



HAL
open science

Implication des cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC) et des lymphocytes TH17 dans l'efficacité des chimiothérapies et de l'immunothérapie

Emeric Limagne

► **To cite this version:**

Emeric Limagne. Implication des cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC) et des lymphocytes TH17 dans l'efficacité des chimiothérapies et de l'immunothérapie. Immunologie. Université Paris sciences et lettres, 2017. Français. NNT : 2017PSLEP004 . tel-02105270

HAL Id: tel-02105270

<https://theses.hal.science/tel-02105270>

Submitted on 20 Apr 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres
PSL Research University

Préparée à l'École Pratique des Hautes Études

Implication des cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC) et des lymphocytes T_H17 dans l'efficacité des chimiothérapies et de l'immunothérapie

École doctorale de l'EPHE – ED 472

« Systèmes intégrés, environnement et biodiversité »

Spécialité : Immunologie

COMPOSITION DU JURY :

M. TARTOUR Éric
Hôpital Européen Georges-Pompidou Rapporteur

M. CHAUFFERT Bruno
CHU d'Amiens-Picardie
Rapporteur

M. SAINTIGNY Pierre
Centre Anticancéreux Léon Bérard
Membre du jury

Mme. BONNEFOY Nathalie
Institut de recherche en cancérologie de Montpellier
Membre du jury

Mme. PAUL Catherine
Ecole Pratique des Hautes Etudes
Membre du jury

M. GHIRINGHELLI François
Centre Anticancéreux G.F Leclerc
Co-encadrant de thèse

M. DELMAS Dominique
Université de Bourgogne
Directeur de Thèse

Soutenue le 19 Janvier 2017

par Emeric LIMAGNE

Dirigée par Dominique DELMAS



École Pratique
des Hautes Études



THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres
PSL Research University

Préparée à l'École Pratique des Hautes Études

Implication des cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC) et des lymphocytes T_H17 dans l'efficacité des chimiothérapies et de l'immunothérapie

École doctorale de l'EPHE – ED 472

« Systèmes intégrés, environnement et biodiversité »

Spécialité : Immunologie

COMPOSITION DU JURY :

M. TARTOUR Éric
Hôpital Européen Georges-Pompidou Rapporteur

M. CHAUFFERT Bruno
CHU d'Amiens-Picardie
Rapporteur

M. SAINTIGNY Pierre
Centre Anticancéreux Léon Bérard
Membre du jury

Mme. BONNEFOY Nathalie
Institut de recherche en cancérologie de Montpellier
Membre du jury

Mme. PAUL Catherine
Ecole Pratique des Hautes Etudes
Membre du jury

M. GHIRINGHELLI François
Centre Anticancéreux G.F Leclerc
Co-encadrant de thèse

M. DELMAS Dominique
Université de Bourgogne
Directeur de Thèse

Soutenue le 19 Janvier 2017

par Emeric LIMAGNE

Dirigée par Dominique DELMAS



École Pratique
des Hautes Études



« Si l'idée n'est pas a priori absurde, elle est sans espoir » Albert Einstein

« Un peu de science éloigne de Dieu, mais beaucoup y ramène » Louis Pasteur

Je dédie cette thèse à ma femme et à mes enfants, Luna et Lisandro,

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail. Je remercie vivement le professeur Bruno Chauffert et le professeur Éric Tartour d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse. Merci à vous pour le temps et l'énergie que vous avez consacré à la lecture et à l'évaluation de mon manuscrit. Je souhaite également remercier le docteur Nathalie Bonnefoy et le docteur Pierre Saintigny, membres examinateurs de ce jury. J'espère que mon travail vous aura plu. Un merci tout particulier à toi Catherine, qui a également accepté d'examiner mon travail. C'est un vrai plaisir de travailler en lien avec toi depuis mes débuts à l'EPHE, tu es un peu ma maman du labo ! J'espère que nous pourrons encore longtemps collaborer ensemble !

Je souhaite à présent remercier Dominique, mon directeur de thèse. Bientôt 8 ans que nous nous sommes rencontrés, depuis mes débuts en stage d'IUT à la faculté Gabriel. Je te remercie pour ta confiance et pour l'énergie que tu as déployé pour me permettre de réaliser mon diplôme et ma thèse à l'EPHE dans de bonnes conditions. Je sais à présent à quel point ces choses-là peuvent être stressantes ! Grâce à cela j'ai pu acquérir de l'expérience et apprendre beaucoup de choses sur le monde de la recherche, ce qui m'a permis d'éviter certaines difficultés. Je garderais sans nul doute un excellent souvenir de ces belles années « Resvératrol » !

Je voudrais également témoigner ma reconnaissance et mes remerciements sincères à François. Merci à toi de m'avoir permis de travailler dans ton équipe sur des sujets tous aussi passionnants les uns que les autres. Ta gentillesse, ta compréhension et ton talent scientifique font de toi une personne avec qui j'adore travailler ! Merci de la confiance que tu m'accordes depuis mon arrivée dans ton équipe. Merci aussi de l'immense privilège de pouvoir, avant même la fin de ma thèse, faire partie intégrante de la plateforme du CGFL ! J'espère que ce projet sera une réussite à la fois humainement et scientifiquement. Compte sur moi pour faire tout mon possible dans ce sens !

J'aimerais aussi remercier mon premier mentor, Didier ! Merci à toi pour la passion de la recherche que tu m'as transmise et pour ta manière de travailler qui a été pour moi un exemple à suivre ! Je suis très heureux d'être toujours en contact avec toi et de pouvoir régulièrement te voir ! Je te souhaite une pleine réussite à Genève et, qui sais, nous aurons sûrement un jour l'occasion de collaborer !

L'aventure de la thèse n'aurait pas été si belle sans ceux qui ont partagé mon quotidien ! Marion, à toi, plus qu'un grand merci ! C'est une chance d'avoir travaillé avec toi pendant ces trois

années, tu es un binôme exceptionnel et j'adore ta façon de travailler. C'est aussi une chance de pouvoir se dire sincèrement les choses au quotidien, le bon et le moins bon, sache que tu as quand même mauvais caractère... ;-) ! Tu peux être fière de l'immense travail que tu as réalisé. Sans toi tout aurait été beaucoup, beaucoup plus difficile ! Merci pour ce sens de l'entraide que tu as, au prix parfois de soirées et de nuits tranquilles avec ton chéri, merci Vincent !! Beaucoup de belles aventures nous attendent encore au labo et je suis sûr que nous parviendrons à faire de belles choses !! Tu me feras par contre en guise de cadeaux de thèse, l'immense plaisir de ne plus sauter sur la moindre occasion pour immortaliser mes moments d'égarement et d'imbécilité (je sais, c'est dur, ils sont nombreux...) !

Romet, Minou, premier M2 et de loin celui avec qui j'ai le plus aimé travailler. Tu es débordant d'idée et de motivation autant que de folie, le cocktail idéal pour bien travailler et s'intégrer dans une équipe. Je me souviens bien de notre première rencontre, je crois que tu plançais sur une devinette, une histoire de pamplemousse je crois... Ces débuts un peu mouvementés au labo auront eu l'avantage de nous permettre de nous connaître et de travailler ensemble ! Merci pour ton implication sur les projets, je suis fier du beau travail que nous avons mené à trois avec Marion. Merci minou pour ton aide et pour votre accueil Fiona et toi quand j'étais à la recherche d'un toit pour dormir ! Ton départ après le M2 a laissé un grand vide ! Ton humanité et ton talent feront de toi un excellent médecin ! Je te souhaite le meilleur pour la suite de ton parcours, courage et merde pour les ECN. Egoïstement j'espère que tu ne quitteras pas Dijon, j'en profite d'ailleurs pour te dire que je ne désespère pas que tu fasses ta thèse de science avec nous !!

Etienne, notre gastronome, merci à toi pour ces bons moments passés ensemble ! Merci pour ton calme qui est une sacrée qualité chez toi ! Elle t'a sûrement permis de survivre au « bazar » et à la folie ambiante du bureau (tu sais bien que tout est de la faute de Marion !). Merci à toi pour ces moments où tu nous fais saliver comme des toutous quand tu nous décris la préparation de tes petits plats. Je garderais un très bon souvenir de notre matinée en cuisine. Merci aussi de ton aide en cas de coup dur avec la SNCF, ton canapé est très moelleux ! Courage pour la dernière année, je suis sûr qu'IRF8 fera bientôt les gros titres d'un bon canard ! Si c'est le cas, promis tu auras 1 an de fournitures gratuites chez Saint Marc !

Un merci aussi à toi Alexia, ma Mercotte, mon Cotylédon, mon Cottonou ! Je tiens à m'excuser pour ces 6 années pendant lesquelles tu as dû supporter ma bêtise...bon, moi j'ai quand même supporté ton caractère de cochon ;-) ! Ta trogne va me manquer quand tu ne seras plus au labo ! Ça a été un plaisir de travailler avec toi, de loin ou de près, depuis ton arrivée dans la team « Resvé » ! Ça n'a pas été toujours facile pour toi mais tu peux être vraiment fière de ton parcours de

thèse et du travail que tu as réalisé ! Tu peux avoir confiance dans tes capacités de chercheuse, ne lâche rien ! A toi aussi Cotylédon je te souhaite la masse de bonnes choses pour ton après thèse !

Un grand merci à toi mon Valou, mon compagnon de train et personnification de la gentillesse ! Merci pour ces moments exceptionnels d'imitation, je pense qu'à nous deux nous pourrions sûrement faire illusion en tant que représentant de l'onco med et de l'anapath ! C'est un plaisir de travailler avec toi au quotidien, ta compagnie est source de bien être (non François, je sais ce que tu vas dire, avec Valou on est juste amis !). J'espère que nous pourrions travailler ensemble encore longtemps et que l'histo et la cyto nous permettront de faire de belles publications ! Valou, comme cadeaux de thèse est-il possible d'avoir des marquages gratos, tu ne peux pas me refuser ça ! Si tu me trouves une belle « rondellite » ça serait bien le diable qu'il n'y ai pas un peu de CD3⁺ ;-)

Nina, la plus colorée de nos M2 ! Tu es une très belle rencontre, c'est un peu comme la fleur que tu trouves sur ton chemin alors que tu marches en plein désert ! Merci pour ces moments réconfortants et rigolos que nous avons passé devant un bon café à l'italienne, un rooibos ou une bonne bière ! J'ai adoré ton côté survolté, qui a l'inconvénient de bouffer ton énergie mais qui est paradoxalement vraiment motivant ! J'espère que tu vas pouvoir prendre tes marques à Dijon et que nous pourrions travailler ensemble sur de beau projet d'immuno dans l'ovaire ! Si je peux me permettre le conseil et le jeu de mot, il ne faudra cependant pas que tu oublies de temps en temps d'aller t'y mettre ! Il faut savoir prendre soin de soi !

Une pensée aussi pour Hélène, grâce à toi mes débuts au labo se sont bien passés. Merci pour ta formation sur la « diff » et pour ta douceur qui apportait beaucoup au quotidien du labo ! Elle manque c'est une certitude ! Ton départ à lui aussi laissé un grand vide.

Romain merci aussi à toi pour ta compagnie ! J'aime beaucoup ces moments où tu pousses un cri qui nous vient de nulle part : c'est la PT !! Merci aussi pour cette permission particulière, celle de pouvoir toucher ta barbe régulièrement. Je suis sûr, qu'elle possède les mêmes pouvoirs que la chouette ! Bonne chance pour la fin de thèse, le TFH (Thèse avec une Fin Heureuse) est ton porte bonheur !

Mes remerciements vont aussi à vous Fred et Romain !! Merci à toi Fred qui, comme Hélène, à participé à ma formation sur les techniques difficiles de l'immunologie ! C'était un plaisir de partager la vie du bureau avec toi, je vais devoir bientôt prendre ma tyrolienne pour rejoindre le bâtiment d'en face !! Promis je reviendrais souvent vous dire un petit bonjour ! Je te souhaite aussi de réussir à l'INSERM et que le groupe FV fasse de bonnes publis ! Romain merci pour ton soutien et ton aide à mon arrivée au CGFL. Merci à vous deux pour la confiance que vous m'avez donné depuis

mon arrivée au labo et au CGFL, j'espère que notre plateforme sera une réussite et que nous pourrons ensemble continuer de travailler sur de beaux projets ! Vive la PTBC !

Cédric, un merci à toi aussi pour ces bonnes discussions que nous avons souvent eues tout au long de la thèse ! Je n'ai pas oublié qu'elle aurait pu être réalisée avec toi... ouf à quoi j'ai échappé ;-) ! Plus sérieusement je souhaite aussi te remercier pour ta sincérité et pour ta disponibilité ! J'espère que la suite de nos échanges seront toujours aussi bons !!

Chris, mon Hillary, un grand merci à toi aussi pour ton aide au quotidien et ta spontanéité. C'est une chance de pouvoir t'avoir au labo ! Merci pour ces quelques mois pendant lesquels tu as bien voulu de moi dans ton bureau, c'était très sympa ! Merci aussi pour cet accent chantant qui donne envie tous les matins de partir en vacances.

Merci à toi aussi Lionel, je te remercie pour ton aide au début de la thèse pour les premières manip d'immunomonitoring qui m'ont un peu forcé à découvrir la cytométrie ! A présent c'est devenu une passion et c'est un peu grâce à toi finalement ! Merci aussi pour ton aide sur les papiers et pour ton regard scientifique qui est souvent intéressant. Je te souhaite bonne chance pour la suite avec ton équipe de recherche !

Un merci aussi à tous ceux que je croise d'un peu plus loin ou qui sont arrivés depuis peu ! Merci à tous les thésards du labo ! Antoine, la réincarnation d'Alain Delon, courage pour ta fin de thèse et merci de ta gentillesse au quotidien ! Lucie, merci pour ta voix incroyablement belle et l'animation dans le box ! Flavie, courage à toi aussi. Un conseil, garde un œil sur tes cellules ;-) ! Pierre, merci pour ton regard coquin ! J'ai beaucoup aimé parler avec toi après quelques bières à l'occasion de petites virées dijonnaises. Fanny, notre petite douceur du bureau, je suis heureux que tu sois revenue au labo ! Je suis sûr que tu vas être une super maman, profite bien de ton petit bibou avant ton retour. Je te souhaite vraiment de réussir tes futurs concours. Angel, ma bien aimée, merci pour ta gentillesse et pour ta compagnie le midi au CGFL !

Merci aussi à toutes les filles du 2^{ième} étage (il n'y a même pas un seul garçon ?), Magalie, Thaiz, Aurélie, Isis, Tiphonie, bon courage à vous aussi pour la suite au labo !

Merci à tous les membres de l'unité U866, merci à tous ceux avec qui j'ai pu travailler de près ou de loin !

Aux membres de la plateforme de cytométrie, Arlette, Serge et Annabelle, j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous et un merci particulier pour Arlette et Serge qui ont beaucoup participé à nos travaux au moment des tris et des bioplex !

Je souhaite aussi remercier toutes les infirmières de l'hôpital de jour et du service d'oncologie médicale pour leur implication dans le recueil des prélèvements des différentes études cliniques ! Une pensée particulière pour Laure Raeth, merci beaucoup à toi pour ton aide précieuse !

Je souhaite à présent remercier toute ma famille qui a largement contribué à la réussite de ma thèse et qui m'a aidé dans les moments les plus difficiles.

Papa merci à toi, car sans nul doute ma passion et mon émerveillement pour la biologie vient de toi et de ces nombreuses virées tous les deux dès mon plus jeune âge. J'adore ton ouverture d'esprit et ta soif de comprendre les choses ! C'est un plaisir pour moi d'essayer de répondre à tes nombreuses questions lorsque tu m'interroges sur les mystères de la vie, même si ce n'est pas toujours facile ! Tu te poses trop de questions ;-) ! Merci aussi à toi pour ton coaching, qui m'a permis de comprendre plus rapidement le monde du travail, s'est aussi grâce à toi si je m'en suis bien sorti ! Maman, merci à toi pour le soin et la tendresse que tu nous apportes et pour tous tes témoignages d'affections ! Merci aussi pour le souci que tu as eu pour que je sois bien installé à Dijon (je me souviens bien du stress pour trouver un appartement !) Merci aussi pour ton aide au moment de la rédaction de ma thèse avec les enfants.

Une pensée et un immense merci à vous mes frères et sœurs, beaux-frères, belle-sœur, neveux et nièces, vous qui avez toujours été là pour m'encourager ! Merci pour vos petits textos, vos appels et pour tous ces moments que nous passons malheureusement trop rarement ensemble. C'est une immense chance d'avoir de l'affection de la part de toute sa famille et de savoir que l'on peut compter sur elle.

Un grand merci aussi pour vous Jean Louis et Françoise pour toute l'aide et l'affection que vous nous avez apporté durant toute la durée de la thèse que ce soit pendant les grossesses de Maéva ou la rédaction !

Pour finir j'aimerais remercier celle qui partage mon quotidien. Maéva, je te suis profondément reconnaissant pour ton aide précieuse et ton affection que tu me donnes chaque jour. Grâce à toi j'ai trouvé souvent le courage de continuer à travailler dur pendant ces longues années d'études depuis notre rencontre, finalement, bientôt 10 ans ! Je sais combien tout cela à parfois nécessité de ta part des sacrifices et de la patience, en particulier pendant la rédaction de la thèse et ces longs weekends où je n'étais pas vraiment présent avec les enfants et toi pour passer du temps en famille. Sache que je continuerais à faire mon maximum pour continuer à donner le meilleur de moi-même pour prendre soin de toi et des enfants. Merci de ton amour, de ton écoute et de ton abnégation ! Merci aussi à vous aussi mes petits « bibous » pour qui je pourrais faire n'importe quoi !

Merci à vous de m'avoir permis de battre le record du temps de rédaction de thèse le plus long, 1 an... 😊 Je vous aime profondément !

Résumé

L'état de la réponse immunitaire détermine en partie l'issue thérapeutique des patients atteints de cancer. L'objectif de notre équipe est de caractériser cette réponse et d'étudier l'impact des chimiothérapies sur celle-ci, afin d'identifier les mécanismes d'échappement. Nous avons montré que l'association 5-FU/oxaliplatine/anti-VEGF provoque chez certains patients atteints de cancer colorectal une chute des gMDSC périphériques exprimant fortement PD-L1 et les enzymes CD39/CD73. Cette diminution est associée à une meilleure réponse thérapeutique. Néanmoins, cette chimiothérapie peut aussi induire une élévation des Th17, une population pro-angiogénique, qui limite l'efficacité thérapeutique. Dans ce contexte, nous avons ensuite eu pour objectif d'analyser l'effet d'une activation de la désacétylase SIRT1 sur la polarisation des Th17. Nous avons montré que SIRT1 limite l'acétylation de STAT3, ce qui perturbe le programme de différenciation de ces cellules. *In vivo*, SIRT1 limite l'expansion des Th17 et conduit à un ralentissement de la croissance tumorale. Ce concept a été validé chez l'homme et ouvre la perspective d'associer des agonistes de SIRT1 avec la chimiothérapie. Nous avons ensuite comparé le profil immunologique de donneurs sains à celui d'une cohorte prospective de cancers bronchiques traités par anti-PD-1. Nous avons constaté qu'il existe des altérations immunologiques dans le compartiment myéloïde et que certaines d'entre elles influent sur la réponse à l'anti-PD1. Un modèle prédictif a pu être généré et il révèle que les gMDSC jouent là encore un rôle défavorable, alors que les cellules dendritiques et monocytaires exprimant PD-L1 jouent un rôle positif.

Mots Clés

Cancer, MDSC, Th17, SIRT1, Chimiothérapie, Immunothérapie

Abstract

The state of the immune response partly determines the therapeutic outcome of cancer patients. The objective of our team is to characterize this response and study the impact of chemotherapy on it, in order to identify escape mechanisms. We have shown that the 5-FU / oxaliplatin / anti-VEGF combination causes a fall in PD-L1-expressing peripheral gMDSCs and CD39 / CD73 enzymes in some patients with colorectal cancer. This decrease is associated with a better therapeutic response. Nevertheless, this chemotherapy can also induce an elevation of Th17, a pro-angiogenic population, which limits the therapeutic efficacy. In this context, we then aimed to analyze the effect of activation of SIRT1 deacetylase on the polarization of Th17. We have shown that SIRT1 limits the acetylation of STAT3, which disrupts the differentiation program of these cells. *In vivo*, SIRT1 limits the expansion of Th17 and leads to a slowing of tumor growth. This concept has been validated in humans and opens the prospect of associating SIRT1 agonists with chemotherapy. We then compared the immunological profile of healthy donors with that of a prospective cohort of anti-PD-1 treated bronchial cancers. We found that there are immunological alterations in the myeloid compartment and that some of them affect the response to anti-PD1. A predictive model could be generated and it reveals that gMDSCs play again an unfavorable role, whereas dendritic and monocytic cells expressing PD-L1 play a positive role.

