xing X, Guo J, Wen X, Ding G, Li B, Dong B, et al. Analysis of PD1, PDL1, PDL2 expression and T cells infiltration in 1014 gastric cancer patients. *Oncoimmunology.* December 21, 2017;7(3). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5790386/>
377. Li H, Li C-W, Li X, Ding Q, Guo L, Liu S, et al. MET Inhibitors Promote Liver Tumor Evasion of the Immune Response by Stabilizing PDL1. *Gastroenterology.* May 2019;156(6):1849–1861.e13.
378. WANG D, SAGA Y, SATO N, NAKAMURA T, TAKIKAWA O, MIZUKAMI H, et al. The hepatocyte growth factor antagonist NK4 inhibits indoleamine-2,3-dioxygenase expression via the c-Met-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling pathway. *Int J Oncol.* April 14, 2016;48(6):2303–2309.
379. Galimi F, Cottone E, Vigna E, Arena N, Boccaccio C, Giordano S, et al. Hepatocyte growth factor is a regulator of monocyte-macrophage function. *J Immunol Baltim Md 1950.* January 15, 2001;166(2):1241–1247.
380. Q C, Mc D, R Z. Induction of met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor) expression during human monocyte-macrophage differentiation. *Cell Growth Differ Mol Biol J Am Assoc Cancer Res.* June 1996 [cited March 15, 2023];7(6). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/ezproxy.u-paris.fr/8780895/>
381. E S, A S, C E, C Q, Cs F, V U, et al. Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor

- growth. *J Immunol Baltim Md 1950*. December 15, 2012 [cited March 15, 2023];189(12). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23152559/>
382. Kl W, Jj T, Wc W, H H, X S, Wh Y, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*. August 4, 2011 [cited March 15, 2023];118(5). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21653326/>
383. Moghul A, Lin L, Beedle A, Kanbour-Shakir A, DeFrances MC, Liu Y, et al. Modulation of c-MET proto-oncogene (HGF receptor) mRNA abundance by cytokines and hormones: evidence for rapid decay of the 8 kb c-MET transcript. *Oncogene*. July 1994;9(7):2045–2052.
384. Boccaccio C, Gaudino G, Gambarotta G, Galimi F, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor (HGF) receptor expression is inducible and is part of the delayed-early response to HGF. *J Biol Chem*. April 29, 1994;269(17):12846–12851.
385. Jiang Q, Azuma E, Tanaka M, Kobayashi M, Hirayama M, Kumamoto T, et al. Differential responsiveness of cord and adult blood monocytes to hepatocyte growth factor. *Clin Exp Immunol*. August 2001;125(2):222–228.
386. Chen P-M, Liu K-J, Hsu P-J, Wei C-F, Bai C-H, Ho L-J, et al. Induction of immunomodulatory monocytes by human mesenchymal stem cell-derived hepatocyte growth factor through ERK1/2. *J Leukoc Biol*. August 1, 2014;96(2):295–303.
387. Molnarfi N, Benkhoucha M, Juillard C, Bjarnadóttir K, Lalive PH. The neurotrophic hepatocyte growth factor induces protolerogenic human dendritic cells. *J Neuroimmunol*. février 2014;267(1–2):105–110.
388. Li K, Chen F, Xie H. Decreased FOXP3+ and GARP+ Tregs to neoadjuvant chemotherapy associated with favorable prognosis in advanced gastric cancer. *Oncotargets Ther*. June 14, 2016;9:3525–3533.
389. Hu M, Li K, Maskey N, Xu Z, Peng C, Wang B, et al. Decreased intratumoral Foxp3 Tregs and increased dendritic cell density by neoadjuvant chemotherapy associated with favorable prognosis in advanced gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. July 15, 2014;7(8):4685–4694.
390. Terme M, Colussi O, Marcheteau E, Tanchot C, Tartour E, Taieb J. Modulation of Immunity by Antiangiogenic Molecules in Cancer. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3540780/>
391. Gallimore A, Quezada SA, Roychoudhuri R. Regulatory T cells in cancer: where are we now? *Immunology*. July 2019;157(3):187–189.
392. Jang TJ. The number of Foxp3-positive regulatory T cells is increased in Helicobacter pylori gastritis and gastric cancer. *Pathol - Res Pract*. January 15, 2010;206(1):34–38.
393. Cheng H-H, Tseng G-Y, Yang H-B, Wang H-J, Lin H-J, Wang W-C. Increased numbers of Foxp3-positive regulatory T cells in gastritis, peptic ulcer and gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol WJG*. January 1, 2012;18(1):34.