Keywords

Cancer, MDSC, Th17, SIRT1, Chemotherapy, Immunotherapy

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX.....	1
LISTE DES FIGURES.....	2
LISTE DES ABRÉVIATIONS	4
INTRODUCTION	7
I. Cancer et Immunité.....	8
1. Le concept de l'immunosurveillance.....	8
2. Le concept d'immunoediting.....	12
3. La phase d'élimination	15
4. La phase d'équilibre	30
5. La phase d'échappement	32
II. Les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC)	45
1. Origine, expansion et activation des MDSCs.....	45
2. Mécanismes impliqués dans l'activité immunosuppressive de MDSCs	49
3. Promotion de l'angiogenèse	52
4. Caractéristiques phénotypiques des MDSC	53
5. Devenir des MDSC au sein du microenvironnement tumoral.....	55
6. Stratégies thérapeutiques permettant de cibler les MDSC.....	56
III. Les lymphocytes Th17	62
1. Découverte, caractéristiques biologique et fonctionnelle	62
2. Mécanismes moléculaires de la différenciation des Th17	63
3. Rôle pronostique des Th17 dans le cancer : un sous-type aux deux visages	67
4. La plasticité des Th17 explique leur ambivalence	69
5. Stratégies thérapeutiques permettant de cibler les Th17	72
IV. Efficacité des thérapies anti-cancéreuses et modulation de la réponse immunitaire	73

1. Chimiothérapie et réponse immunitaire anti-tumorale	73
2. Immunothérapie et réponse immunitaire anti-tumorale	81
3. Combiner l’immunothérapie à la chimiothérapie : une stratégie payante ?	94
4. Biomarqueurs immunologiques de réponse thérapeutique.....	97
Objectifs des travaux de thèse	105
RESULTATS.....	107
PROJET 1	108
PROJET 2	137
PROJET 3 – Résultats préliminaires	201
DISCUSSION	221
1. Immunomonitoring des cancer colorectaux traités par FOLFOX-bevacizumab : impact pronostic des MDSC et des Th17.....	222
2. L’acétylation de STAT3 : une cible prometteuse pour limiter les effets biologiques des Th17.....	227
3. Immunomonitoring des cancers bronchiques non à petites cellules traités par Nivolumab :	232
CONCLUSIONS	237
PERSPECTIVES.....	237
ANNEXES.....	240
BIBLIOGRAPHIE.....	243

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Modèles murins utilisés pour prouver le concept de l'immunosurveillance.....	11
Tableau 2 : Signaux de stress émis en réponse aux dommages à l'ADN et immunité innée.....	15
Tableau 3 : Marqueurs membranaires des cellules MDSC chez la souris et l'homme.....	53
Tableau 4 : Stratégies pharmacologiques permettant de cibler les MDSC dans le cancer.....	54
Tableau 5 : Classification des DAMPs.....	75

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Expériences princeps du concept d'immunosurveillance des tumeurs.....	10
Figure 2 : Immunoediting des tumeurs : preuves expérimentales chez la souris.....	13
Figure 3 : La théorie de l'immunoediting.....	14
Figure 4 : Stress génotoxique et activation de l'immunité innée.....	16
Figure 5 : Origine, compartimentation et homéostasie des lymphocytes T.....	19
Figure 6 : Les lymphocytes T-CD4 ⁺ : polarisation et rôle dans l'élimination.....	22
Figure 7 : Association entre l'infiltration des cellules Thelper et le pronostic dans différents types de cancer.....	23
Figure 8 : Les lymphocytes T-CD8 ⁺ : polarisation et rôle dans l'élimination.....	27
Figure 9 : Les lymphocytes NKT et T $\gamma\delta$ dans le processus d'élimination.....	29
Figure 10 : Stratégie d'échappement au système immunitaire en lien avec les caractéristiques des cellules tumorales.....	32
Figure 11 : Recrutement et propriétés immunosuppressives des cellules T _{reg}	41
Figure 12 : Schémas des mécanismes d'échappement des cellules tumorale à l'action du système immunitaire.....	43
Figure 13 : Mécanismes de recrutement et d'expansion des cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC)	45
Figure 14 : Mécanismes impliqués dans l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale par les MDSC.....	48
Figure 15 : Mécanismes moléculaires impliquant les MDSC et expliquant l'effet ambivalent de la gemcitabine et du 5-FU sur la réponse immunitaire.....	58
Figure 16 : Historique de la biologie des lymphocytes Th17.....	60
Figure 17 : Schémas représentatif des voies de signalisation et de la régulation transcriptionnelle du programme de différenciation des lymphocytes Th17	61
Figure 18 : Structure moléculaire du facteur de transcription STAT3.....	63
Figure 19 : Plasticité des Th17.....	68
Figure 20 : Coordination de la réponse immunitaire anti-tumorale induite par les agents thérapeutiques immunogènes....	76
Figure 21 : Impact des agents cytotoxiques sur les cellules immunitaires suppressives.....	78
Figure 22 : Mécanisme d'immunosuppression induit par la molécule CTLA-4.....	81
Figure 23 : Mécanisme d'immunosuppression induit par la molécule LAG-3.....	82

Figure 24 : Mécanisme d'immunosuppression induit par la molécule Tim-3.....	84
Figure 25 : Mécanisme d'immunosuppression induit par la molécule PD-1.....	85
Figure 26 : Mécanisme de résistance tumorale innée ou acquis qui implique l'axe PD-1/PD-L1.....	86
Figure 27 : Principaux récepteurs inhibiteurs et activateurs impliqué dans la modulation de la réponse lymphocytaire.....	88
Figure 28 : Mécanisme d'immunosuppression induit par l'axe CD39/73 et A2aR.....	89
Figure 29 : Stratégies d'identifications de biomarqueur immunologique en oncologie.....	95

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADCC : Antibody dependant cell cytotoxicity

Ahr: Aryl hydrocarbon receptor

APC: Adenomatous Polyposis Coli

ATRA: acide tout-trans rétinolique

BATF: basic leucine zipper transcription

factor ATF-like

Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large

CBP/p300 : CREB-binding protein/p300

CCR7: C-C chemokine Receptor type 7

CDK: Cyclin-Dependent Kinase

CIA: Collagen-Induced Arthritis

CMH: Complexe Majeur

d'Histocompatibilité

COX: Cyclo-Oxygénase

CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène

CTL: Cytotoxic T Lymphocyte

CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

DC: Dendritic Cell

DMA: Dimethyl amiloride

DMBA: 7, 12-dimethylbenz* α +anthracene

DR: Death Receptor

EAE: Experimental Autoimmune

Encephalomyelitis

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor

FLIP: FLICE-Like Inhibitory Protein

FoxP3: Forkhead box P3

Gfi-1: Growth factor independent 1

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HER2: Human Epidermal Growth Factor

Receptor 2

HIF-1 α : Hypoxia inductible factor 1 alpha

HGFR: Hepatocyte Growth Factor

Receptor

HLA: Human Leucocyte Antigen

HSP: Heat Shock Protein

IDO: Indoleamine 2, 3-dioxygenase

IFN: Interféron

Ig: Immunoglobuline

IRF : Interferon regulatory factor

iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase

IRF4: Interferon Regulatory Factor 4

ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

JAK: Janus Kinase

KIR: Killer-cell Immunoglobulin-like

Receptor

LAG-3: Lymphocyte-activation gene 3

LAMP: Lysosomal-associated membrane protein

LAP: Latency Associated Peptide

L-Arg: L-Arginine

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

LMC: Leucémie Myéloïde Chronique

LMP: Low Molecular mass Polypeptide

LXR: Liver X Receptor

MCA: Methylcholanthrene

MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cell

MICB/A: MHC class I polypeptide-related
sequence B/A

Min: Multiple Intestinal Neoplasia

MIP: Macrophage Inflammatory Protein

MMP9: Matrix Metalloproteinase 9

M-CSF: Macrophage colony-Stimulating
Factor

MUC1: Mucin 1

NFAT : Nuclear factor of activated T-cells

NF-κB: Nuclear Factor-kappa B

NK: Natural Killer

NKT: Natural Killer T

NO: Nitric Oxide

NT: Nitro tyrosine

OSM: Oncostatin M

pAg: phospho-antigène

PBMC : peripheral blood mononuclear cells

pDC: plasmacytoid Dendritic Cell

PERK : protein kinase RNA-like endoplasmic
reticulum kinase

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

PD-L1: Programmed cell death ligand 1

PD-L2: Programmed cell death ligand 2

PGE2: Prostaglandine E2

PIAS: Protein Inhibitors of Activated Stats
Receptor B

PNN: Polynucléaire neutrophile

PTPase: Protein Tyrosine Phosphatases

Rag: Recombination Activating Gene

RNS: Reactive Nitrogen Species

ROR: RAR-related orphan receptors

ROS: Reactive oxygen species

SCF: Stem Cell Factor

SCID: Severe Combined Immunodeficiency
Disorder

SGK1 : Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1

SNAP25 : Synaptosomal-associated protein 25

SOCS: Suppressor Of Cytokine Signalling

STAT: Signal Transducer and Activator of
Transcription

TAM: Tumor-Associated Macrophage

TAP: Transporter associated with Antigen

Processing

TCR: T Cell Receptor

TGF: Transforming Growth Factor

Tim-3: T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3

TLR: Toll Like Receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing

Ligand

Treg: lymphocytes T régulateur

VAMP1 : *Vesicle Associated Membrane Protein 1*

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

INTRODUCTION

I. Cancer et Immunité

« *Les racines du cancer sont dans nos gènes* ». Cette célèbre phrase de Robert A. Weinberg, Professeur au « Massachusetts Institute of Technology » à Boston (États-Unis), résume bien le processus originel de la survenue d'une tumeur : une cellule normale devient cancéreuse suite à une série de mutations qui altère son génome. Au cours de ce processus, appelé oncogenèse, les cellules tumorales acquièrent des propriétés anormales. La cellule devient capable de produire ces propres signaux de survie, d'ignorer les signaux d'inhibition de croissance et d'échapper à la mort cellulaire. Elle adapte aussi son métabolisme pour survivre aux conditions de stress énergétique et environnemental dans le but de se répliquer indéfiniment. La cellule cancéreuse est capable également de modifier son environnement pour favoriser sa propre croissance. Pour cela, elle promeut l'angiogenèse et dégrade la matrice extracellulaire pour envahir d'autres organes (métastases) par la circulation générale et/ou par la destruction de la membrane basale. L'ensemble de ces caractéristiques constitue les « hallmarks » du cancer décrites par Robert D. Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2011). Néanmoins, pour proliférer et former une tumeur cliniquement détectable, les cellules tumorales doivent surpasser un autre système de contrôle : l'immunosurveillance. Cette surveillance implique la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire qui les perçoit comme du « non soi » et qui assure leur élimination.

1. Le concept de l'immunosurveillance

a) *Arguments expérimentaux chez la souris : un siècle de recherche !*

C'est au début du XX^{ème} siècle que Paul Ehrlich émet pour la première fois l'hypothèse selon laquelle le système immunitaire pourrait protéger l'organisme de la survenue d'un cancer. Il envisagea même l'existence des antigènes tumoraux, autrement dit les antigènes du « soi modifié », mais, par manque de connaissance en immunologie fondamentale et sans modèles appropriés, cette hypothèse resta longtemps inexplorée (P Ehrlich, 1909). Néanmoins, la découverte du phénomène de rejet de greffe par Peter Medawar dans les années 50 jeta le doute sur l'existence réelle d'une réaction immunitaire spécifique à la tumeur. A l'époque, on pensait que la réponse immunitaire induite par l'injection de cellules tumorales dérivait d'une réaction « anti-greffon », plutôt que d'une réponse contre les antigènes tumoraux. Il fallut attendre l'utilisation des modèles de souris syngéniques (souris de fond génétique identique) pour que l'on puisse démontrer que les cellules tumorales possèdent des propriétés immunologiques différentes des cellules normales. C'est en 1964, que Lloyd John Old et Edward Boyse ont montré que l'on pouvait prévenir la survenue d'un

cancer chimio-induit en vaccinant les souris à l'aide d'un sérum issu de souris consanguines déjà porteuses de tumeur. Ces résultats indiquaient la présence dans le sérum d'immunoglobuline « anti-cellules tumorales », autrement dit « anti-antigènes tumoraux » (Old & Boyse, 1964). Cette démonstration d'une immunisation possible vis-à-vis d'une greffe syngénique de cellules tumorales est la base de la théorie de l'immunosurveillance proposé par Mac Farlane Burnett et Lewis Thomas quelques années auparavant (Burnet, 1957a ; Thomas *et al*, 1959). Cette découverte suggérait l'existence de lymphocytes T spécifiques d'antigènes tumoraux capables de contrôler la progression tumorale (Burnet, 1957b). Ces travaux suscitèrent l'enthousiasme de la communauté scientifique et les recherches sur l'immunosurveillance du cancer se sont accélérées. Pour confirmer et mieux comprendre les mécanismes de ce processus, de nombreux groupes de recherche ont alors mis en place des modèles de souris syngéniques immunodéficientes. L'immunosuppression était induite par injection d'un sérum hétérologue « anti-lymphocyte », par thymectomie, ou encore à l'aide d'agents pharmacologiques (Grant & Miller, 1965; Stutman, 1975 ; Nishizuka *et al*, 1965). D'autres équipes de recherche, notamment celle d'Osias Stutman mirent en place un modèle de souris athymique « *Nude* CBA/H », *a priori* totalement dépourvu de lymphocytes (Pantelouris, 1968). Mais l'enthousiasme des chercheurs laissa vite place à la déception. Ces modèles ne montrèrent aucune différence de sensibilité à une carcinogenèse chimique comparativement aux souris immunocompétentes (Stutman, 1974). Le concept d'immunosurveillance fut alors très critiqué et de nombreux chercheurs pensaient même que le système immunitaire avait plutôt un effet néfaste en favorisant l'inflammation (Rygaard & Povlsen, 1974). Il fallut attendre plusieurs années pour comprendre la contradiction entre ces résultats et ceux obtenus par l'équipe de Mac Farlane Burnett. En réalité, les souris thymectomisées ou traitées par un sérum « anti-lymphocyte » étaient extrêmement sensibles aux infections virales, ce qui favorisait l'apparition de cancers viraux-induits et de lymphomes induits par l'hyperstimulation bactérienne et virale. Par ailleurs, il a été démontré que les souris athymiques *Nude* CBA/H exprimaient l'isoforme la plus active de l'aryl-hydroxylase, les rendant plus sensibles au méthylcholanthrène (MCA) que les souris sauvages. On sait également aujourd'hui que les lymphocytes NK (« Natural Killer ») proviennent majoritairement de la moelle osseuse et qu'une faible proportion d'entre eux passent par le thymus pour leur développement (Ribeiro V *et al*, 2010). Les souris *Nude* CBA/H n'étaient donc absolument pas totalement dépourvues de lymphocytes (Maleckar & Sherman, 1987; Ikehara S *et al*, 1983). Le manque de connaissance et d'outils en immunologie n'a donc pas permis à l'époque d'établir expérimentalement l'existence de l'immunosurveillance.

Il fallut attendre les années 90 pour mettre en évidence le premier antigène tumoral humain, l'antigène MZ2-E dans le mélanome, capable d'induire une réaction lymphocytaire T cytotoxique *via*

le HLA-A1 (van der Bruggen *et al*, 1991). Cette découverte historique prouva pour la première fois la capacité des cellules du « soi-transformé » à induire une réponse immunitaire spécifique de l'antigène. Les avancées dans le domaine du génie génétique mirent à disposition des modèles murins transgéniques immunodéficients, ainsi que des anticorps monoclonaux capables de neutraliser la fonction biologique de cytokines ou de populations lymphocytaires. Grâce à ces nouveaux moyens technologiques, les expériences de carcinogenèse chimio-induite ont pu être à nouveau réalisées. Ces manipulations ont cette fois-ci solidement prouvé que les souris immunodéficientes développaient des tumeurs plus rapidement que les souris immunocompétentes (Figure 1).

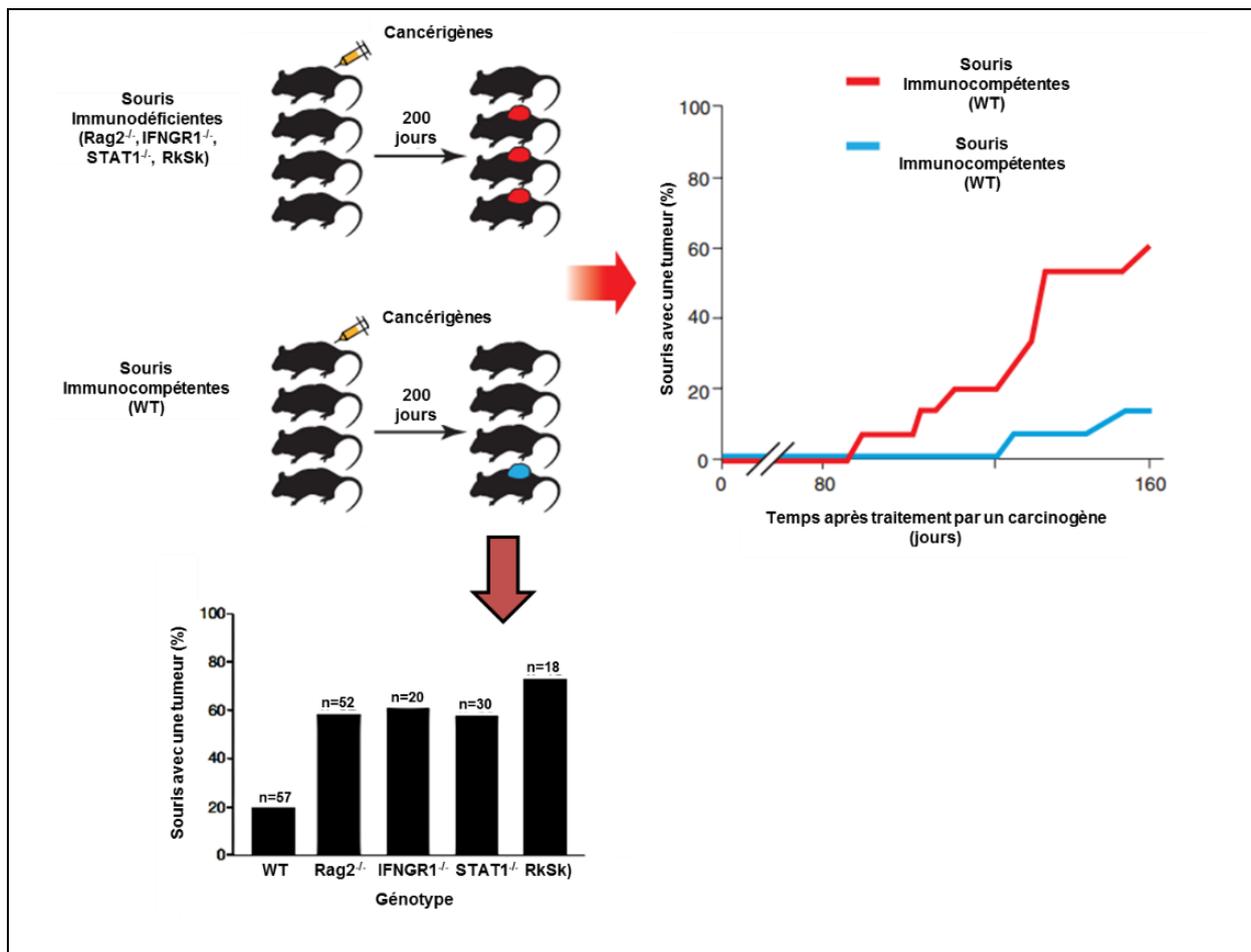


Figure 1 : Expériences principes du concept d'immunosurveillance des tumeurs.

Des expériences menées sur des souris immunodéficientes (Rag2^{-/-}, IFNGR1^{-/-}, STAT1^{-/-}, RkSk) ont montré qu'elles étaient plus sensibles aux agents chimiques cancérigènes tels que le MCA (Méthylcholanthrene) ou l'association DMBA/TPA (7,12-Dimethylbenz[a]anthracene/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) que des souris immunocompétentes (WT). Adapté de R. D Schreiber *et al*, 2011.

L'équipe de Rober D. Schreiber a notamment pu montrer le rôle fondamental de l'IFN γ dans le rejet des tumeurs transplantées (Kaplan *et al*, 1998). Elle a également prouvé que les souris qui ne possèdent pas la capacité à répondre à l'IFN γ (souris IFNGR1^{-/-} et STAT1^{-/-}), ou qui n'ont pas de

système immunitaire adaptatif fonctionnel ($Rag2^{-/-}$), sont plus susceptibles à la formation de cancers chimio-induits (Shankaran *et al*, 2001)(Figure 1). En parallèle, d'autres équipes de recherche ont pu confirmer ces résultats et le concept de l'immunosurveillance a été définitivement accepté par la communauté scientifique (Tableau 1).

Tableau 1 : Modèles murins utilisés pour prouver le concept de l'immunosurveillance. Adapté de Schreiber *et al*, 2011

	Modèle	Statut Immunitaire	Sensibilité aux tumeurs chimio-induites (versus souris sauvage)
Souris Transgéniques	$Rag1^{-/-}$ et $Rag2^{-/-}$	Perte des L_T T, B, NKT	↗ Sarcome induit par le MCA ↗ Cancers intestinaux
	$Stat1^{-/-} Rag2^{-/-}$ (RkSk)	Perte des L_T T, B, NKT, insensibilité à l'IFN- γ / α/β	↗ Sarcome induit par le MCA ↗ Cancers intestinaux
	$Tcrb^{-/-}$	Perte des L_T T $\alpha\beta$	↗ Sarcome induit par le MCA
	$Tcrd^{-/-}$	Perte des L_T T $\gamma\delta$	↗ Sarcome induit par le MCA
	$Tcrb^{-/-} Tcrd^{-/-}$	Perte des L_T T $\gamma\delta$ et T $\alpha\beta$	↗ Sarcome induit par le MCA ↗ Tumeur cutanée (DMBA + TPA)
	$Cd80^{-/-} Cd86^{-/-}$	Perte de l'expression de CD80/86	↗ Tumeur cutanée induites par les UV
	$Ifngr1^{-/-}$	Perte de la sensibilité à l'IFN- γ	↗ Sarcome induit par le MCA
	$Ifnar1^{-/-}$	Perte de la sensibilité à l'IFN- α/β	↗ Sarcome induit par le MCA
	$Stat1^{-/-}$	Perte de la sensibilité à l'IFN- γ / α/β	↗ Sarcome induit par le MCA
	$Socs1^{-/-}$	Perte du rétrocontrôle négatif sur Stat1	↗ Colite inflammatoires et cancer colique
	$Ifng^{-/-}$	Perte de la production d'IFN- γ	↗ Sarcome induit par le MCA ↗ Cancer Bronchique spontané
	$Ifng^{-/-} Pfp^{-/-}$	Perte de la production d'IFN- γ et de Perforine	↗ Sarcome induit par le MCA ↗ Lymphome disséminé spontané
	$Pfp^{-/-} b2m^{-/-}$	Perte de la production Perforine et du CMH-I	↗ Lymphome disséminé spontané
	$Pfp^{-/-}$	Perte de la production Perforine	↗ Sarcome induit par le MCA ↗ Lymphome disséminé spontané
	$Trail^{-/-}$	Perte de la production de la cytokine TRAIL	↗ Sarcome induit par le MCA ↗ Lymphome disséminé spontané
	$IL-12\alpha^{-/-}$	Perte de la production de la cytokine IL-12a	↗ Tumeur cutanée (DMBA + TPA)
	$IL12b^{-/-}$	Perte de la production de la cytokine IL-12 et IL-23	↗ Sarcome induit par le MCA ↘ Tumeur cutanée (DMBA + TPA)
	$IL-23\alpha^{-/-}$	Perte de la production de la cytokine IL-23a	↘ Tumeur cutanée (DMBA + TPA)
$Tnf^{-/-}$	Perte de la production de la cytokine TNF	↘ Tumeur cutanée (DMBA + TPA)	
Anticorps neutralisant	Ac anti-NK1.1	Absence de cellules NK et NKT	↗ Sarcome induit par le MCA
	Ac anti-TRAIL	Neutralisation de TRAIL	↗ Sarcome induit par le MCA
	Ac anti-CD4/CD25	Absence de cellules Treg	↘ Sarcome induit par le MCA
	Ac anti-IFN- γ	Neutralisation de l'IFN- γ	↗ Sarcome induit par le MCA

b) Arguments chez l'homme : les déficits immunitaires innée ou acquis

Le concept d'immunosurveillance chez l'homme a pu être prouvé grâce aux études épidémiologiques concernant les patients immunodéprimés. En effet, ces études ont révélé que le

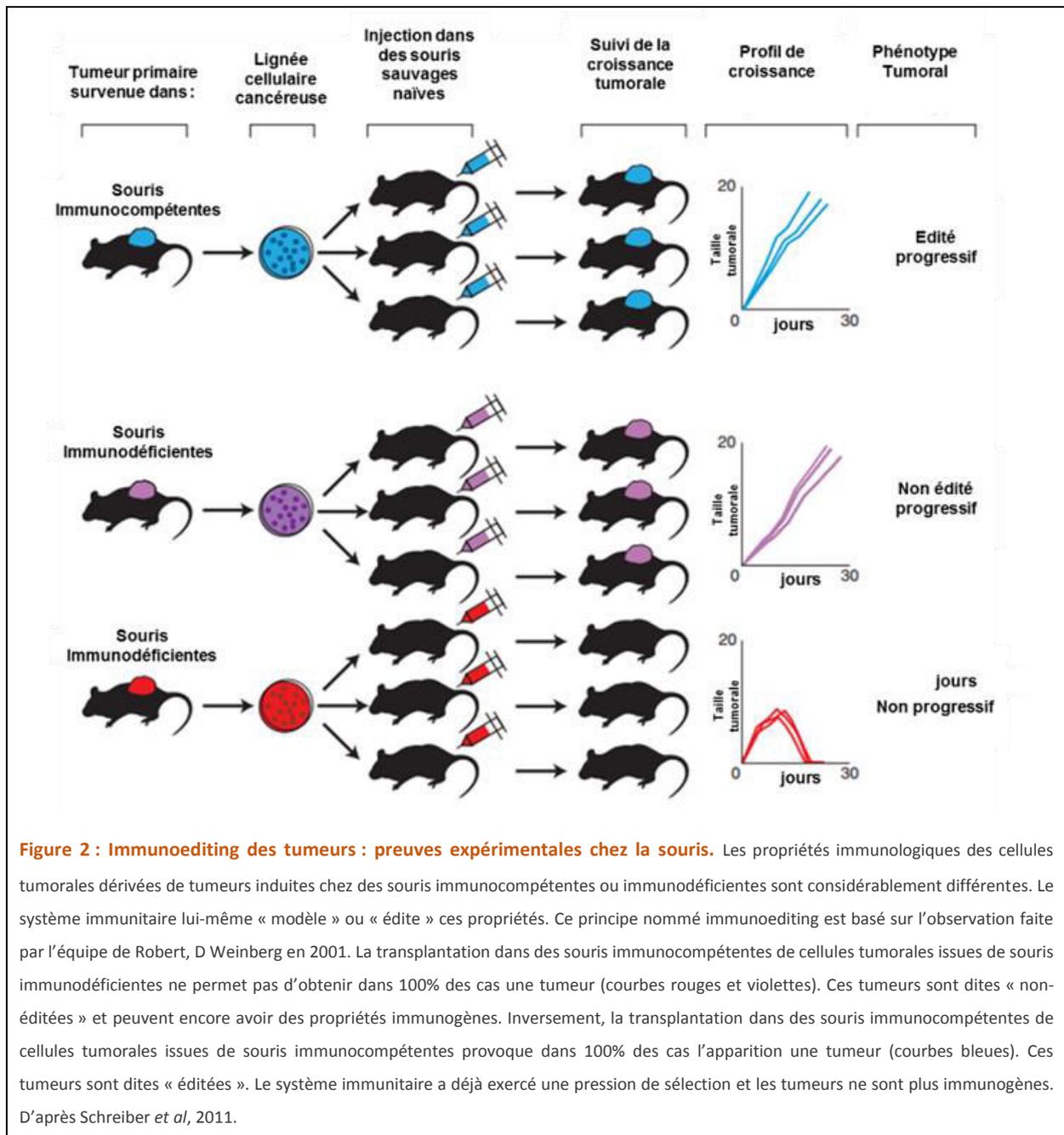
patient immunodéprimé avait un risque accru de développer un cancer. Comme dans les modèles murins génétiquement modifiés, les patients porteurs de déficits immunitaires primaires (DIP) possèdent une susceptibilité plus importante de développer un cancer. Ces patients sont plus particulièrement sensibles aux cancers viro-induits : lymphomes non Hodgkiniens (induit par le virus Epstein-Barr, EBV), sarcome de Kaposi (induit par le virus de l'herpès humain 8, HHV8) et cancers uro-génitaux (induit par les papillomavirus humains (HPV) (Pardoll, 2003). Les personnes atteintes de déficit immunitaire secondaire (DIS) sont aussi susceptibles de développer un cancer plus rapidement que les personnes immunocompétentes. On sait aussi maintenant que les traitements ciblant le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α) et méthotrexate, utilisés pour leur effet immunosuppresseur afin de lutter contre les maladies inflammatoires chroniques (polyarthrite rhumatoïde, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, lupus érythémateux disséminé) ou le rejet de greffe, sensibilisent l'organisme à l'oncogenèse (Costa L *et al*, 2016). Il en est de même pour les patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), qui petit à petit perdent la protection des lymphocytes T-CD4⁺.

Par ailleurs, les personnes porteuses de mutations génétiques au niveau des séquences d'ADN codantes pour des protéines impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN ou dans la mise en place des signaux d'alerte du système immunitaire possèdent un risque accru de développer un cancer. Dans ce cas, les patients ne souffrent pas d'un déficit immunitaire à proprement parlé, mais d'un déficit d'activation de celui-ci. On peut penser notamment au polymorphisme des récepteurs NKG2D (« Natural Killer Group 2D ») ou KIRs (« Killer-cell immunoglobulin-like receptors ») qui contrôlent l'activation des cellules NK. De même, certaines mutations entraînent une perte fonctionnelle de la protéine Fas-ligand (FasL) qui empêche la destruction des cellules tumorales par les lymphocytes.

2. Le concept d'immunoediting

Le diagnostic d'un cancer chez un individu immunocompétent (majorité des cas au moment du dépistage chez l'homme) indique que certaines cellules malades peuvent se développer malgré la surveillance permanente du système immunitaire. Cette observation indique donc que l'action du système immunitaire peut être surpassée et/ou limitée dans le temps. Néanmoins, par quels mécanismes est-il possible de surpasser l'action d'un système immunitaire « en bonne santé » ? La réponse à cette question a été en partie donnée par les résultats expérimentaux de l'équipe de Schreiber (Figure 2). Dans cette étude, des tumeurs chimio-induites (MCA) issues de souris immunodéficientes (Rag2^{-/-}) ont été réinjectées dans des souris immunocompétentes. Dans ce cas, 40% des souris ont montré un développement de leur tumeur. Inversement, des cellules tumorales

issues de souris immunocompétentes ont été réinjectées dans des souris immunodéficientes ($Rag2^{-/-}$). Cette fois, 100% des souris $Rag2^{-/-}$ ont développé une tumeur (Figure 2).



Ces observations indiquent donc que la tumeur d'une souris qui ne possède pas de système immunitaire fonctionnel est plus immunogène qu'une tumeur similaire mais formée dans une souris immunocompétente (Shankaran *et al*, 2001). Le système immunitaire joue donc un double jeu. Il protège l'hôte mais en contrepartie, il exerce une pression de sélection sur les cellules tumorales qui les oblige à trouver un moyen (la perte de leur immunogénicité) pour échapper à sa surveillance. Cette nouvelle notion, celle que le système immunitaire ne fait pas que protéger l'hôte mais

également « sculte » l'immunogénicité de la tumeur est la base de la théorie de l'« immunoediting » (Dunn *et al*, 2002). Le concept d'immunosurveillance a donc été repensé, laissant place à celui de « l'immunoediting », qui définit les relations qu'entretiennent les cellules tumorales et le système immunitaire au cours du temps. Cette théorie « découpe » ce processus selon trois phases : l'élimination, l'équilibre, et l'échappement (Figure 3).

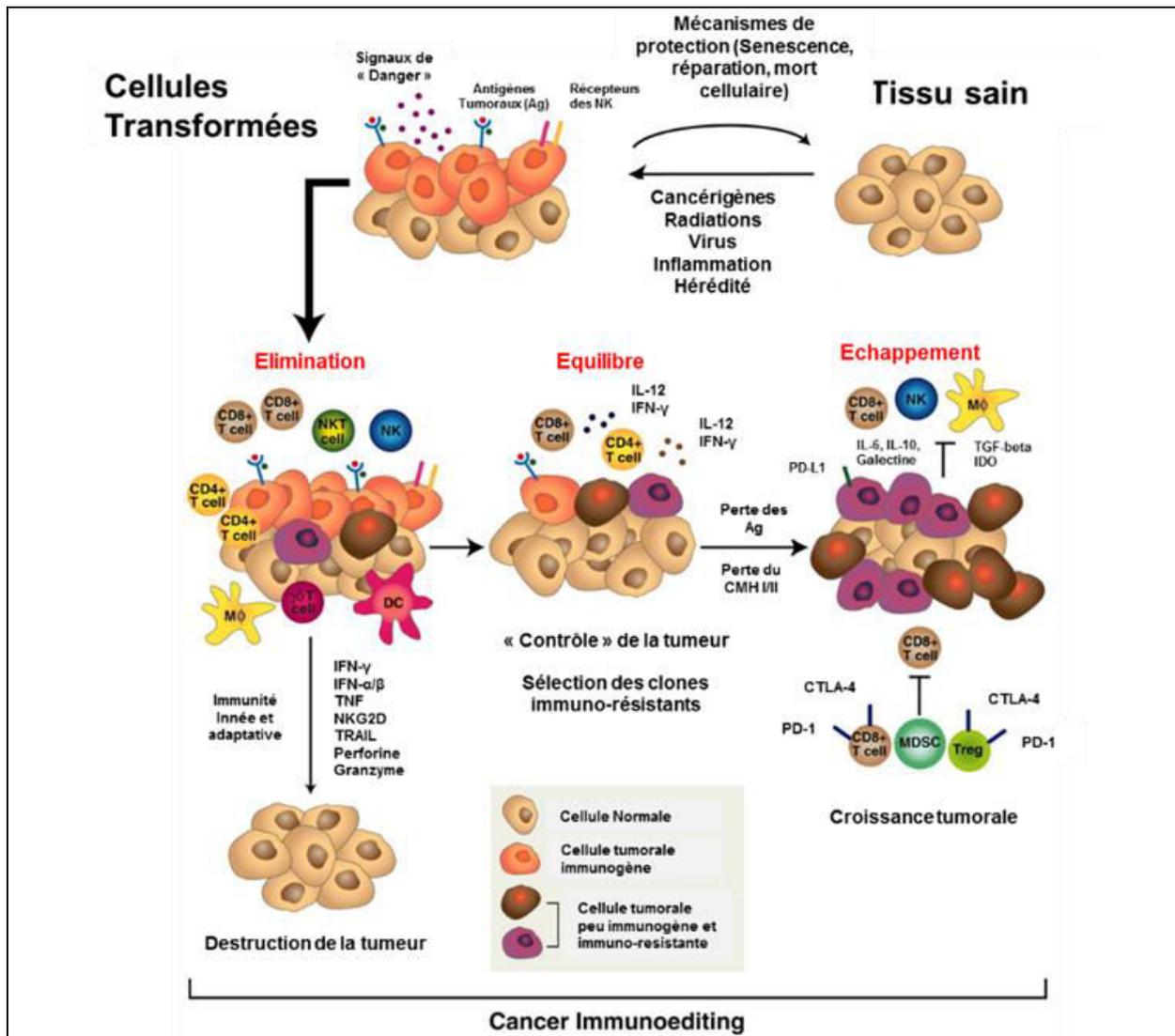


Figure 3 : La théorie de l'immunoediting. La théorie de l'immunoediting se décompose en trois phases qui se succèdent dans le temps : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. Au moment de la transformation cellulaire induite par des agents mutagènes (cancérogènes, radiations, virus, inflammation chronique) les cellules vont émettre et/ou exprimer des protéines capables d'alerter et d'activer le système immunitaire. Elles vont produire en quantité importante dans le milieu extracellulaire des molécules de dangers (cytokines inflammatoires, chimiokines, ATP, HMGB1), exprimer à leur surface des récepteurs activateurs des lymphocytes NK (MICA/B, ULBP1-6) et exposer *via* le CMH-I des antigènes du soi modifié (antigènes tumoraux) pour être reconnus par les lymphocytes T CD8. L'ensemble de ces signaux va favoriser le recrutement des cellules de l'immunité innée (Cellules Dendritiques, Macrophages) qui stimuleront l'immunité adaptative (Lymphocyte T CD8+, CD4+, NKT, B). Cette première phase permet l'élimination des cellules tumorales immunogènes par le système immunitaire. La tumeur peut ensuite entrer dans une longue phase d'équilibre avec le système immunitaire adaptatif. Une balance se crée entre la destruction des clones immunogènes (par exemple : CMH-I⁺, PD-L1⁻, sensible à l'IFNγ, ...) et la sélection des clones non immunogènes (par exemple : CMH-I⁻, PD-L1⁺, insensible à l'IFNγ, ...). Les clones non immunogènes finissent par

échapper à l'action du système immunitaire, qui devient lui-même permissif voire promoteur de la croissance tumorale. En effet, lors de la phase d'échappement, l'infiltration de lymphocytes T régulateurs (CTLA4⁺, PD-1⁺) ou de MDSC, favorise l'immunosuppression et l'émergence d'une maladie cliniquement apparente. D'après Schreiber et al, 2011.

3. La phase d'élimination

a) Stress génotoxique et activation de l'immunité innée

(i) Systèmes intrinsèques d'alerte

La transformation cellulaire est un ensemble de processus biologiques qui conduit une cellule saine à devenir cancéreuse. Le point de départ de ce processus se trouve dans le noyau des cellules. Le génome présent dans celui-ci risque à tout moment d'être endommagé par différents agents chimiques, physiques ou infectieux et conduire à des mutations génétiques. Si ces mutations surviennent au niveau des gènes qui régulent les processus de prolifération et/ou de survie (*KRAS*, *BRAF*, *EGFR*, *HER2*), de mort cellulaire et de réparation de l'ADN (*P53*, *ATM*, *BRCA1/2*), celle-ci peut alors se transformer.

Il existe néanmoins des mécanismes intrinsèques qui limitent le processus de transformation. La cellule peut à tout moment induire un « *Cell Cycle Checkpoint* » qui stoppe sa progression dans le cycle cellulaire et qui lui laisse le temps de réparer son ADN. La cellule utilise alors différents mécanismes en fonction du type de mutation : excision des bases (« *Base Excision Repair* » BER) et des nucléotides (« *Nucleotide Excision Repair* » NER) mutés, ou encore réparation des mésappariements de base (MMR). A l'heure actuelle, six mécanismes de réparation de l'ADN sont décrits, sans compter les systèmes de réparation épigénétique (Pestov *et al*, 2015).

En cas de dommages trop importants ou de dommages touchant aux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (*BRCA1/2*, *MSH2/3/6*, *MLH1/2*) la cellule peut activer des voies de signalisation qui conduisent à la sénescence ou à la mort cellulaire programmée (apoptose). Ces mécanismes finement régulés ne sont pas infaillibles et peuvent être dans certains cas défectueux (Hanahan & Weinberg, 2011). En effet, la perte antérieure d'une ou plusieurs protéines impliquées dans la régulation de la balance apoptose/prolifération (*P53*, *P21*, *P16*, *APC*) peut favoriser l'accumulation des dommages et surtout la survie des cellules transformées. Ce processus est typique de l'oncogenèse des cancers coliques avec instabilité des microsatellites (MSI), caractérisée par une succession de perte ou d'activation de protéines (APC-EGFR-KRAS-P53 + perte du système de réparation de l'ADN (*MSH2/3/6*, *MLH1/2*)) (Allan & Travis, 2005). A ce niveau, la surveillance du système immunitaire est indispensable pour contrer le processus oncogénique.

(ii) *Recrutement et activation des lymphocytes NK et des cellules dendritiques*

Le système immunitaire est capable de détecter les signaux de stress émis par les cellules génétiquement modifiées (Tableau 2).

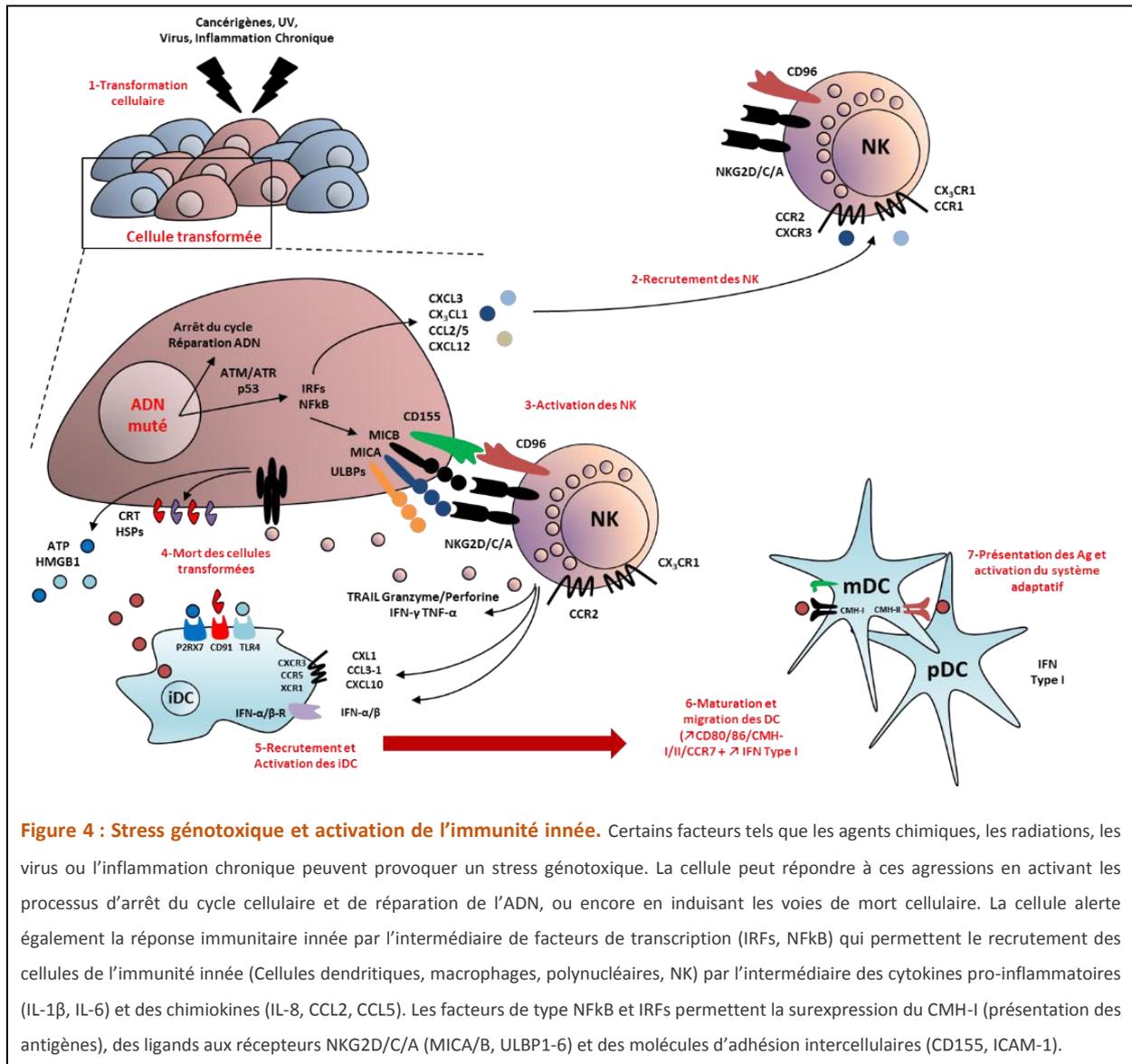
Tableau 2 : Signaux de stress émis en réponse aux dommages à l'ADN et immunité innée. D'après Cerboni *et al*, 2014.

Agents mutagènes	Senseurs	Modèles Cellulaires	Ligands Induits	Effets Biologiques
Agents cancérogènes, radiations, virus, radicaux oxygénés	?	Cellules souches hématopoïétiques	CXCL12	Recrutement NK
	?	Cellules du système nerveux central	CX ₃ CL1	
	ATM,ATR	Lymphocytes T	MICA	Ligands ou cytokines activateurs des NK
	ATM,ATR	Lymphocytes T	PVR (CD155)	
	ATM	Macrophage	MICA	
	ATR	Lymphocytes T	Ligand NKG2D	
	ATR	Lymphocytes T	PVR (CD155)	
	ATM, AT, Chk1	Hépatocarcinome	MICA/B	
	ATM	Hépatocarcinome	MICB	
	ATM,ATR	Cancer du colon, col de l'utérus, leucémie	ULBP2	
	ATM, Chk2	Myélome multiple	MICA	
	ATM, ATR	Myélome multiple	MICA/B, ULBP1/2/3	
	ATM, ATR	Sarcome de Ewing	MICB	
	ATM, Chk2	Cancer du colon	MICA/B, ULBP1/2/3	
	p53	Cancer bronchique	ULBP1/2	
	p53	Cancer du colon et du sein	ULBP2	
	ATM, Chk1	Cancer de l'ovaire (souris)	RAE-1	
	ATM	Leucémie à cellules B (souris)	PVR (CD155)	
	PERK/eIF2α	Cancer du sein, colon, poumons	Calreticuline	Recrutement maturation des iDC
	ATM/ATR	Cancer du sein, colon, poumons	HMGB1	
PERK/eIF2α/ATG5/7	Cancer du sein, colon, poumons	ATP		
ATM/p53	Cancer du sein, colon, poumons	HSPs		
ATM/p53	Cancer du sein	CCL2/CXCL10		

Suite aux dommages génétiques, les protéines ATM (« *Ataxia Telangiectasia Mutated* ») et ATR (« *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein* ») ou encore p53 vont activer de façon concomitante les systèmes de réparation et d'alerte du système immunitaire. Pour ce faire, le système ATM/ATR induit l'expression des facteurs de transcription de type IRF (« *Interferon Regulatory Factors* »)(en particulier IRF-1/3/7) (Pamment *et al*, 2002). Ils peuvent également induire la voie NFκB (« *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells* »). Cette activation est indispensable à l'expression de chimiokines (CCL2, CCL5, CXCL12, CCL3, CX₃CL1) et de cytokines inflammatoires (IFNβ, IL-1β, IL-6) (Tang *et al*, 2014; Wan *et al*, 2012) qui favorisent respectivement l'infiltration et l'activation des cellules immunitaires (lymphocytes T effecteurs, Treg, NK, monocytes, MDSC, cellules dendritiques) qui expriment les récepteurs pour CCL3 et CX₃CL1 (CCR2 et CX₃CR1). D'autre part, il est clairement établi que le stress génotoxique induit par certains virus ou par des agents mutagènes favorise l'expression membranaire des ligands activateurs (MICA/B, ULBP1-6, CD155) des récepteurs NKG2A/D/C présents sur les NK (Cerboni *et al*, 2014; Gorgoulis *et al*, 2003). Ils induisent aussi les molécules d'adhésion intercellulaires (Nectine-2, ICAM-1) qui stabilisent les

interactions cellules tumorales/NK (Gonzalez *et al*, 2008) (Figure 4). La fixation de ces ligands sur les NK va conduire à leur activation. Les NK vont déverser dans le milieu extracellulaire le contenu de leurs granules cytotoxiques contenant des enzymes (perforine, granzyme) ou des protéines pro-apoptotiques (IFN γ , TNF α), ce qui permettra d'induire la mort des cellules transformées (Moretta, 2002). Il est également important de noter que la voie des dommages à l'ADN permet l'induction des gènes impliqués dans le traitement (protéasome, tapasine, calnexine) et la présentation (CMH-I, β 2-microglobuline) des antigènes tumoraux par les cellules tumorales (Hobart *et al*, 1996). Ce mécanisme sera indispensable pour le bon déroulement de la réponse immunitaire adaptative (Tang *et al*, 2014).