394. Kawaida H, Kono K, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, et al. Distribution of CD4(+)CD25high regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer. *J Surg Res*. March 1, 2005;124(1):151–157.
395. Liu X, Zhang Z, Zhao G. Recent advances in the study of regulatory T cells in gastric cancer. *Int Immunopharmacol*. août 2019;73:560–567.
396. Nagase H, Takeoka T, Urakawa S, Morimoto-Okazawa A, Kawashima A, Iwahori K, et al. ICOS+ Foxp3+ TILs in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory T cells associated with Helicobacter pylori. *Int J Cancer*. 2017;140(3):686–695.
397. Mao F, Kong H, Zhao Y, Peng L, Chen W, Zhang J, et al. Increased tumor-infiltrating CD45RA–CCR7– regulatory T-cell subset with immunosuppressive properties foster gastric cancer progress. *Cell Death Dis*. August 2017;8(8):e3002.
398. Song KY, Desai S, Pengo T, Shanley R, Giubellino A. Correlation of MET and PD-L1 Expression in Malignant Melanoma. *Cancers*. July 9, 2020;12(7). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7408820/>
399. Sabari JK, Montecalvo J, Chen R, Dienstag JA, Mrad C, Bergagnini I, et al. PD-L1 expression and response to immunotherapy in patients with MET exon 14-altered non-small cell lung cancers (NSCLC). *J Clin Oncol*. May 20, 2017;35(15_suppl):8512–8512.
400. Mazieres J, Drilon A, Lusque A, Mhanna L, Cortot AB, Mezquita L, et al. Immune checkpoint inhibitors for patients with advanced lung cancer and oncogenic driver alterations: results from the IMMUNOTARGET registry. *Ann Oncol*. August 2019;30(8):1321–1328.
401. Kubo Y, Fukushima S, Inamori Y, Tsuruta M, Egashira S, Yamada-Kanazawa S, et al. Serum concentrations of HGF are correlated with response to anti-PD-1 antibody therapy in patients with metastatic melanoma. *J Dermatol Sci*. January 1, 2019;93(1):33–40.
402. Motzer RJ, Powles T, Burotto M, Escudier B, Bournal MT, Shah AY, et al. Nivolumab plus cabozantinib versus sunitinib in first-line treatment for advanced renal cell carcinoma (CheckMate 9ER): long-term follow-up results from an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. juillet 2022;23(7):888–898.
403. Ho WJ, Zhu Q, Durham J, Popovic A, Xavier S, Leatherman J, et al. Neoadjuvant cabozantinib and nivolumab convert locally advanced hepatocellular carcinoma into resectable disease with enhanced antitumor immunity. *Nat Cancer*. September 2021;2(9):891–903.
404. Spigel DR, Reynolds C, Waterhouse D, Garon EB, Chandler J, Babu S, et al. Phase 1/2 Study of the Safety and Tolerability of Nivolumab Plus Crizotinib for the First-Line Treatment of Anaplastic Lymphoma Kinase Translocation — Positive Advanced Non–Small Cell Lung Cancer (CheckMate 370). *J Thorac Oncol*. May 1, 2018;13(5):682–688.
405. Sun Z-J, Wu Y, Hou W-H, Wang Y-X, Yuan Q-Y, Wang H-J, et al. A novel bispecific c-MET/PD-1 antibody with therapeutic potential in solid cancer. *Oncotarget*. March 14, 2017;8(17):29067–29079.

406. Yuan Q, Liang Q, Sun Z, Yuan X, Hou W, Wang Y, et al. Development of bispecific anti-c-Met/PD-1 diabodies for the treatment of solid tumors and the effect of c-Met binding affinity on efficacy. *Oncoimmunology*. 10(1). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8296967/>
407. Thayaparan T, Petrovic RM, Achkova DY, Zabinski T, Davies DM, Klampatsa A, et al. CAR T-cell immunotherapy of MET-expressing malignant mesothelioma. *Oncoimmunology*. August 14, 2017;6(12). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5706532/>
408. Tchou J, Zhao Y, Levine BL, Zhang PJ, Davis MM, Melenhorst JJ, et al. Safety and efficacy of intratumoral injections of chimeric antigen receptor (CAR) T cells in metastatic breast cancer. *Cancer Immunol Res*. December 2017;5(12):1152–1161.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Anatomie de l'estomac	13
Figure 2. Structure de l'HGF et de ses variants naturels HGF/NK1 et HGF/NK2.	20
Figure 3. Structure du récepteur cMET.....	21
Figure 4. Voie de signalisation HGF/MET : acteurs, interactions et mécanismes de régulation.	24
Figure 5. Fréquence des altérations de <i>MET</i> dans différents cancers.	42
Figure 6. Dérégulation de l'axe HGF/MET en situation tumorale.	43
Figure 7. Thérapies ciblées dirigées contre la voie HGF/MET ayant fait l'objet d'essais cliniques.	50
Figure 8. Rôle pronostique de l'infiltration en lymphocytes T CD8+ dans différents cancers. ...	60
Figure 9. Immunoscore [®] et risque de récurrence après chirurgie dans le cancer colorectal.	61
Figure 10. Impact pronostique de l'infiltrat immunitaire intra-tumoral dans différents cancers.	63
Figure 11. Rôles des différentes populations monocytaires en situation tumorale.	73
Figure 12. Maturation des cellules dendritiques.	75
Figure 13. Les 3 phases de l'Immunoediting.....	83
Figure 14. Mécanismes immunosuppresseurs des lymphocytes T régulateurs.....	94
Figure 15. Potentiels rôles immunomodulateurs de l'HGF en situation tumorale	104
Figure 16. Expression de cMET par les CD.	138
Figure 17. Expression de cMET par les monocytes circulants des patients atteints de cancer gastrique en fonction du statut HER2 (A) et de la présence d'une infection à <i>Helicobacter pylori</i> (B).....	140
Figure 18. Différents mécanismes d'accumulation des Tregs mis en évidence dans le cancer gastrique.	145
Figure 19. Impacts immunosuppresseurs du VEGF-A en situation tumorale	149