L'activation locale des NK va promouvoir la production de chimiokines (XCL1, CCL3-5, CXCL10) et d'interféron de type 1 (INF- α/β), permettant de recruter et d'activer les cellules dendritiques (XCR1⁺, CCR5⁺ et CXCR3⁺). De plus, la mort des cellules tumorales induite par les NK va renforcer le signal d'activation par la libération de protéines ou de molécules dites « immunogènes » (Calréticuline, ATP, HMGB1, Protéines de choc thermique (HSPs)), capables de se fixer sur les DC (respectivement CD91, P2RX7, TLR2 et TLR4) (Kroemer *et al*, 2015). Associée à ces signaux de stimulation, l'endocytose des antigènes tumoraux présents dans le microenvironnement tumoral va permettre la maturation des DC et leur migration dans les organes lymphoïdes afin d'induire une réponse immunitaire spécifique des antigènes tumoraux dite réponse adaptative.



(iii) Dialogue entre l'immunité innée et adaptative

Au moment de leur activation, les DC vont exprimer la protéine CCR7, ce qui leur permet de rejoindre les organes lymphoïdes dans le but d'activer les cellules de l'immunité adaptative (Lymphocyte T, B et NKT). Au cours de ce processus de migration, les cellules dendritiques vont commencer leur maturation qui implique trois étapes majeures. Premièrement, elles acquièrent la capacité à présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T naïfs présents dans les organes lymphoïdes. Les cellules dendritiques sont « les » cellules présentatrices d'antigènes (CPA) par excellence. En effet, ce sont les seules cellules de l'organisme à être capable de présenter les antigènes extracellulaires sur les molécules du CHM-I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type 1), d'ordinaire présentés sur le CMH-II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type 2). Cette propriété, appelée « cross-présentation », est essentielle pour induire une réponse antitumorale. En effet, elle permet d'induire une réponse spécifique de l'antigène à la fois *via* les lymphocytes T-CD8

(dépendante du CMH-I) et les T-CD4 (dépendante du CMH-II). Il est aussi important de préciser que les cellules dendritiques peuvent présenter les antigènes de type lipidiques *via* le CD1d et permettre une réponse *via* les lymphocytes NKT. Deuxièmement, les DC vont exprimer des molécules de co-stimulation (CD80/86, CD137-L, OX40-L, CD70, GITR-L, etc.). Ces signaux sont indispensables pour induire et orienter les réponses effectrices. L'absence de ces molécules au moment de l'activation du TCR (« *T Cell Receptor* ») induira une réponse de type anergique ou de type tolérogène. Enfin, en fonction de la stimulation qu'elles auront reçues, les cellules dendritiques devront produire des cytokines capables d'orienter les réponses effectrices vers différents sous-groupes : réponse Th1, Th2, Th17, T_{FH}, CD8/NK cytotoxique ou encore T_{Reg}. Il est important de préciser que l'orientation vers le sous-type T_{FH} permettra de soutenir la maturation des lymphocytes B et donc la production d'anticorps spécifiques des cellules tumorales. Ce mécanisme soutient donc indirectement les mécanismes de mort induite par les anticorps (« *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity* » ADCC) et par l'activation du complément (« *Complement Dependent Cytotoxicity* » CDC).

Chez l'homme, les DC myéloïdes (mDC ou DC conventionnelles) et les DC plasmacytoïdes (pDC) sont deux grands sous-types de cellules dendritiques. Les mDC expriment le CD11c (ICAM-1), elles dérivent de précurseurs myéloïdes et incluent les DC cutanées, les cellules de Langerhans et les DC interstitielles. Elles sont présentes dans les tissus, le sang et les organes lymphoïdes. On distingue deux grandes familles de mDC : les mDC CD1c⁺ (DBCA1) et les mDC CD141⁺ (DBCA3). Elles ont un rôle plus important dans la présentation des antigènes tumoraux. Les mDC sécrètent les cytokines qui orientent vers une réponse Th1 (IL-12, IL-23, IL-27, IFN- α/β et ICAM-1) et une réponse NK/CD8 cytotoxique (IL-15, IL-12). Les pDC, qui chez l'homme expriment le CD123, sont quant à elles plutôt décrites à l'origine dans la réponse contre les bactéries et les virus, notamment parce qu'elles sécrètent de grandes quantités d'interféron de type 1 (IFN- α/β) après activation des TLR7 et 9. Néanmoins, leur capacité à produire de l'IFN α et β permet de soutenir l'activation des NK, des CD8 et aide les mDC à produire de l'IL-12. Cette capacité leur permet donc de maintenir une réponse de type mémoire et de prolonger la réponse anti-tumorale (Alfred M *et al*, 2011).

(iv) **Activation de l'immunité adaptative : les lymphocytes T conventionnels**

Les lymphocytes T matures naïfs (qui n'ont jamais été en contact avec un antigène) sont issus de précurseurs présents dans le thymus qui dérivent de la différenciation hématopoïétique de la lignée lymphoïde. La famille des lymphocytes T conventionnels est constituée de deux grandes familles, les lymphocytes de type CD4⁺ et de type CD8⁺. Ces deux familles ont en commun l'expression de marqueurs dit « pan-T » tels que le CD2, le CD3, le CD5, le CD7 et l'expression d'un TCR constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β . Les lymphocytes T conventionnels ont la capacité, *via* leur TCR, de reconnaître les peptides antigéniques présentés par les cellules présentatrices

d'antigènes. Les lymphocytes T-CD4⁺ reconnaissent les antigènes présentés par les complexes peptides/CMH-II. Cette famille de lymphocytes T est très hétérogène. Elle est constituée de cellules qui peuvent avoir des fonctions très différentes les unes des autres voire même des fonctions antagonistes. D'une manière générale, les T-CD4⁺ permettent d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse à médiation cellulaire (Th1, Th17, Th9 : activation des NK/CD8 cytotoxiques) ou vers une réponse de type humorale (Th2, T_{FH} : activation des cellules B). Ils permettent également de stopper la réponse inflammatoire ou d'induire une réponse tolérogène contre certains antigènes, afin de limiter les dommages tissulaires qui pourraient être provoqués par une inflammation chronique (T_{reg} : inhibition des autres sous-types T-CD4, T-CD8, NK, NKT). Les lymphocytes T-CD8⁺ reconnaissent quant à eux les antigènes présentés par les complexes peptide/CMH-I. Cette famille est beaucoup moins hétérogène que les T-CD4⁺. D'une manière générale, ces lymphocytes ont un rôle cytotoxique direct à l'encontre des cellules transformées ou des cellules infectées par les virus ou les pathogènes intracellulaires.

Les cellules T se différencient à partir de cellules T-CD4⁺ ou T-CD8⁺ matures naïves (CD45RA⁺, CD45RO⁻) produites au sein du thymus. Grâce à l'expression du récepteur aux chimiokines CCL19 et CCL21 (CCR7), elles migrent et circulent au niveau des organes lymphoïdes secondaires. L'expression du CD62L (L-sélective) permet également l'entrée dans les organes lymphoïdes en favorisant l'adhésion aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Au moment de l'activation par les cellules présentatrices d'antigènes, les cellules T peuvent se différencier en différents sous-types (mémoire ou effecteur). Le phénotype, la fonction et la localisation de ces cellules peuvent être très différents. En fonction de l'environnement cytokinique, de l'intensité des signaux induits par le TCR et les molécules de co-stimulation, quatre sous-types différents d'un point de vue fonctionnel et phénotypique peuvent être identifiés (Gattinoni *et al*, 2011) (Figure 5).

Le premier est un sous-type décrit récemment, les cellules souches mémoires (MS : CD45RA⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD28⁺, IL-7Rα⁺). Comme les cellules souches « classiques », elles sont capables d'autorenouveau et représentent une réserve en cellules T, capables de proliférer très rapidement en cas d'agression. Elles sont majoritairement présentes dans les organes lymphoïdes et le sang. Elles sont capables de produire de grande quantité d'IL-2, mais ne produisent pratiquement pas de cytokines telles que le TNFα ou l'IFNγ. Le second sous-type est représenté par les cellules centrales mémoires (CM : CD45RA⁻, CCR7⁺) qui résident et circulent au niveau des ganglions lymphatiques. Elles ont également de grandes capacités de prolifération et permettent de mettre en place une réponse immunitaire secondaire en cas de nouveau contact avec un antigène. Elles produisent également de grandes quantités d'IL-2. Le troisième sous-type est représenté par les cellules effectrices mémoires (EM). Elles peuvent être de deux types différents : les EM : CD45RA^{-/int},

CCR7⁻ et les EMRA : CD45RA⁺, CCR7⁻. Les cellules EMRA sont plus avancées en termes de maturation et d'activation que les cellules EM CD45RA^{-/int}. Néanmoins, ces deux sous-groupes ont la capacité une fois activés de migrer vers les tissus. Elles produisent de grandes quantités de cytokines et induisent par dégranulation la mort des cellules cibles, mais elles ne prolifèrent plus. Le dernier sous-groupe, est lui représenté par les cellules effectrices mémoires résidentes (EMR : CD45RA⁻, CCR7⁺), présentes uniquement dans les tissus. Le type d'organe dans lequel la migration de ces cellules aura lieu dépend des récepteurs présents à la surface des cellules effectrices. L'expression de CCR4 et de CCR10 sera en faveur de la migration vers la peau, alors que l'expression de CCR6 ou de CCR9 permettra plutôt respectivement une migration vers les muqueuses bronchiques et intestinales. Une fois dans les tissus, les cellules résidentes jouent un rôle majeur dans l'élimination des cellules infectées et des cellules tumorales ou encore dans la clairance des microorganismes. Comme les EM et les EMRA, elles produisent de grandes quantités de cytokines et peuvent être cytotoxiques. Néanmoins elles ont perdu leur capacité à proliférer.

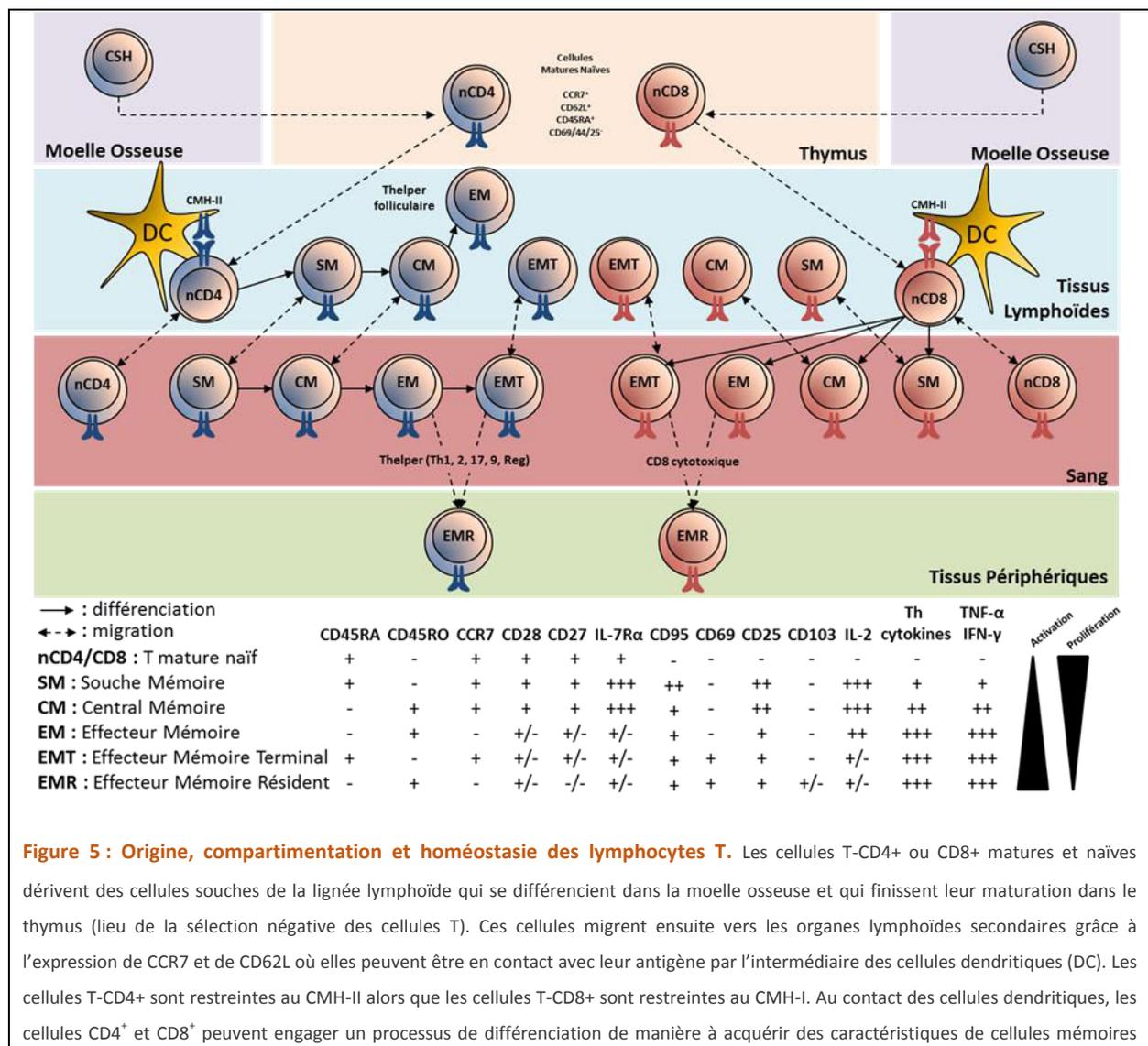


Figure 5 : Origine, compartimentation et homéostasie des lymphocytes T. Les cellules T-CD4⁺ ou CD8⁺ matures et naïves dérivent des cellules souches de la lignée lymphoïde qui se différencient dans la moelle osseuse et qui finissent leur maturation dans le thymus (lieu de la sélection négative des cellules T). Ces cellules migrent ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires grâce à l'expression de CCR7 et de CD62L où elles peuvent être en contact avec leur antigène par l'intermédiaire des cellules dendritiques (DC). Les cellules T-CD4⁺ sont restreintes au CMH-II alors que les cellules T-CD8⁺ sont restreintes au CMH-I. Au contact des cellules dendritiques, les cellules CD4⁺ et CD8⁺ peuvent engager un processus de différenciation de manière à acquérir des caractéristiques de cellules mémoires

(souches mémoires, centrales mémoires) ou de cellules effectrices (effecteur mémoire, effecteur mémoire terminal). Les cellules effectrices peuvent migrer vers les tissus (effecteur mémoire résident) et agir contre les pathogènes ou les cellules tumorales. Les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de ces sous-groupes (adapté de (Gattinoni *et al*, 2011)) sont répertoriées de manière non exhaustive en bas de la figure.

(v) Les lymphocytes T-CD4⁺ : polarisation et rôle dans l'élimination

La différenciation des lymphocytes T-CD4⁺ suit un schéma très linéaire. Les signaux induits par le TCR et les molécules de co-stimulation vont lui permettre d'acquérir progressivement des fonctions de cellules mémoires (Souche Mémoire, Centrale Mémoire) puis des fonctions de cellules effectrices à courte durée de vie (Effecteur Mémoire ou Effecteur Mémoire Terminal) (Robert *et al*, 2008 ; Mahnke *et al*, 2013). Sous l'action des cytokines polarisantes, le processus de différenciation s'opérera par l'intermédiaire de facteurs de transcription capables de mettre en place un programme d'expression génique typique du sous-type Thelper induit. Ces mêmes facteurs pourront à l'inverse empêcher la mise en place des programmes impliqués dans l'expression génique des autres sous-types. Chaque sous-type Thelper est caractérisé par l'expression de facteurs de transcription, de cytokines et de récepteurs membranaires bien particuliers (Figure 6).

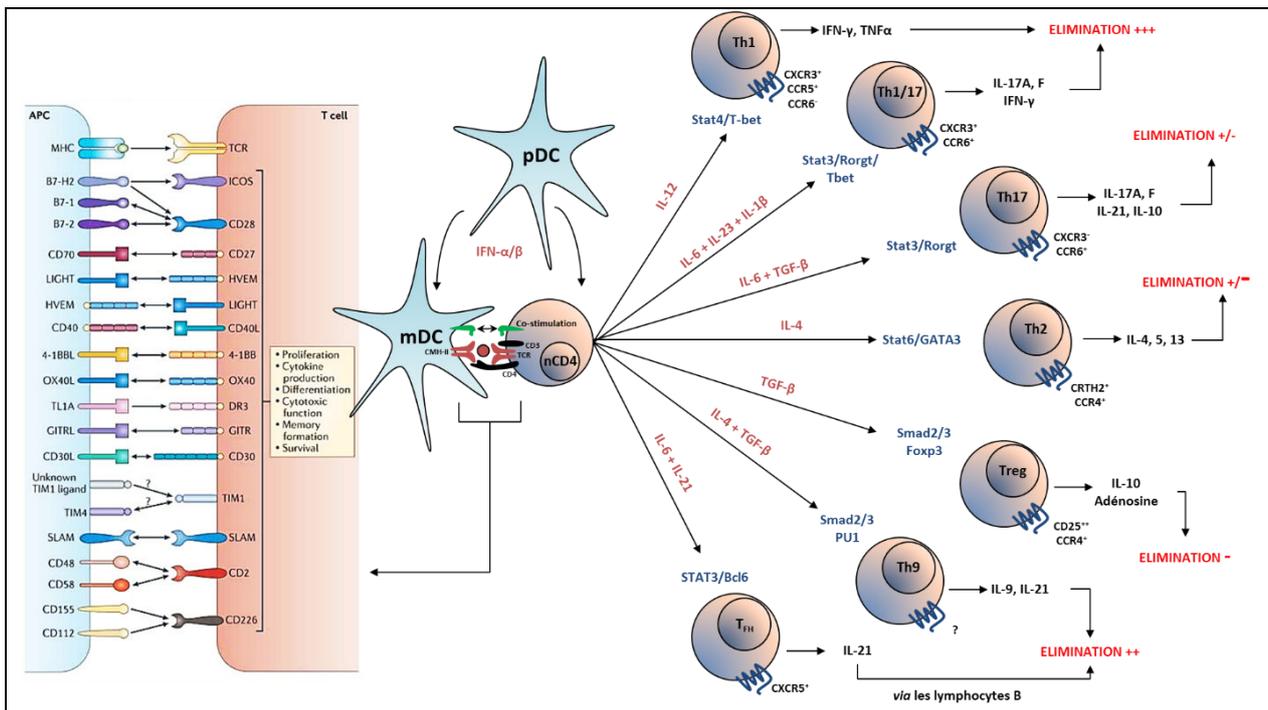


Figure 6 : Les lymphocytes T CD4⁺ : polarisation et rôle dans l'élimination. Les lymphocytes T-CD4⁺ naifs peuvent s'engager dans un processus de différenciation suite à l'activation du TCR et des molécules de co-stimulation (présentées à gauche du schéma, adapté de Lieping C *et al*, 2013). L'orientation de la polarisation dépendra du type de cytokines produites (en rouge) par les cellules dendritiques myéloïdes (mDC). Les mDC sont également soutenues par les cellules dendritiques plasmacytoïdes via les interférons de type I (IFN- α/β). En fonction du sous-type, les cellules exprimeront certains facteurs de transcription (en bleu) qui permettront de mettre en place le programme de différenciation et la production des cytokines (en noir). Chaque sous-type Thelper est caractérisé par l'expression de

récepteurs membranaires qui permettent de les identifier phénotypiquement (10). L'effet « pro-tumoral » ou « anti-tumoral » de chaque sous-type est également indiqué (ELIMINATION +/-).

Le rôle des Thelper dans le cancer est un sujet d'étude particulièrement prometteur en oncologie, mais qui reste encore mal compris. En effet, le rôle des Thelper dans la surveillance et la réponse anti-tumorale dépend fortement du sous-type considéré (Fridman *et al*, 2012) (Figure 7).

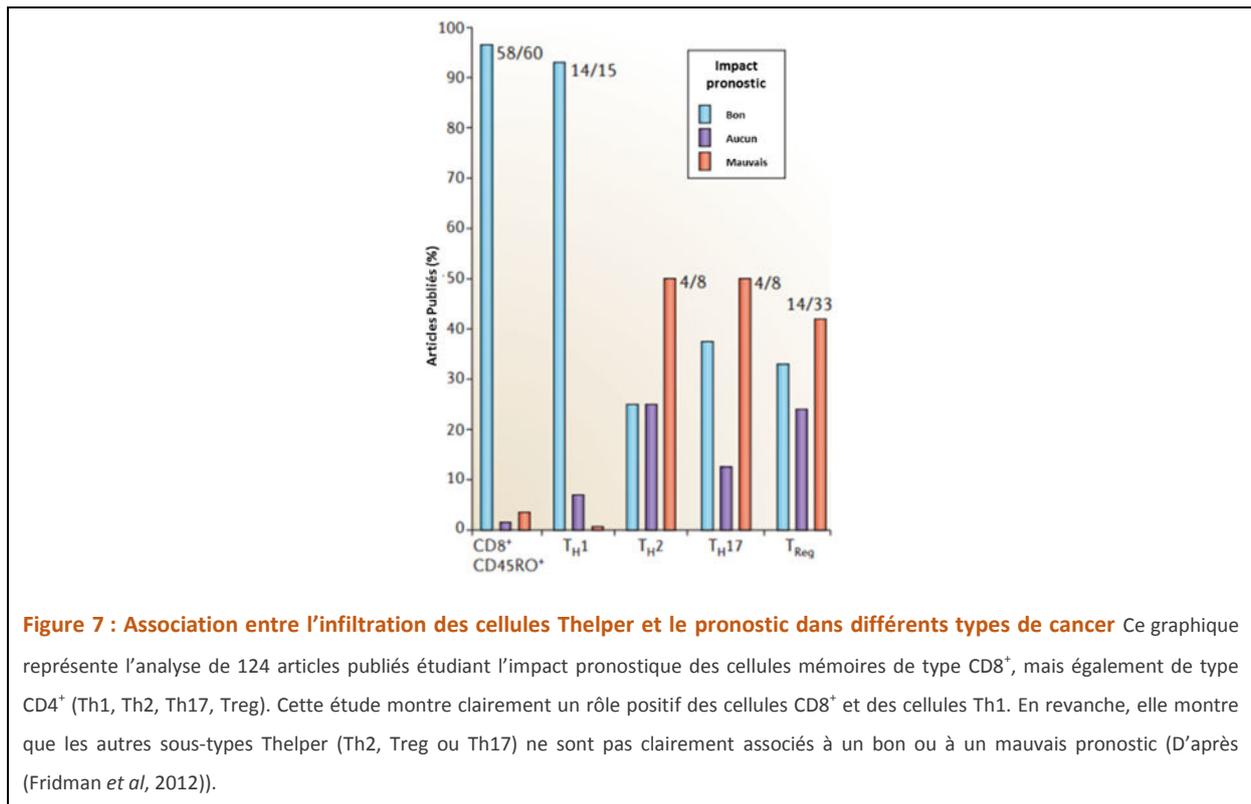


Figure 7 : Association entre l'infiltration des cellules Thelper et le pronostic dans différents types de cancer Ce graphique représente l'analyse de 124 articles publiés étudiant l'impact pronostic des cellules mémoires de type CD8⁺, mais également de type CD4⁺ (Th1, Th2, Th17, Treg). Cette étude montre clairement un rôle positif des cellules CD8⁺ et des cellules Th1. En revanche, elle montre que les autres sous-types Thelper (Th2, Treg ou Th17) ne sont pas clairement associés à un bon ou à un mauvais pronostic (D'après (Fridman *et al*, 2012)).

Les lymphocytes Th1

Les lymphocytes Th1 sont induits par la présence d'IL-12 et d'INF- γ (Trinchieri *et al*, 2003). L'IL-12 produit par les cellules présentatrices d'antigènes permet l'activation du facteur de transcription STAT4 par l'intermédiaire de la kinase JAK2 (« Janus Kinase 2 ») STAT4 migre au niveau du noyau et se fixe sur le promoteur des gènes codant pour l'IFN γ , la lymphotoxine- α (LT α), le TNF α et β et les récepteurs à l'IL-12 (*IL12RB1*, *IL12RB2*). Ce processus permet l'expression de cytokines (IL-12 et IFN γ) capables d'agir de manière autocrine pour induire l'expression du facteur de transcription STAT1, puis Tbet, qui est « le » facteur de transcription clé de la polarisation et du maintien du sous-type Th1. Les Th1 peuvent être identifiés par l'expression du récepteur CXCR3 et par l'absence d'expression de CCR6 et CRTH2. Ils possèdent un rôle anti-tumoral très largement décrit. En effet, ils sécrètent de grandes quantités d'IFN γ , d'IL-2 et de lymphotoxine- α (LT α) ainsi que du TNF α et β . Ces cytokines soutiennent les fonctions de phagocytose et d'exposition des antigènes

tumoraux par les macrophages et les cellules dendritiques (Suzuki *et al*, 1988) ainsi que les fonctions cytotoxiques des lymphocytes NK, NKT et CD8 (Schroder *et al*, 2004). Ils maintiennent également ces cellules dans un phénotype mémoire (Bourgeois *et al*, 2002 ; Janssen *et al*, 2003). De plus, l'IFN γ s'oppose à l'angiogenèse, et exerce une activité cytostatique directe (Dunn *et al*, 2004). Chez l'homme, les exemples ne manquent pas pour prouver le rôle anti-tumoral des Th1. L'infiltration des Th1 est, dans de nombreux cancers (colon, poumon, sein), positivement corrélée à une forte expression des marqueurs moléculaires associés aux cellules cytotoxiques (Granzyme B, IFN γ , CD8, CD3, Tbet, IRF1) et à une faible expression des marqueurs des cellules immunosuppressives (IL-10, TGF- β) (Camus *et al*, 2009; Dieu-Nosjean *et al*, 2008; Galon *et al*, 2006; Teschendorff *et al*, 2010). Ainsi, l'infiltration intra-tumorale de cellules Th1 est donc à la fois un bon facteur prédictif et pronostique.

Les lymphocytes Th2

Les lymphocytes Th2 sont induits en présence d'IL-4. Cette cytokine permet l'activation de STAT6 et l'expression du facteur de transcription GATA-3, le facteur de transcription clé de la polarisation Th2. Ils peuvent être identifiés par l'expression des récepteurs CCR4 et CRTH2 et par l'absence d'expression de CCR6 et de CXCR3. Le rôle des Th2 dans le cancer est assez controversé. La production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 par les Th2 s'oppose à la différenciation des Th1, ce qui par voie de conséquence, limite l'activation des lymphocytes cytotoxiques. Néanmoins, il a été montré qu'une forte expression de GATA-3 était un bon facteur pronostique dans les cancers du sein (Yoon *et al*, 2010) et que les Th2 étaient associés à un bon pronostic dans le lymphome de Hodgkin (Schreck *et al*, 2009). Même si cela n'a pas été clairement établi, on peut penser que ce rôle positif pourrait provenir d'une activation de l'immunité humorale par l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. En effet, ces cytokines permettent de soutenir les fonctions effectrices et mémoires des cellules B et accélèrent la fabrication des immunoglobulines. Ce processus contribue aux phénomènes d'activation du complément et à la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps. Ce mécanisme peut expliquer en partie la capacité des Th2 à soutenir l'immunité anti-tumorale.

Les lymphocytes T_{FH}

Les lymphocytes T_{FH} (« *T Follicular Helper* ») ont été découverts au début des années 2000 et ont initialement été décrits au niveau des tissus lymphoïdes secondaires (Breitfeld *et al*, 2000; Schaerli *et al*, 2000). Les T_{FH} expriment CXCR5, un récepteur qui les maintient au niveau des follicules lymphoïdes B où ils jouent un rôle dans la maturation des cellules B. Ils favorisent, par l'intermédiaire des lymphocytes B, la production d'anticorps de très hautes affinités en induisant le processus de commutation de classe des immunoglobulines. La polarisation des cellules T_{FH} est *a priori* induite par

l'IL-6 et l'IL-21, et dans une moindre mesure par l'IL-27 et l'IL-12. Ces cytokines permettent d'induire les voies STAT3 et STAT1 qui provoquent l'expression des facteurs de transcription Bcl-6 et Ascl-2, ainsi qu'IRF4 et BATF. Ces facteurs lancent le programme de différenciation des T_{FH} et favorisent l'expression membranaire de ligands (ICOS, PD-1, CD40-L, CD28) et de cytokine (IL-21), capables de réguler la maturation des cellules B. Dans un contexte tumoral, le rôle des T_{FH} est encore mal connu. Néanmoins, deux études récentes indiquent qu'ils sont associés à un bon pronostic dans les tumeurs mammaires (Gu-Trantien *et al*, 2013) et les cancers du côlon (Bindea *et al*, 2013). Ces études sont principalement basées sur l'interprétation de données transcriptomiques et elles montrent qu'il existe une corrélation positive entre un enrichissement des gènes de type T_{FH} (CXCL13, IL-21 en particulier) et des gènes de type cellules B. Ces deux signatures génétiques se sont révélées être à la fois de bons facteurs prédictifs de la réponse au traitement et de bons facteurs pronostiques. Ces observations permettent donc d'envisager un rôle particulier des T_{FH} dans l'élimination des cellules tumorales en favorisant une réponse de l'immunité humorale *via* la maturation des cellules B.

Les lymphocytes Th9

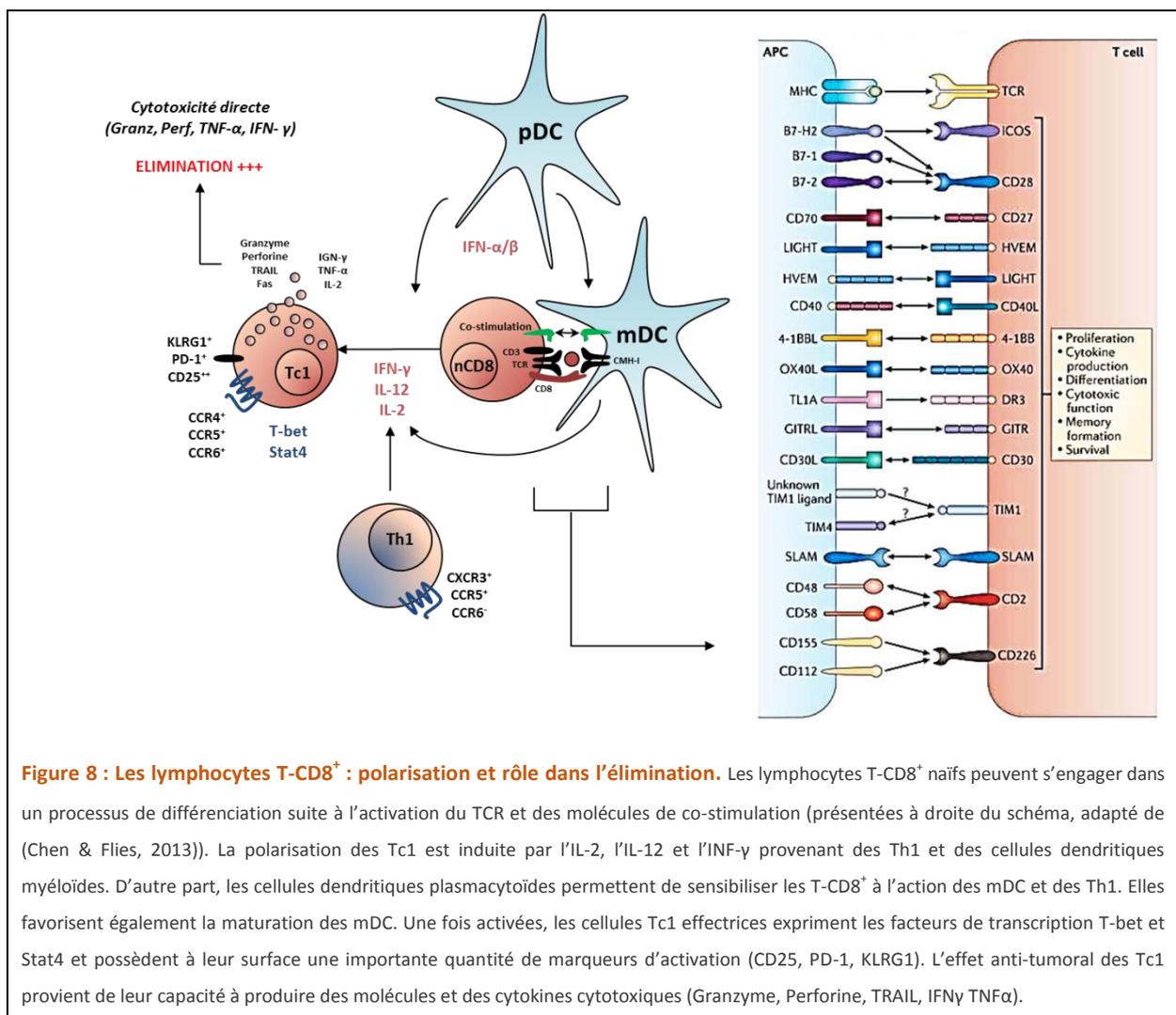
Les cellules Th9 ont été caractérisées très récemment comme une nouvelle population T-CD4⁺ (Dardalhon *et al*, 2008; Veldhoen *et al*, 2008). À l'origine, les Th9 étaient plutôt assimilés à une sous-population de cellules Th2 mais leur programme de différenciation est sensiblement différent. Ces cellules sont induites sous l'action de l'IL-4 et du TGF-β et expriment deux facteurs de transcription majeurs, IRF4 (Staudt *et al*, 2010) et PU.1 (Chang *et al*, 2010). Comme leur nom l'indique, ces cellules produisent de grande quantité d'IL-9, une cytokine impliquée dans les réponses inflammatoires. Ces cellules jouent un rôle très important dans les maladies auto-immunes comme la sclérose en plaque (Stassen *et al*, 2012) et dans la réponse allergique comme l'asthme (Staudt *et al*, 2010). Dans un contexte de cancer, le rôle de ces cellules reste encore flou. Il semblerait néanmoins que les Th9 aient des propriétés anti-tumorales chez la souris grâce à leur capacité à recruter les cellules T-CD8⁺ et les cellules dendritiques par l'axe CCL20/CCR6 (Lu *et al*, 2012; Purwar *et al*, 2012). D'autre part, le transfert adoptif de cellules Th9 chez des souris porteuses de tumeurs montre que ces cellules peuvent participer à l'élimination tumorale. Il est en effet possible d'induire une forte réponse anti-tumorale après transfert de cellules Th9 préalablement stimulées par de l'IL-1β. Cette cytokine permet l'activation de la voie STAT1/IRF1, ce qui induit fortement la production d'IL-9 et d'IL-21, ainsi que le recrutement de cellules cytotoxiques (Vegran *et al*, 2014). Pour le moment, aucune étude chez l'homme n'a permis de confirmer le rôle anti-tumoral des cellules Th9.

(vi) *Rôle des lymphocytes T-CD8 dans l'élimination*

Polarisation des lymphocytes T-CD8⁺

Les lymphocytes T de type CD8⁺ ont la capacité à reconnaître les antigènes présentés par les complexes peptide/CMH-I grâce à l'expression d'un TCR de type $\alpha\beta$ et à la molécule CD8. L'activation et la différenciation des cellules CD8⁺ est une étape essentielle pour la mise en place d'une réponse contre les pathogènes intracellulaires et contre les cellules tumorales. L'activation des cellules CD8⁺ naïves provoque à la fois le développement de cellules effectrices à courte durée de vie, extrêmement fonctionnelles (Effecteur Mémoire, Effecteur Mémoire Terminal), et de cellules prédisposées pour survivre, peu fonctionnelles, mais dont le rôle est de devenir des cellules mémoires (Souche Mémoire et Central Mémoire). La différenciation des cellules CD8⁺ pourrait être un peu différente de celle des cellules CD4⁺. En effet, les signaux d'activation et en particulier ceux induits par les cytokines pourraient induire une différenciation en cellules effectrices de manière immédiate. Il semblerait qu'une forte concentration en IL-2, en IL-12 et en IFN α au moment de l'activation du TCR permettrait d'induire *via* l'activation de mTOR (« *mammalian target of rapamycin* ») une différenciation de type effectrice voire même effectrice terminale (Mahnke *et al*, 2013). À l'inverse, une forte quantité d'IL-21 permettrait, quant à elle, d'induire une réponse de type mémoire. Cette différence s'explique par une compétition entre l'IL-21 et l'IL-2 qui se fixent sur un récepteur commun : la chaîne γ_c (CD132). La balance IL-2, IL-12, IFN α / IL-21 permet de contrôler les caractéristiques phénotypiques et les fonctions cytotoxiques des cellules T-CD8⁺. Les cellules effectrices exprimeront davantage de cytokines et de molécules cytotoxiques (IFN γ , TNF α , Granzyme, Perforine). Néanmoins, elles vont perdre l'expression des molécules de co-stimulation (CD28, CD27, CD127) et exprimer davantage des récepteurs associés à l'activation lymphocytaire (CD25, HLA-DR, PD-1, KLRG-1). Les cellules mémoires ont, quant à elles, un phénotype inverse avec peu de cytokines et de molécules cytotoxiques produites, une forte expression des molécules de co-stimulation et une faible expression des marqueurs d'activation (Mahnke *et al*, 2013). D'autre part, les cellules T-CD8⁺ mémoires n'exprimeront pas le facteur de transcription T-bet mais EOMES, et mTOR sera activé. Il est également important de préciser que les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs peuvent avoir un profil d'expression cytokinique orienté comme les T-CD4⁺. En effet, sous l'action de l'IL-2, de l'IL-12 et de l'IFN γ les T-CD8⁺ peuvent produire en retour de l'IFN γ . On les appellera alors T-cytotoxique de type 1 (Tc1)(Figure 8). Il existe aussi comme pour les Thelper les Tc2, les Tc17 et les TCD8⁺ régulateurs (Croft *et al*, 1994; Huber *et al*, 2009; Li *et al*, 2009; Sad *et al*, 1995). Le rôle des cellules CD8 dans un contexte de cancer a été assez largement étudié. Il est clair que la capacité de ces cellules à produire des cytokines et des enzymes cytostatiques et cytotoxiques (IFN γ , TNF α , TRAIL, granzyme, perforine) leur permet de jouer un rôle central dans l'élimination des cellules tumorales. Les études menées chez la souris et chez l'homme indiquent clairement que la présence de cellules T-CD8⁺ effectrices sont associées à un bon pronostic lorsqu'elles sont présentes dans la tumeur (Fridman *et al*, 2012).

De plus, certaines études montrent également que la présence de cellules T mémoires centrales ou mémoires souches sont une réserve importante permettant de générer des cellules effectrices capables d'éliminer efficacement les cellules tumorales de façon prolongée. En effet, comme nous le verrons dans la partie consacrée à l'échappement immunitaire, l'expression des molécules de type PD-1, Tim-3 par les cellules effectrices, les sensibilisent à la mort induite par les cellules tumorales ou les cellules présentatrices d'antigènes qui expriment leur ligand (PD-L1, PD-L2, galectine-9). D'autre part, comme pour les cellules CD4⁺, la polarisation des cellules T-CD8⁺ peut affecter leur capacité à induire l'élimination des cellules tumorales. Alors que les Tc1 sont fortement anti-tumorales, les Tc2 et les Tc17 ont un rôle plutôt ambivalent (Faghih *et al*, 2013).



(vii) Rôle des lymphocytes non conventionnels dans l'élimination

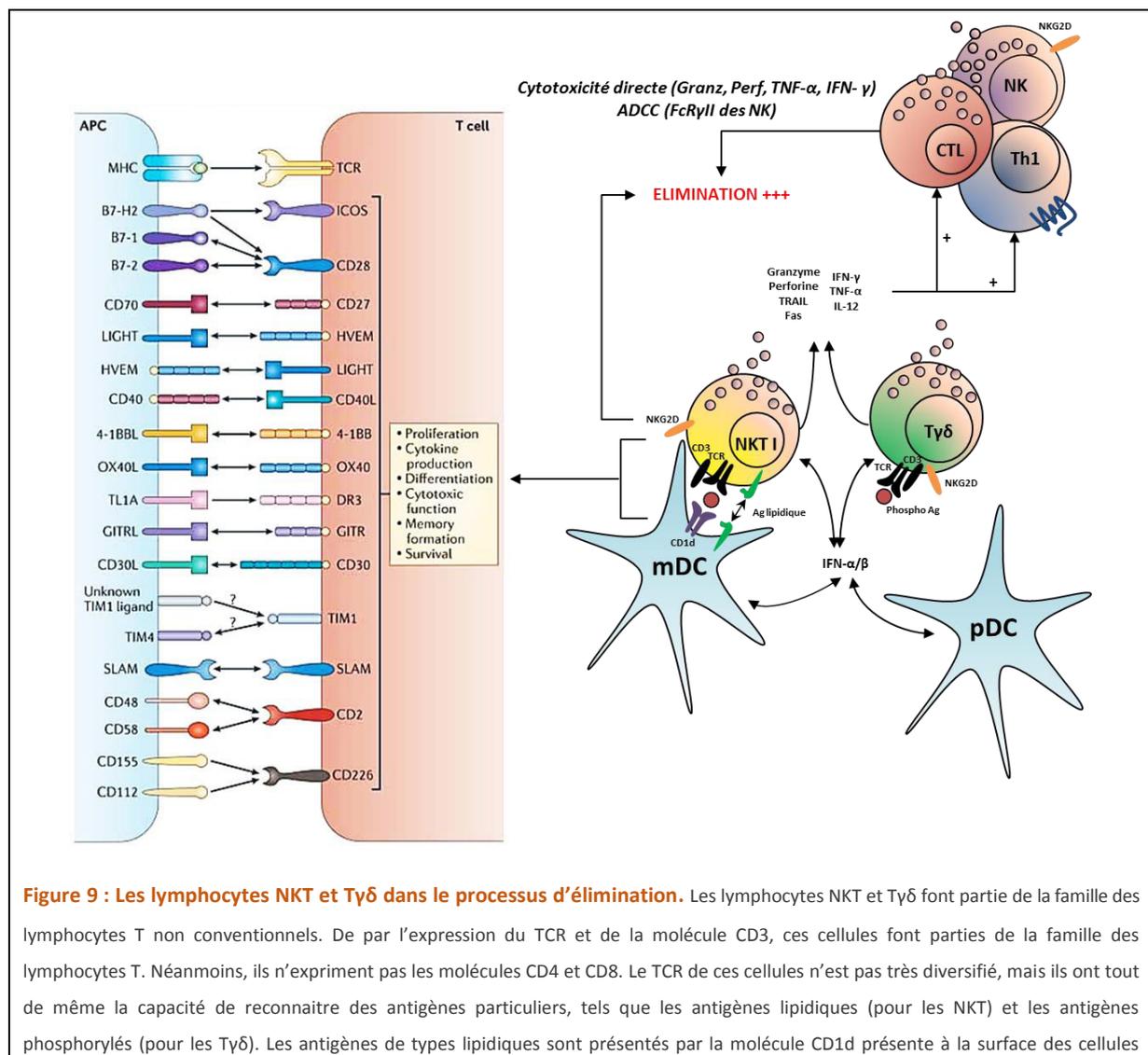
Les lymphocytes Tγδ

Les lymphocytes $T\gamma\delta$ font partie de la famille des lymphocytes T non conventionnels. C'est une famille qui présente des caractéristiques de cellules de l'immunité innée et adaptative (Holtmeier & Kabelitz, 2005). Comparativement aux lymphocytes T- $CD4^+$ et T- $CD8^+$ qui expriment un TCR de type $\alpha\beta$, les $T\gamma\delta$ expriment les chaînes γ et δ . Les $T\gamma\delta$ expriment la molécule CD3 mais très rarement les molécules CD4 et CD8. Ils possèdent une diversité du TCR moins riche que les lymphocytes T conventionnels. En effet, le nombre de segment génique qui compose les gènes codant pour les chaînes γ et δ est plus faible que celui des chaînes α et β . C'est la raison pour laquelle on retrouve plus fréquemment certains réarrangements tels que le réarrangement T $V\gamma9V\delta2$ qui permet la reconnaissance des phospho-antigènes (PAg). Les aminobisphosphonates sont produits en grande quantité par les cellules tumorales et peuvent être reconnus par les T $V\gamma9V\delta2$ (Di Carlo *et al*, 2013). Après une stimulation antigénique, les $T\gamma\delta$ ont la capacité à produire une forte quantité de chimiokines (CXCL10, CXCL13) et de cytokines qui permettent l'activation des immunités innée et adaptative (IFN γ , IL-4, TNF α , IL-2, IL-7, IL-15, IL-17). Ils produisent des molécules cytotoxiques tels que la perforine, le granzyme et TRAIL, ce qui leur permet d'induire eux-mêmes la lyse des cellules tumorales (D'Asaro *et al*, 2010). En plus de la reconnaissance antigénique, les $T\gamma\delta$ peuvent également réagir aux cytokines inflammatoires présentes dans un tissu endommagé ou dans une tumeur. De plus, comme les cellules NK, ils expriment les récepteurs NKG2D qui permettent l'interaction avec les ligands MICA/B (« MHC class I polypeptide-related sequence A and B ») et ULBP (« UL16 binding protein ») présents à la surface des cellules tumorales (Rincon-Orozco *et al*, 2005). Le Fc γ RIII est également présent sur les $T\gamma\delta$, ce qui favorise la fixation de la partie Fc des immunoglobulines et donc par voie de conséquence la lyse cellulaire dépendante des anticorps (Chen & Freedman, 2008). Chez l'homme, le rôle pronostique des $T\gamma\delta$ n'est pas clairement connu. Néanmoins, certaines observations permettent de dire que ces cellules sont clairement impliquées dans l'élimination des cellules tumorales. En effet, *in vitro*, l'activation de cellules $T\gamma\delta$ par de la bromohydrine pyrophosphate renforce la mort des cellules leucémiques en combinaison avec le rituximab (Gertner-Dardenne *et al*, 2009). Des observations similaires ont pu être faites dans le cancer de la prostate (Dieli *et al*, 2007), du rein (Kobayashi *et al*, 2010) ou encore du pancréas (Oberge *et al*, 2014).

Les lymphocytes NKT

Les lymphocytes NKT sont décrits pour avoir des fonctions importantes dans la réaction immunitaire contre les infections microbiennes, les allergies, les maladies auto-immunes et le cancer. Les NKT sont des cellules hybrides, à cheval entre l'immunité innée et adaptative. En effet, les NKT ont la possibilité de réagir aux cytokines pro-inflammatoires sans présentation de l'antigène, comme le feraient les cellules de l'immunité innée. Ils peuvent également, comme les cellules T- $CD4^+$ ou T- $CD8^+$, réagir à une stimulation antigénique grâce à l'expression d'un TCR de type $\alpha\beta$ et de la molécule

CD3. Les NKT, comme les lymphocytes $T\gamma\delta$, possèdent une diversité du TCR très réduite et ne reconnaissent pas les complexes CMH/peptide mais les complexes CD1/lipides et CD1/glycolipide. Les molécules CD1 peuvent être de différentes natures (CD1a, b, c, d). D'un point de vue phénotypique, ces cellules ont, comme leur nom l'indique, des caractéristiques des cellules T (expression du TCR et de CD3) mais aussi des NK (CD56, CD16), et ont la capacité de produire du granzyme et de la perforine. À ce jour, trois sous-types de NKT sont décrits : les NKT de type I (cytokines produites de type Th1), les NKT de type II (cytokines produites de type Th2), et les NKT « like » (Robertson *et al*, 2014). Le rôle de ces cellules dans l'élimination des cellules tumorales est encore peu connu. Néanmoins, il semblerait que les NKT de type I aient la capacité de reconnaître des antigènes tumoraux comme le ganglioside D3 (GD3) (Lepore *et al*, 2014) ou l' α -galactosylcéramide (α -GalCer). Cette reconnaissance permet en retour d'induire la maturation des cellules dendritiques (production d'IL-12 et d'IFN de type I) et une réponse cytotoxique CD8 et NK *via* la production d'IFN γ (Terabe & Berzofsky, 2008) et d'IL-21 (Smyth *et al*, 2005) par les NKT (Figure 9).



dendritiques. Les antigènes phosphorylés ne sont pas nécessairement présentés par les molécules du CMH. Les cellules NKT et $\text{Ty}\delta$ peuvent produire de nombreuses cytokines orientées plutôt vers un profil Th1, Th2 ou Th17 et également des interférons de type I. Comme les cellules NK, ils expriment les récepteurs NKG2D et peuvent sécréter des molécules cytotoxiques (Granzyme, Perforine, TRAIL).

Chez la souris, de nombreuses études montrent que ces cellules ont une capacité à stimuler la réponse anti-tumorale de façon très prononcée et qu'elles pourraient être une cible thérapeutique de choix, notamment par injection d' α -GalCer (Crowe *et al*, 2005; Smyth *et al*, 2002). De plus, elles ont montré un rôle puissant dans la prévention du sarcome chimio-induit par le MCA (Crowe *et al*, 2005; Crowe *et al*, 2002). Il est important de préciser que ces cellules, bien que possédant un TCR capable de reconnaître l' α -GalCer, ne joueraient pas un rôle d'effecteur lytique mais plutôt celui d'activateur des cellules dendritiques, CD8 et NK (Hayakawa *et al*, 2001; Kitamura *et al*, 1999). L'impact des NKT sur l'élimination des cellules tumorales chez l'homme est à ce jour encore peu documenté. Il a été montré néanmoins que dans la leucémie myéloïde chronique (LMC), les patients répondent davantage à l'imatinib si les NKT ont la capacité de produire de l'IFN γ (Shimizu *et al*, 2006). Une autre étude, réalisée chez des enfants porteurs de médulloblastome, indique que l'intensité de l'infiltration des NKT dans la tumeur dépend du sous-type tumoral considéré. Néanmoins, les auteurs n'ont pas étudié le rôle pronostique des NKT dans les sous-types du médulloblastome (Teo *et al*, 2014).

4. La phase d'équilibre

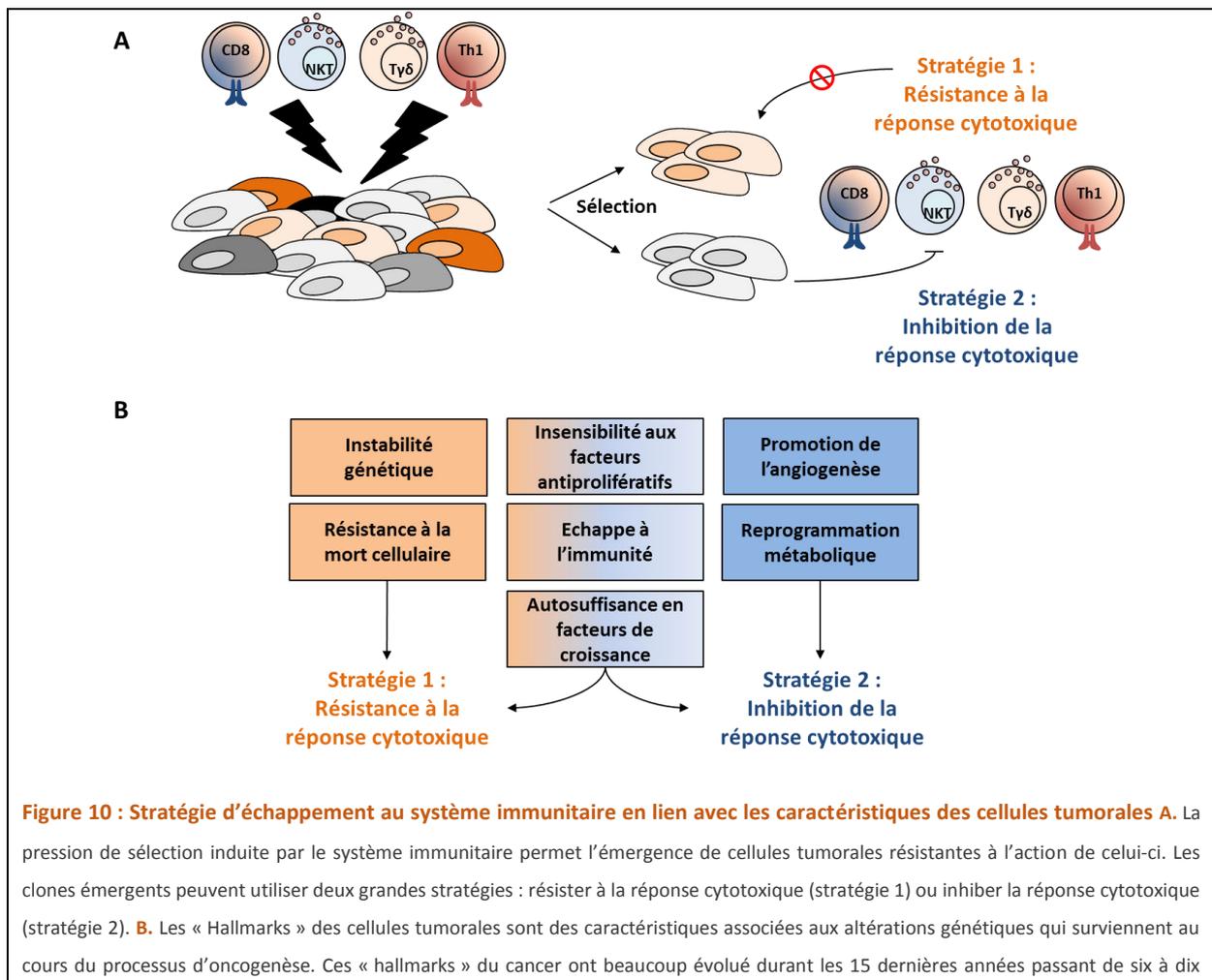
Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la phase d'équilibre sont peu compris de par la difficulté à modéliser cette étape chez la souris et à l'observer chez l'homme. Néanmoins, les résultats de l'équipe du Pr. Robert Schreiber publié en 2007, ont montré pour la première fois l'existence de cette phase d'équilibre chez la souris. Les travaux de cette équipe montrent que la déplétion des cellules CD4⁺, CD8⁺, ou des cytokines IL-12 et IFN γ , favorisait la progression tumorale chez des souris immunocompétentes préalablement traitées par du MCA et qui n'avaient encore pas développé de cancer (Koebel *et al*, 2007). De manière intéressante, la déplétion de TRAIL, des cellules NK1.1⁺ ou NKG2D⁺, ne permet pas de rompre cette phase d'équilibre, ce qui permet de dire que TRAIL ou les cellules NK et NKT ne participent pas au contrôle de la tumeur pendant la phase d'équilibre. Une étude similaire a permis de confirmer le rôle de l'IL-12 dans le maintien de cette phase d'équilibre ce qui n'est pas le cas en cas d'une déplétion du TNF α , de l'IL-4, de l'IL-17A, de l'IL-10R et de l'IL-23p19 qui n'induit pas de reprise tumorale. Ces résultats indiquent donc que, de manière individuelle, ces cytokines ne jouent pas de rôle dans la pression exercée par le système immunitaire dans la phase d'équilibre. Néanmoins, la déplétion simultanée de l'IL-10R, de l'IL-23p19 et de l'IFN γ conduit à une reprise tumorale, ce qui n'est pas le cas si l'IL-10R, l'IL-23p19 et

l'IFN γ sont inhibés séparément. Ces données montrent qu'il existe un équilibre important entre l'effet pro-tumoral de l'IL-10 et de l'IL-23p19 et l'effet anti-tumoral de l'IFN γ (Teng *et al*, 2012). Une étude récente indique que pendant la phase d'équilibre, les proportions intra-tumorales de cellules CD8⁺ cytotoxiques, Thelper, NK et T $\gamma\delta$ sont plus importantes que dans la phase d'échappement. Inversement, les populations immunosuppressives comme les T_{reg} et les MDSC sont-elles, induites pendant la phase d'échappement (Wu *et al*, 2013b). Cette étude confirme effectivement que pendant la phase d'équilibre il existe une balance entre l'activation et la suppression de la réponse immunitaire anti-tumorale.

L'équipe de Martin Röcken a mis en évidence un mécanisme qui pourrait expliquer ce phénomène de stabilisation tumorale. Elle a en effet montré dans un modèle de cancer murin (pancréas) induit par la perte de fonction de p53 et de Rb, que la présence de cytokines produites par les Th1 (IFN γ et TNF α) limite l'expression des chimiokines pro-antigéniques, l'expression de l'intégrine $\alpha V\beta 3$, et la prolifération des cellules tumorales. Elles permettraient d'induire également la sénescence des cellules cancéreuses. Cette observation indique donc que le système immunitaire est capable de maintenir la tumeur dans un état d'équilibre, en limitant l'angiogenèse et la prolifération par l'intermédiaire de la sénescence, qui n'est pas un processus de mort cellulaire irréversible comme pourraient l'être l'apoptose ou la nécrose. La voie moléculaire de ce mécanisme passe par l'activation de la protéine p16INK4a qui favorise l'inactivation de CDK4 et CDK6 (« *cycline-dependante kinase 4 et and 6* ») conduisant à une hypo-phosphorylation de Rb (sérine 795) et à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 (Braumuller *et al*, 2013). Mais, l'équipe de Röcken a fait une observation particulièrement intéressante, qui permet de mettre en évidence le rôle ambivalent du système immunitaire pendant la phase d'équilibre en fonction des altérations tumorales. En effet, alors que l'infiltration des Th1 permet de maintenir la tumeur dans un état d'équilibre chez les souris capables de répondre au TNF α et à l'IFN γ , la perte concomitante du récepteur au TNF α (TNFR1) et de la réponse à l'IFN γ n'a pas un effet nul mais, paradoxalement, elle promeut les processus d'angiogenèse et de progression tumorale (Muller-Hermelink *et al*, 2008). Les observations faites dans ce modèle d'étude sont une preuve que les caractéristiques de la tumeur et de son microenvironnement, en l'occurrence leur capacité à répondre aux cytokines produites par les Th1, peuvent faire pencher la balance vers l'échappement. Cette phase d'échappement est donc un processus complexe impliquant à la fois les cellules tumorales, le microenvironnement et le système immunitaire.

5. La phase d'échappement

L'échappement tumoral représente la dernière phase du concept d'« immunoediting », elle fait partie de l'une des dix caractéristiques décrites par R. Weinberg. Dans cette phase, les cellules tumorales immuno-sélectionnées sont capables de survivre aux conditions de stress et de proliférer malgré toutes interventions du système immunitaire. Les clones sélectionnés pendant la phase d'élimination et d'équilibre peuvent mettre en place deux stratégies différentes pour résister à l'action du système immunitaire. Une étude récente réalisée sur plus de 18 types de cancers vient de proposer un modèle permettant justement de mettre en relief ces deux stratégies. La première stratégie fait appel aux propriétés intrinsèques de la cellule tumorale. La seconde, quant à elle, repose davantage sur la modification du microenvironnement afin qu'il soit hostile à la réponse immunitaire (Rooney *et al*, 2015). La capacité des cellules tumorales à adopter l'une, l'autre ou les deux stratégies repose de manière générale sur les caractéristiques décrites par Robert Weinberg. Certaines caractéristiques, peuvent participer au développement des deux stratégies, nous verrons que c'est par exemple le cas en cas d'insensibilité aux facteurs antiprolifératifs (Figure 10). Un schéma récapitulatif non exhaustif est présenté (Figure 12)



(Hanahan & Weinberg, 2011). Parmi ces dix caractéristiques, certaines peuvent favoriser la mise en place de la stratégie 1, de la stratégie 2 ou contribuer à l'une et à l'autre.

a) Facteurs intrinsèques de résistance à l'immunité

(i) Résistance à la mort cellulaire

Dans certains cas, une réponse immunitaire innée et adaptative peut se mettre en place et permettre une forte infiltration des cellules cytotoxiques sans pour autant induire une inhibition de la croissance tumorale. En effet, certaines cellules tumorales peuvent devenir insensibles aux signaux de mort induits par les cellules cytotoxiques T-CD8, NK, NKT, Th1. La cytotoxicité des cellules immunitaires passe par la sécrétion de perforine, des granzymes A/B et des cytokines TRAIL, TNF α , IFN γ et IFN- α/β ou par l'expression membranaire de FasL. La perforine induit la formation de pores dans la membrane cellulaire permettant aux granzymes A/B d'activer l'apoptose par la voie extrinsèque mitochondriale (clivage de BID) et la voie intrinsèque dépendante de la caspase 8. Les cytokines TRAIL et TNF α peuvent elles, se fixer au niveau de leurs récepteurs respectifs TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 et TNFR-1 pour induire l'apoptose par l'intermédiaire de la caspase 8. Les interférons quant à eux pourront se fixer sur les récepteurs aux interférons de types I ou II et induire la voie STAT1 qui permettra d'induire un arrêt de prolifération voire la mort cellulaire. L'insensibilité aux signaux de mort induits par les cellules effectrices peut s'expliquer par la perte ou l'activation de certains gènes impliqués dans les processus de mort cellulaire. Des mutations inhibitrices ont été retrouvées dans les gènes codant pour la caspase 8, TRAIL et Fas, rendant les cellules tumorales insensibles aux lymphocytes cytotoxiques (Takahashi *et al*, 2006). La surexpression de protéines anti-apoptotiques telles que cFLIP, Bcl-2, ou Bcl-xL peuvent aussi limiter l'action du système immunitaire (Hinz *et al*, 2000; Kataoka *et al*, 1998). Les cellules cancéreuses peuvent également perdre l'expression des récepteurs à l'IFN γ (IFN γ R1, IFN γ R2) par mutation ou par inactivation épigénétique. Cette perte empêche l'action cytotoxique et cytostatique de l'IFN γ et induit une résistance aux cellules Th1 ou T-CD8 (Rodriguez *et al*, 2007b). La perte de ce récepteur est un facteur pronostique indépendant associé à une survie plus faible des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire (Duncan *et al*, 2007).

(ii) Autosuffisance en facteurs de croissances

Une des caractéristiques fondamentales d'une cellule tumorale, est sa capacité à proliférer de manière incontrôlée. Cette capacité peut être due à des altérations génétiques qui favorisent l'activation constitutive des voies de survie et de prolifération. On peut mentionner l'activation (mutations ou amplifications géniques) des récepteurs aux facteurs de croissance (*EGFR*, *PDGFR*, *HER2*, *MET*, *VEGFR*) ou l'activation constitutive des protéines de signalisation en aval de ces récepteurs (*Ras*, *Raf*, *PI3K*, *Myc*). Ces caractéristiques influencent directement la croissance des cellules tumorales. Néanmoins, elles peuvent aussi favoriser la sécrétion de facteurs solubles

capables d'altérer ou de modifier la réponse immunitaire anti-tumorale. L'activation constitutive de l'EGFR par exemple, induit une activation continue des kinases JAK1/2 permettant d'induire les gènes contrôlés par le facteur de transcription STAT3. Ce facteur permet notamment l'expression de l'IL-6, de l'IL-10 ou encore du VEGF-A, des cytokines qui ont un effet immunosuppresseur. Elles inhibent en particulier la maturation des cellules dendritiques (chute de l'expression du CMH-I/II, de CD80/86, de l'IL-12) ou les transforment en cellules dendritiques tolérogènes capables d'induire la prolifération des lymphocytes T_{reg} et de limiter celle des T-CD8⁺ (Yu *et al*, 2007). On peut également parler de l'impact d'une activation constitutive de Ras sur la réponse immunitaire. Cette sur-activation permet la production d'un grand nombre de cytokines tel que l'IL-8, qui joue un rôle fondamental dans les processus de néo-angiogenèse et d'immunosuppression (Sparmann & Bar-Sagi, 2004). Dans un modèle de cancer du pancréas, Ras favorise également la sécrétion de GM-CSF, un facteur de croissance impliqué dans la prolifération et le recrutement des cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC), lesquelles jouent un rôle dans l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale (Pylayeva-Gupta *et al*, 2012). D'autres types de cancer produisent également de l'IL-4, un facteur de croissance qui favorise la polarisation des cellules Th2, des macrophages de type 2 ou encore l'activation des cellules de type MDSC (Stassi *et al*, 2003).

(iii) *Insensibilité aux facteurs antiprolifératifs*

La capacité d'une cellule tumorale à proliférer de manière incontrôlée implique l'inactivation des voies d'inhibition de prolifération. Cette propriété peut être due à des altérations génétiques qui conduisent à la perte de fonction de certaines protéines. On peut penser notamment à la perte de la signalisation induite par le TGF-βR1/2. La signalisation induite par l'activation de ce récepteur permet de limiter la prolifération de la tumeur. Sa perte permet donc à la tumeur de proliférer malgré de forte concentration en TGF-β dans la tumeur qui favorise en parallèle l'émergence de cellules immunosuppressives de type T_{reg} ou de type MDSC. D'autre part, la présence de TGF-β limite la fonctionnalité des cellules cytotoxiques de type T-CD8 ou NK (Gorelik & Flavell, 2002; Yang *et al*, 2010). D'autres modifications génétiques peuvent influencer à la fois les voies d'inhibition de la prolifération et de l'immunité anti-tumorale. Récemment, une étude a montré dans le mélanome métastatique, une corrélation entre l'activation de la voie Wnt/β-caténine (mutation activatrice du gène de la β-caténine ou mutation perte de fonction des protéines APC, AXIN1 ou TCF1) et l'absence d'infiltration de cellules T. La perte de cette voie de signalisation induit une diminution de l'expression des chimiokines impliquées dans le recrutement des cellules dendritiques dermiques (CCL3, CXCL1, CXCL2 et CCL4), ce qui limite l'activation de l'immunité adaptative. Ce processus se traduit par une très faible infiltration en cellules T dans la tumeur. Cette étude montre donc clairement que la perte d'une voie de signalisation dans la tumeur modifie l'infiltration des

cellules T et par conséquent, l'efficacité d'une immunothérapie basée sur l'utilisation d'anticorps anti-PD1 ou anti-CTL4. L'injection de cellules dendritiques CD103⁺ permet de restaurer l'infiltration des lymphocytes T et permet la réponse à l'immunothérapie (Spranger *et al*, 2015).

(iv) Instabilité génétique

L'ensemble des cancers présente une instabilité de leur génome. L'impact de cette caractéristique tumorale vis-à-vis du système immunitaire peut être controversé. En effet, il est clairement démontré que l'instabilité génétique peut contribuer à la perte ou à l'inactivation de gènes codant pour des protéines impliquées dans les processus de mort cellulaire ou de réponse aux signaux antiprolifératifs induits par le système immunitaire. Néanmoins, il semble également que cette instabilité puisse être un facteur permettant au système immunitaire de détecter et de contrôler la tumeur (Galon *et al*, 2006). Par exemple, dans le cancer colorectal, il existe une association très forte entre l'infiltration des cellules T-CD8⁺, la présence de structures lymphoïdes tertiaires et l'instabilité génétique des microsatellites. Le processus d'instabilité des microsatellites favorise la duplication et/ou la délétion de petites séquences d'ADN (Buckowitz *et al*, 2005; Dolcetti *et al*, 1999). L'association entre l'infiltration de cellules immunitaires et l'instabilité des microsatellites est due en réalité à la génération de nouveaux antigènes tumoraux qui peuvent être reconnus par les cellules B, les cellules T-CD4⁺ et T-CD8⁺ et permettre une réponse immunitaire spécifique contre les cellules tumorales. La présence de cette attaque dans les cancers MSI (Microsatellite Instable) pourrait expliquer pourquoi ce sous-type de tumeur répond mieux à une immunothérapie que les cancers aux microsatellites stables (Le *et al*, 2015). Ces observations ne sont pas restreintes au cancer colorectal, mais peuvent être appliquées aussi à d'autres types de cancer tels que le cancer du poumon (Nakata *et al*, 2002).

(v) Perte de la présentation des antigènes ou des signaux de co-stimulation

Dans le cadre d'une stratégie de résistance à la réponse cytotoxique, la cellule tumorale peut mettre en place des moyens pour limiter sa reconnaissance par le système immunitaire. Un premier moyen est de rendre le système de présentation des antigènes défectueux. Suite à des mutations, une inactivation épigénétique ou encore l'instabilité génétique, la cellule tumorale peut perdre l'expression de la protéine Tapasine qui est impliquée dans le transport des peptides vers le réticulum endoplasmique (Chang *et al*, 2015). La cellule peut aussi stopper l'expression des molécules du CMH-I (HLA-A, B, C, D, E, F, G), de la β 2-microglobuline (β 2m) par hyper-méthylation des promoteurs, désacétylation des histones ou *via* la perte d'un haplotype (Siddle *et al*, 2013). Cette perte d'exposition des antigènes tumoraux rend la cellule cancéreuse invisible à la surveillance du système immunitaire (Carreto *et al*, 2015). Ce phénomène peut être accentué en cas d'incapacité de

réponse à l'IFN γ . Nous avons vu précédemment que la perte des récepteurs à l'IFN γ jouait un rôle dans la résistance à la mort cellulaire. Néanmoins, l'absence des récepteurs et des protéines impliquées dans la signalisation de l'IFN γ (JAK1, JAK2, STAT1, STAT2) peuvent conduire aussi à une chute de l'expression des protéines responsables de la présentation (CMH-I, β 2m) et le traitement des antigènes (LMP2, LMP7, TAP1,) (Dunn *et al*, 2005; Jager *et al*, 1996). Concernant la reconnaissance par les cellules NK, l'instabilité génétique peut provoquer une baisse d'expression des molécules activatrices des molécules NKG2D (MICA, MICB, ULBPs) (Stern-Ginossar N, *nat Immunol*, 2008). Ces récepteurs membranaires peuvent également être clivés par des protéases extracellulaires (ADAM) produites par les cellules tumorales elles-mêmes. Ces récepteurs solubles gardent la capacité de se fixer sur les récepteurs NKG2D sans pour autant activer les cellules NK. Au contraire, la fixation des MICA, MICB ou ULBPs solubles sur les NKG2D provoque l'internalisation de ceux-ci (Choy & Phipps, 2010). Les altérations génétiques peuvent aussi conduire à une diminution de la production des molécules de stress (cytokines inflammatoires, HSP, calréticuline) ce qui limite l'activation et la maturation des cellules dendritiques (Wang T *et al*, 2004).

(vi) *La reprogrammation métabolique*

La prolifération excessive des cellules tumorales nécessite la production rapide de macromolécules pour la fabrication des membranes cellulaires ou encore la duplication de l'ADN. Pour ce faire, le métabolisme de la cellule tumorale est reprogrammé (notamment grâce à l'activation des oncogènes *PI3K*, *RAS* ou encore *MYC*) afin de se fournir en énergie d'une façon assez particulière. En effet, au lieu de tirer son énergie de la respiration cellulaire grâce à la mitochondrie, la cellule tumorale utilise la fermentation lactique quelles que soient les conditions d'oxygénation. Pour compenser la perte énergétique provoquée par la fermentation lactique, la cellule tumorale surexprime le transporteur du glucose (GLUT1) et les enzymes impliquées dans la fermentation lactique (LDH, MCT). Quel est pour autant le lien entre le métabolisme de la cellule cancéreuse et la réponse immunitaire anti-tumorale ? Les deux phénomènes sont en réalité intimement liés. En effet, la fermentation lactique va avoir pour première conséquence d'acidifier le microenvironnement tumoral. MCT1 et MCT4 expulsent simultanément une molécule de lactate et un proton. Cette acidification va avoir pour conséquence de limiter l'activation des cellules NK, de supprimer la prolifération, la production de cytokine et l'activité cytotoxique des cellules T (Fischer *et al*, 2007). L'excès de protons peut être régulé par le transporteur NHE1 qui importe un proton au profit d'un ion Na⁺. Ce mécanisme limite l'acidification du milieu extracellulaire, mais il n'est pas sans danger d'un point de vue immunologique. En effet, l'excès d'ion Na⁺ favorise la maturation des lymphocytes Th17 pathogéniques, *via* la protéine SGK1, capable de produire de forte quantité d'IL-17A, de GM-CSF et de TNF α contribuant à la fois à l'inflammation chronique et à l'infiltration des MDSC

(Kleinewietfeld *et al*, 2013; Wu *et al*, 2013a). D'autre part, les cellules de l'immunité ne réagissent pas toutes de la même manière face à un environnement acide, riche en lactate et pauvre en glucose. Les cellules T-régulatrices par exemple, sont capables de survivre et de proliférer dans un environnement pauvre au glucose et riche en lactate. Ce dernier favoriserait même leur polarisation (Roth & Droge, 1991; Roth *et al*, 1991). De plus, le métabolisme énergétique des cellules T-régulatrices est basé sur l'oxydation des lipides et non sur l'utilisation du glucose. Il n'existe donc pas de compétition métabolique entre la cellule tumorale et les T_{reg}. C'est également vrai pour les cellules MDSC et les macrophages de type 2 qui se développent plus facilement sous l'action du lactate produit par les cellules tumorales. Le lactate favorise également la production de molécules pro-angiogéniques par les macrophages de type 2 (Crowther *et al*, 2001; Husain *et al*, 2013). De plus, il vient récemment d'être montré que la glycolyse importante des cellules tumorales prive les cellules T effectrices du glucose dont elles ont besoin pour assurer la production des cytokines ou des molécules cytotoxiques (Chang CH *et al*, 2015 ; Ho PC *et al*, 2015).

b) Facteurs extrinsèque d'échappement à l'immunité

(i) Promotion de l'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus biologique permettant la formation de vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants (néo-angiogenèse). Ce processus en lui-même n'est pas la cause de la formation d'une tumeur. Néanmoins, pour des raisons de survies, les cellules tumorales vont favoriser ce processus d'angiogenèse pour permettre un approvisionnement continu en facteurs de croissance, en nutriments (glucose) et en oxygène. Elles ont également besoin d'évacuer les déchets produits lors du processus de prolifération (lactate, corps apoptotiques). On comprend dès lors que ce processus est primordial pour la survie des cellules tumorales mais qu'il joue aussi un rôle dans l'invasion et la migration des cellules tumorales vers les autres organes. Un des facteurs pro-angiogéniques les plus étudiés est le facteur de croissance des endothéliums vasculaires (VEGF). Il est produit par les cellules tumorales elles-mêmes et par les cellules du stroma tumoral tel que les fibroblastes ou les cellules endothéliales. Il existe un lien étroit entre le processus angiogénique et les mécanismes d'immunosuppression. De nombreuses études montrent que l'immunosuppression induit l'angiogenèse et inversement (Motz & Coukos, 2011). En effet, certains facteurs solubles pro-angiogéniques (VEGF, Platelet-derived growth factor (PDGF), Prostaglandine E2 (PGE2), IL-6, Angiopoïétine-2 (Ang-2)) produits par les cellules tumorales ou stromales, favorisent aussi le recrutement et l'activation des cellules immunitaires immunosuppressives. Le VEGF ou la PGE2 sont des facteurs de croissance et d'activation des fonctions suppressives des cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC), des macrophages de type 2 ou encore des cellules T régulatrices. À leur tour, ces cellules immunosuppressives induisent l'angiogenèse en produisant des médiateurs

pro-angiogéniques et en inhibant la production d'IFN γ qui lui, limite la néo-vascularisation (Motz *et al*, 2014; Yang *et al*, 2004). Le VEGF-A inhibe également les fonctions de présentation des antigènes par les cellules dendritiques et la différenciation des précurseurs hématopoïétiques (Conejo-Garcia *et al*, 2004; Zou *et al*, 2001). Il a également été clairement montré que la barrière endothéliale qui constitue les vaisseaux intra-tumoraux est une frontière perméable qui permet de sélectionner le sous-type lymphocytaire qui pourra infiltrer la tumeur. L'équipe du Pr George Coukos a en effet montré que la présence du récepteur de l'endothéline B (ET_BR) au niveau de l'endothélium des vaisseaux était corrélée à l'absence de cellules T infiltrantes. ET_BR provoque une augmentation de la production de monoxyde d'azote par l'endothélium vasculaire qui favorise une chute de l'expression des molécules d'adhésions (ICAM-1) et par voie de conséquence une diminution du phénomène d'extravasation des cellules T. D'autre part, l'activation d'ET_BR provoque une sécrétion de VEGF-A et de PGE2 via l'expression d'HIF-1 α (« *Hypoxia Inductible Factor alpha 1* »). Ainsi, l'inhibition d'ET_BR à l'aide d'un anticorps monoclonal permet de restaurer l'effet thérapeutique d'une vaccination anti-tumorale (Buckanovich *et al*, 2008). Par ailleurs, cette même équipe a montré plus tard que l'endothélium vasculaire tumoral, exposé à l'IL-10, au VEGF-A et à la PGE2, pouvait exprimer fortement le ligand de Fas, FasL, et induire la mort des cellules anti-tumorales T-CD8⁺ et T-CD4⁺ effectrices. De manière très intéressante, ils ont pu montrer que les cellules T-régulatrices étaient, comparativement au T-CD8, peu sensibles à l'action de FasL, grâce notamment à une expression importante de c-FLIP. La présence de FasL à la surface de l'endothélium permet donc de maintenir dans la tumeur un rapport T-CD8⁺/T_{Reg} très faible. Ainsi, l'inhibition des cyclo-oxygénases par l'aspirine ou du VEGF-A par un anticorps monoclonal, permet de restaurer l'activité anti-tumorale du transfert de cellules T (Motz *et al*, 2014). Le processus angiogénique n'a donc pas seulement pour rôle de subvenir aux besoins nutritifs des cellules tumorales mais il conditionne également la réponse immunitaire anti-tumorale vers l'immunosuppression.

(ii) *Création d'un environnement immunosuppresseur*

La création d'un environnement immunosuppresseur est indispensable dans le cadre d'une stratégie d'inhibition de la réponse cytotoxique. Dans les modèles expérimentaux de cancers murins, la mise en place d'une immunosuppression locale et périphérique est évidente. En effet, si la stimulation du système immunitaire par immunothérapie permet de limiter le développement d'une tumeur avant qu'elle ne soit installée, son impact est bien moindre lorsque la tumeur est clairement établie (Park *et al*, 2005). La mise en place de cet environnement immunosuppresseur par les cellules tumorales s'effectue soit par inhibition directe des fonctions cytotoxiques ou l'activation des cellules effectrices ou par le recrutement de cellules régulatrices et immunosuppressives. L'élimination de la réponse cytotoxique peut se faire par un grand nombre de mécanismes. La tumeur peut induire une

inhibition de la présentation des antigènes, inhiber les cellules effectrices par contact membranaire, ou encore produire des facteurs solubles immunosuppresseurs qui agissent de manière endocrine ou paracrine. Pour limiter la présentation des antigènes tumoraux au sein des organes lymphoïdes secondaires, les cellules tumorales vont pouvoir stopper les mécanismes permettant aux cellules dendritiques de migrer vers les ganglions ou la rate. Pour ce faire, la cellule tumorale peut produire des dérivés oxygénés du cholestérol activant le récepteur nucléaire LXR α au sein des cellules dendritiques. L'activation de LXR α va conduire à une chute de l'expression de la protéine CCR7 et ainsi stopper leur migration dans les organes lymphoïdes (Villablanca *et al*, 2010). Il semble également que le microenvironnement tumoral favorise l'accumulation de triglycérides sous forme de gouttelettes lipidiques au sein des cellules dendritiques par l'intermédiaire du récepteur scavenger A (SR-A) ce qui limite le traitement et la présentation des antigènes (Herber *et al*, 2010). L'expression du VEGF-A par les cellules tumorales est aussi associée à une perte de la maturation des cellules dendritiques et à une inhibition de la réponse anti-tumorale (Gabrilovich *et al*, 1999). L'inhibition de la présentation des antigènes peut aussi être induite par la production accrue des cellules tumorales de TGF- β et/ou d'IL-10. Ces deux cytokines stoppent la maturation des cellules dendritiques et perturbent également la réponse anti-tumorale induite par les cellules NK, les cellules CD8⁺ cytotoxiques en induisant une réponse de type Th2 (Aruga *et al*, 1997; Wrzesinski *et al*, 2007).

L'inhibition de la réponse cytotoxique par les cellules tumorales peut se faire également par contact direct avec les cellules effectrices. L'expression des protéines de type galectine, les galectines 1, 2, 3 et 9 en particulier, favorise l'inhibition de la réponse effectrice. En effet, la fixation des galectines sur leurs récepteurs (Tim-3 notamment) présents à la surface des cellules Th1 ou T-CD8⁺ provoque l'inhibition de leur prolifération par un blocage de la voie PI3K/AKT/mTOR (Liu & Rabinovich, 2005; Rubinstein *et al*, 2004). Les cellules tumorales peuvent également exprimer à leur surface deux récepteurs inhibiteurs de la réponse immunitaire : PD-L1 et PD-L2. Ces deux récepteurs sont inductibles par l'IFN γ et permettent dans des conditions physiologiques d'empêcher un emballement de la réponse inflammatoire. Néanmoins, dans un contexte de cancer, l'expression de ces deux protéines contribue largement à l'inhibition des cellules T-CD8 cytotoxiques, NK, NKT et des cellules Th1 qui expriment la protéine PD-1. La fixation de PD-L1 et de PD-L2 par PD-1 provoque au sein du lymphocyte une inhibition complète de sa capacité à proliférer et à produire des cytokines ou des molécules cytotoxiques. Comme pour Tim-3, PD-1 peut se lier à la protéine SHP-2, une phosphatase capable d'interagir et d'inhiber la protéine ZAP70. Cette dernière fait le lien entre la signalisation induite par le TCR et les molécules CD4 ou CD8 et permet d'induire la voie PI3K/AKT

indispensable à l'activation du facteur NF- κ B, la sécrétion d'IL-2, l'expression de Bcl-xL ou encore l'activation de mTOR.

Nous avons évoqué précédemment l'impact de la reprogrammation métabolique des cellules tumorales sur la réponse immunitaire. Il est clair que cette reprogrammation joue un rôle clé dans l'inhibition de la réponse cytotoxique. Elle est en lien avec l'expression de l'enzyme IDO (Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase) qui permet la dégradation du tryptophane en kynurénine. Cette dégradation a pour conséquence non seulement de priver les lymphocytes cytotoxiques d'un acide aminé essentiel à leur survie, mais également d'inhiber leurs fonctions *via* l'inhibition de mTOR et d'induire leur mort par l'intermédiaire de la kynurénine (Lob *et al*, 2009; Uyttenhove *et al*, 2003). Certaines cellules tumorales possèdent à leur surface l'enzyme CD39 qui permet la transformation de l'ATP extracellulaire en AMP. Cette étape est un premier pas vers la production d'adénosine, une molécule hautement immunosuppressive et retrouvée en grande quantité dans le microenvironnement tumoral. Par l'intermédiaire du récepteur A2aR, l'adénosine peut stopper la prolifération des lymphocytes effecteurs, stopper la migration des cellules dendritiques et favoriser les fonctions immunosuppressives des T_{reg} et des MDSC (Adams *et al*, 2015). La production de PGE2 grâce à la cyclo-oxygénase 2 (COX-2), permet-elle aussi d'induire une immunosuppression *via* l'activation d'EP2, un récepteur couplé aux protéines G qui conduit à l'expression du TGF- β , de l'IL-10, de la COX-2, de l'Arginase 1 et de la NO synthase inductible (iNOS) au sein des MDSC ou des macrophages de type 2 (Dorsam & Gutkind, 2007).

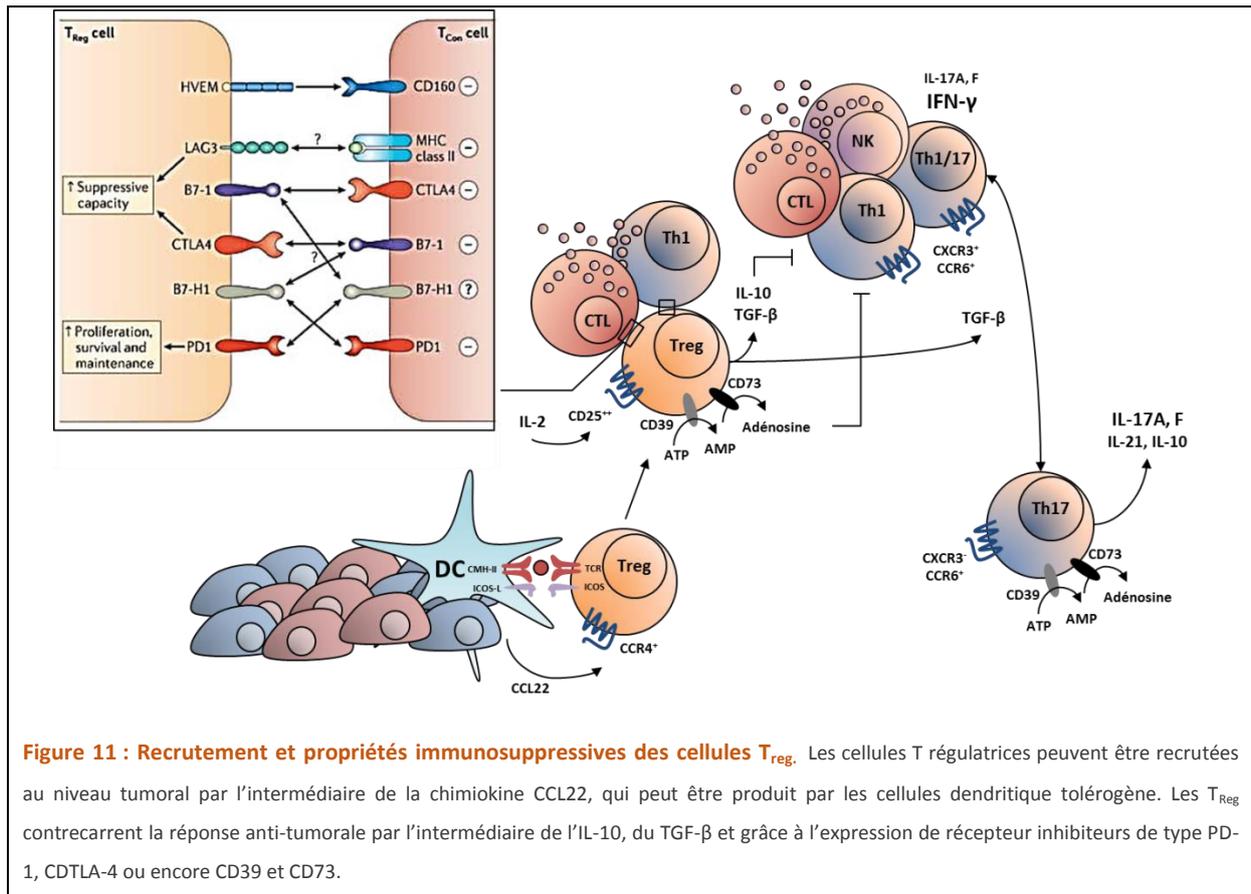
Recrutement et activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) peuvent être recrutées au sein de la tumeur et jouer un rôle important dans les mécanismes d'immunosuppression. Bien que ces cellules puissent à l'origine promouvoir la réponse immunitaire par l'intermédiaire des interférons de type I, il semble que l'infiltration des pDC soit en réalité plutôt associée à un pronostic défavorable (Treilleux *et al*, 2004). En réalité, le microenvironnement tumoral induit une perturbation de la fonctionnalité des pDC. Le GM-CSF produit par les cellules cancéreuses mammaires par exemple, confère au pDC la capacité d'activer une réponse de type Th2 et de type T_{reg} (Ghirelli *et al*, 2015). De plus, l'incapacité des pDC à produire des interférons de type I (IFN- α) contribue à l'expansion des cellules immunosuppressives T_{reg} (Sisirak *et al*, 2012).

Recrutement et activation des lymphocytes T-régulateurs (T_{Reg})

Les cellules T-CD4⁺ régulatrices sont impliquées dans le contrôle de la réponse immunitaire. De manière générale, ils ont un rôle physiologique très important puisqu'ils limitent les mécanismes liés à l'inflammation chronique et à la réaction auto-immunitaire. Ils sont généralement caractérisés

par une forte expression du CD25, une faible expression de CD127 et l'expression du facteur de transcription Foxp3 et du récepteur CCR4. Néanmoins, dans un contexte tumoral, ils sont très souvent associés à un pronostic défavorable (Bates *et al*, 2006; Gobert *et al*, 2009) à l'exception de certains cancers digestifs comme les cancers de la gorge et du côlon (Badoual *et al*, 2006; Frey *et al*, 2010). Les cellules T_{reg} peuvent être recrutées au sein de la tumeur *via* le ligand de CCR4, CCL22, produit par les cellules dendritiques et les cellules cancéreuses. Les T_{reg} sont retrouvés au niveau des structures lymphoïdes, au contact des cellules dendritiques qui peuvent induire la prolifération des cellules T_{reg} par l'intermédiaire du récepteur ICOS. Ces observations indiquent que les cellules T_{reg} peuvent être recrutées pour répondre d'une manière spécifique aux antigènes tumoraux grâce au contact avec les cellules dendritiques (Gobert *et al*, 2009). Une fois dans la tumeur, les T_{reg} peuvent entraîner une inhibition des lymphocytes T cytotoxiques par l'intermédiaire notamment d'une production importante d'IL-10, de TGF- β et par une consommation accrue d'IL-2. Le TGF- β est également une cytokine capable de modifier les propriétés anti-tumorales de certains sous-types Thelper. Il peut par exemple modifier les propriétés des cellules Th17 en limitant leur transformation en cellules Th17/Th1 ou en favorisant la production d'IL-17A ou l'expression des ectonucléotidases CD39/73 par les Th17 (Thibaudin *et al*, 2016). Les cellules T régulatrices peuvent également exprimer les ectonucléotidases CD39 et CD73 qui permet la production d'adénosine. Comme les cellules tumorales, les T_{reg} peuvent induire une inhibition de la réponse effectrice par contact. L'expression d'un grand nombre de récepteurs inhibiteurs tels que PD-L1 (B7-H1), CTLA-4, Lag3 ou encore HVEM favorise l'inhibition des lymphocytes T conventionnels. Par ailleurs, alors qu'ils induisent des signaux inhibiteurs sur les T conventionnels, ces récepteurs induisent au sein du T_{reg} des signaux de prolifération, de survie et augmentent leur capacité immunosuppressive (Figure 11).



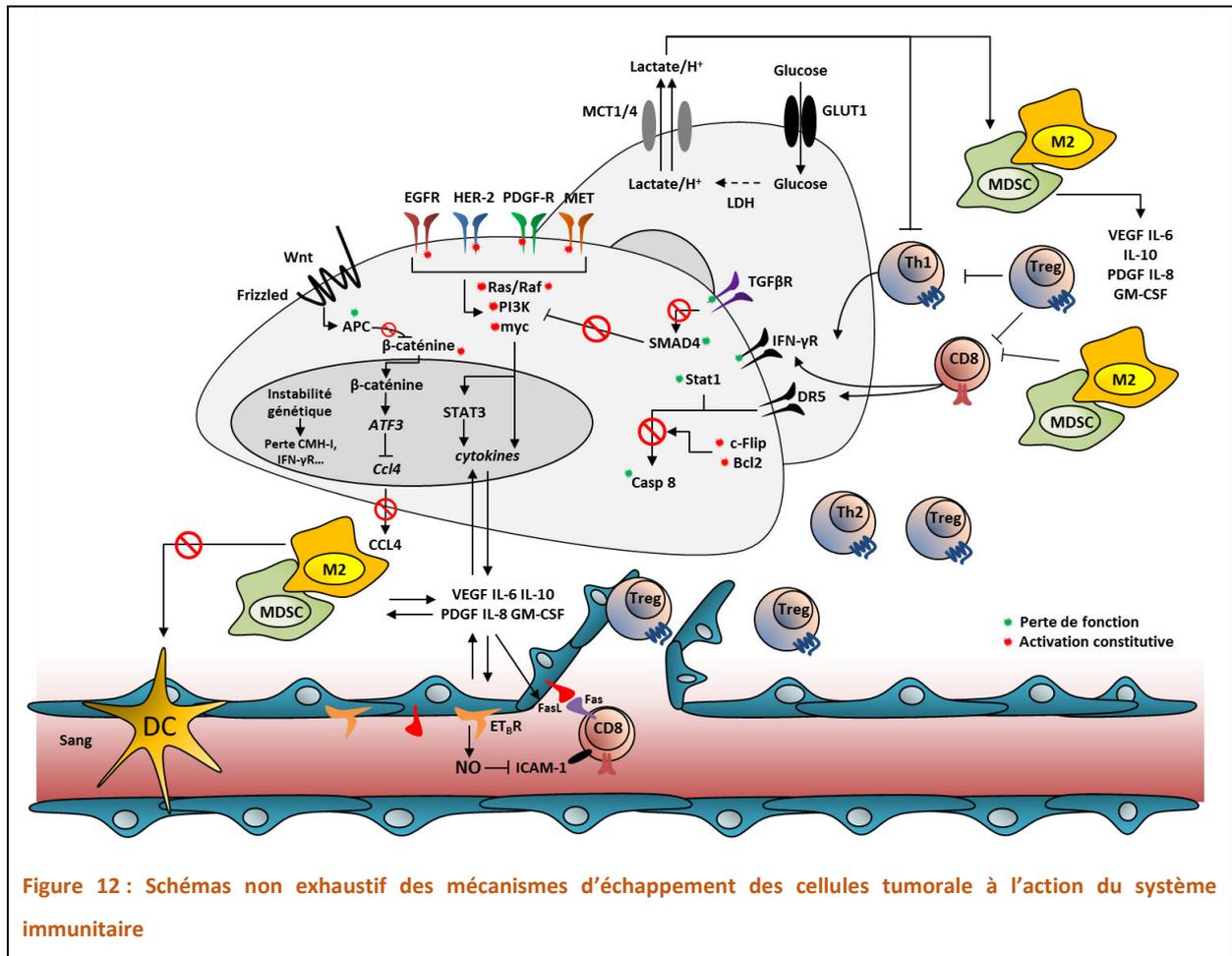
Recrutement et activation des lymphocytes Th2

Comme nous l'avons vu précédemment, le rôle des lymphocytes Th2 dans un contexte de cancer est controversé. Néanmoins l'expression des récepteurs CCR4 et CRTH2 peuvent favoriser, au même titre que les T_{reg}, leur infiltration dans la tumeur. Le CRTH2 permet aux cellules Th2 de migrer dans les tissus riches en PGD2. Ce médiateur lipidique est produit en cas de dommages tissulaires par les mastocytes. Or, il est intéressant de noter que l'infiltration des mastocytes est associée dans plusieurs types de cancer (foie, colon, estomac) comme un facteur de mauvais pronostic. Ils induisent notamment l'angiogenèse et favorisent la dissémination métastatique (Leporini *et al*, 2015; Suzuki *et al*, 2015). Même si le lien direct n'a encore pas été fait, on peut penser qu'il existe un lien entre l'infiltration des mastocytes, producteur de PGD2 et les Th2 qui expriment CRTH2. Les cellules Th2 seraient certainement alors associées comme les mastocytes à un pronostic défavorable. En effet, une étude récente montre qu'il existe une corrélation positive entre l'expression génique du VEGF, de MMP7 et CRTH2. Ces trois gènes sont associés à un mauvais pronostic. Par ailleurs, ils sont aussi inversement corrélés à l'expression d'IRF1 et du Granzyme B ce qui témoigne d'une inhibition de la réponse T-CD8 et Th1 au sein de la tumeur (Gao *et al*, 2011). D'autre part, même si les cytokines produites par les cellules Th2 comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 soutiennent l'immunité humorale, il est clair que leur opposition à la différenciation des Th1, et par voie de conséquence, à celle des

lymphocytes cytotoxiques est en faveur d'un rôle plutôt pro-tumoral. Par ailleurs, l'IL-4 et l'IL-13 produites par les Th2 soutiennent la polarisation des macrophages de type 2 et l'activation des cellules myéloïdes immunosuppressives par l'intermédiaire de la voie STAT6 (Aspord *et al*, 2007). L'IL-4 peut également induire une résistance à l'apoptose des cellules tumorales (Li *et al*, 2008).

Recrutement et activation des macrophages de type 2

La présence de macrophages au sein d'une tumeur est généralement associée à un pronostic défavorable (Aspord *et al*, 2007; Bingle *et al*, 2002; Fridman *et al*, 2012; Medrek *et al*, 2012). De nombreuses tumeurs produisent à la fois des facteurs de croissance (M-CSF, GM-CSF) qui favorisent la prolifération des cellules myéloïdes et des chimiokines capables d'attirer les monocytes différenciés en macrophages (CCL2, CLL7, CLL8, MIP1 α et β). La polarisation des macrophages, au même titre que les cellules T-CD4⁺, est orientée par les cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral. La présence d'IL-4, d'IL-13 et d'IL-10 favorise clairement la polarisation vers le type 2. Malheureusement, ces macrophages de type 2 possèdent un rôle clairement immunosuppressif puisqu'ils produisent de grande quantité d'IL-6 et d'IL-10, des cytokines qui conduisent à l'activation de STAT3. Ils expriment aussi fortement l'arginase 1, une enzyme responsable de l'appauvrissement du microenvironnement en arginine, un acide aminé essentiel à la prolifération des cellules T effectrices. La transformation de l'arginine en ornithine par l'arginase 1 conduit à une diminution de la capacité des macrophages à produire du NO, une molécule anti-tumorale, et des cytokines pro-inflammatoires capables d'aider à la maturation des cellules dendritiques (Pollard, 2004).



Le recrutement par la tumeur d'autres populations leucocytaires possédant des propriétés immunosuppressives et/ou pro-angiogéniques favorise également l'échappement des cellules cancéreuses à la surveillance du système immunitaire. Nous allons à présent examiner plus en détails le rôle que peuvent jouer les cellules myéloïdes suppressives et les cellules Th17.

II. Les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC)

1. Origine, expansion et activation des MDSCs

La tumeur favorise l'infiltration de cellules immunosuppressives pour soutenir sa croissance et surtout pour limiter l'action cytotoxique des lymphocytes T effecteurs. Les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC) représentent une de ces populations capables d'induire une répression de la réponse immunitaire locale et périphérique.

a) Origines des cellules MDSC

Même si l'appellation « cellules myéloïdes immunosuppressives » (MDSC) est relativement récente (Young *et al*, 1987), la relation entre les cellules myéloïdes et la progression tumorale est connue déjà depuis le début du XX^{ième} siècle (Sonnenfeld A, 1929). A l'époque, une augmentation de l'hématopoïèse extra-médullaire et une hyperneutrophilie avait été observée chez les personnes atteintes de cancer. Trente ans plus tard, William Robinson émet l'hypothèse qu'il existe un lien étroit entre la tumeur et une différenciation myéloïde anormale. En 1965, l'équipe de Robinson découvre que le GM-CSF, un facteur de croissance hématopoïétique, est présent en quantité importante chez les personnes atteintes de cancer. On pensait que le GM-CSF pouvait donc faire ce lien, et qu'il pouvait provenir de la tumeur (Robinson, *et al*, 1965). Suite aux travaux de Bennet qui les décrit comme ces cellules myéloïdes anormales capables de limiter le nombre et l'activité des cellules cytotoxiques on les surnomma : cellules suppressives naturelles (Bennett *et al*, 1978). Les caractéristiques de ces cellules étaient très difficiles à décrire. En effet, d'un type de tumeur à l'autre les chercheurs constataient qu'il existait une grande variabilité phénotypique des cellules suppressives naturelles. On se rendit compte finalement, que cette hétérogénéité était induite par la variabilité quantitative et qualitative des facteurs de croissances hématopoïétiques produites par les cellules tumorales (Fidler, 1978). Un peu plus tard on renomma ces cellules, cellules myéloïdes suppressives (MDSC), terme qui désigne non pas une population leucocytaire particulière, mais plutôt une famille aux propriétés et aux caractéristiques biologiques communes, basées sur l'immunosuppression.

Les études récentes montrent que les cellules MDSC ne sont retrouvées qu'à l'état de « trace » dans le sang ou les organes lymphoïdes secondaires des souris saines. Il en est de même chez l'homme qui ne présente pas de pathologies inflammatoires ou cancéreuses. Ces cellules sont néanmoins retrouvées en grande quantité dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires en cas de cancer. Chez la souris on estime qu'elles peuvent représenter plus de 20 à 40 % des splénocytes

nucléés après transplantation de cellules tumorales (2 à 4% chez les souris saines). On retrouve également de grande quantité de cellules MDSC au sein de la tumeur (Vincent *et al*, 2010). Chez l'homme, le taux de cellules MDSC dans le sang circulant peut-être 5 à 10 fois plus important en comparaison de celui de volontaires sains (Almand *et al*, 2001; Ochoa *et al*, 2007). Ces observations confirment les conclusions émises par l'équipe de Robinson : l'expansion et l'activation des cellules MDSC sont liées à la présence d'une tumeur qui stimule une myélopoïèse extra-médullaire anormale. L'hématopoïèse et en particulier la myélopoïèse, sont des processus biologiques finement régulés. Les cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse sont capables de générer un grand nombre de précurseurs myéloïdes distincts qui ont perdu la capacité d'autorenouveaulement et qui sont engagés dans un processus complexe de différenciation. Dans des conditions non pathologiques, ces cellules myéloïdes immatures restent confinées dans la moelle osseuse, ont une durée de vie très courte et circulent très peu en périphérie. De plus, elles gardent la capacité de se différencier très vite en cas de stimulation. Dans des conditions pathologiques, et c'est particulièrement vrai en cas de cancer, cette myélopoïèse est fortement dérégulée. En effet, la tumeur va produire des médiateurs inflammatoires qui stimulent une « hématopoïèse d'urgence ». Cette hématopoïèse particulière va favoriser l'expansion de cellules myéloïdes immatures (MDSC) au détriment du compartiment lymphoïde. L'augmentation du nombre de ces cellules est le résultat de deux processus concomitants : une inhibition de la différenciation en cellules matures et une stimulation de la prolifération (Figure 13)

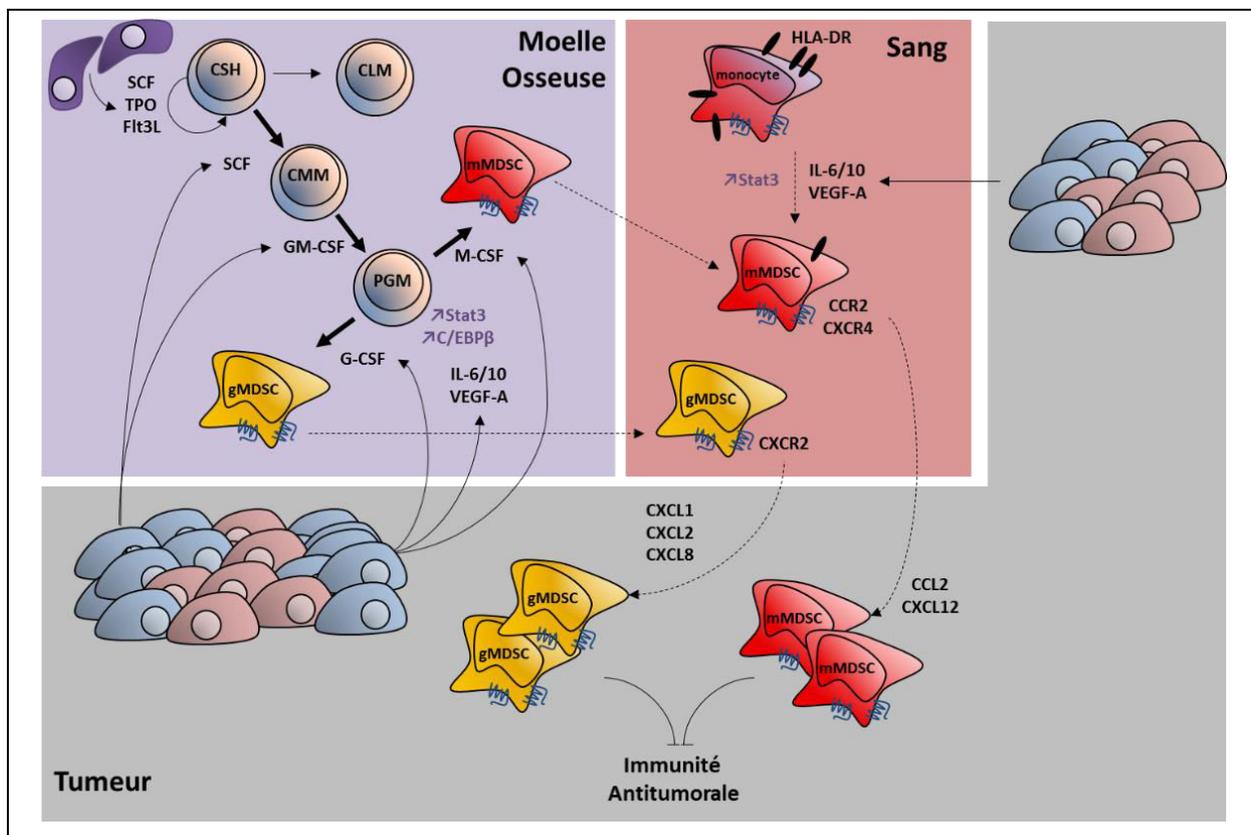


Figure 13 : Mécanismes de recrutement et d'expansion des cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC). Schéma récapitulatif des mécanismes cellulaires et moléculaire lié à la prolifération et à la migration des cellules MDSC.

La première étape permettant l'expansion des cellules myéloïdes est une augmentation de la production de SCF (Stem Cell Factor). Le SCF permet d'orienter les cellules souches hématopoïétiques vers la différenciation en cellules myéloïdes multipotentes (CMM). L'inhibition de la signalisation induite par le SCF par neutralisation de son récepteur c-KIT, contribuent à limiter l'expansion des MDSC et la progression tumorale chez la souris (Pan *et al*, 2008). Sous l'action du GM-CSF produit en très grande quantité par les cellules tumorales, les CMM se transforment en progéniteur granulomonocytaire (PGM). Le GM-CSF favorise également la prolifération de ces cellules par l'activation de la voie STAT5 qui conduit à l'expression de Bcl-xL, de la survivine, de c-myc et des cyclines. Comme pour le SCF, la neutralisation du GM-CSF à l'aide d'un anticorps monoclonal, empêche l'expansion des MDSC et limite la croissance tumorale. Les progéniteurs granulomonocytaire vont ensuite s'orienter en progéniteur monocytaire sous l'action du M-CSF ou en progéniteur granulocytaire sous l'action du G-CSF. C'est à ce stade de différenciation que va se bloquer la maturation des cellules myéloïdes. Ainsi, les progéniteurs monocytaires constitueront le groupe des MDSC monocytaires (mMDSC) et les progéniteurs granulocytaires celui des MDSC granulocytaires (gMDSC). D'un point de vue moléculaire, il semble que le blocage de la maturation s'opère par l'intermédiaire de différentes cytokines qui induisent l'expression et l'activation de STAT3. L'IL-6, l'IL-10 ou encore le VEGF-A produits par les cellules tumorales, font partie de ces cytokines qui bloquent la maturation des MDSC par l'intermédiaire de STAT3 (Bunt *et al*, 2007; Sica & Bronte, 2007). *In vitro*, l'exposition de cellules souches hématopoïétiques au surnageant de cellules cancéreuses induit fortement l'activation de la voie JAK2/STAT3 et cette activation est associée à une expansion des cellules du type MDSC. Dans ces mêmes conditions, si l'activation de STAT3 est bloquée par l'utilisation d'un agent pharmacologique, l'expansion des MDSC est supprimée (Nefedova *et al*, 2004). *In vivo*, il semble également que les MDSC de souris porteuses de tumeurs possèdent un niveau de phosphorylation de STAT3 nettement augmenté par rapport aux MDSC de souris naïves (Nefedova *et al*, 2005). L'ablation de STAT3 par déplétion génétique dans le compartiment myéloïde permet de limiter la croissance tumorale en restaurant les fonctions effectrices des lymphocytes T, B et NK ainsi que celles des cellules dendritiques (Kortylewski *et al*, 2005; Nefedova *et al*, 2005). L'accumulation des cellules MDSC induite par STAT3 passe comme pour le GM-CSF et la voie STAT5 par une induction des gènes de la prolifération et de la survie (c-myc, Bcl-xL, Bcl-2, cyclines D1, A, survivine). Par ailleurs, STAT3 permet également l'expression des protéines S100A8 et S100A9, qui peuvent former des hétérodimères et agir de manière autocrine au niveau du

récepteur RAGE (« receptor for advanced glycation end products »). La signalisation induite alors, empêche la maturation des MDSC en cellules dendritiques matures ou en macrophages. De plus, les hétérodimères S100A8/A9 attirent les cellules MDSC au niveau du site tumoral par l'intermédiaire d'une voie impliquant le facteur de transcription NFκB. Les souris déficientes pour S100A8 et S100A9 présentent des taux de MDSC bien inférieurs et ont une activité T-CD8⁺ cytotoxique bien supérieure en comparaison des souris sauvages (Cheng *et al*, 2008; Sinha *et al*, 2008). La PGE2 est aussi un facteur important pour entretenir les mécanismes de prolifération des MDSC. En effet, l'inhibition de la production de PGE2 par des anti-inflammatoires non stéroïdiens permet de limiter l'expansion périphérique et intra-tumorale des MDSC par une diminution des taux de CCL2. On retrouve également l'ensemble des récepteurs à la PGE2 à la surface des MDSC (EP-1 à EP-4). La signalisation induite par l'activation des récepteurs EP permet l'activation des voies de survie et de prolifération Ras/MAPK et PI3K/AKT. On comprend dès lors pourquoi un traitement par l'aspirine ou le celecoxib permet de retarder la croissance tumorale d'une façon dépendante des MDSC chez la souris (Fujita *et al*, 2011). L'expansion extra-médullaire des MDSC va s'opérer sous l'action d'un grand nombre de chimiokines qui vont pouvoir préférentiellement recruter les précurseurs monocytaires qui expriment CCR2 et CXCR4 (CCL2, CXCL12) ou les progéniteurs granulocytaires qui expriment CXCR1 et CXCR2 (CXCL1, CXCL2, CXCL8) (Stromnes *et al*, 2014).

L'expansion des mMDSC peut également survenir par dédifférenciation des monocytes circulants. Un des paramètres permettant de faire la distinction entre les monocytes des mMDSC est le niveau d'expression du HLA-DR. Les cellules mMDSC ont une expression du HLA-DR très faible voire nulle en comparaison des monocytes. Ainsi, l'exposition de monocytes circulants à un surnageant de culture de cellules tumorales conduit à une forte diminution de l'expression du HLA-DR et du CD14. Les monocytes deviennent alors capables de convertir des cellules T-CD4⁺ Foxp3⁻ en cellules T-CD4⁺ Foxp3⁺ grâce à la sécrétion de TGF-β (Hoechst *et al*, 2011). Ces modifications phénotypiques et fonctionnelles semblent encore une fois liée à une activation prolongée de la voie STAT3 (Panni *et al*, 2014; Schilling *et al*, 2013).

b) Mécanismes d'activation

L'expansion des MDSC n'est pas suffisante pour la mise en place d'une immunosuppression efficace. Il est également essentiel que les cellules MDSC soient activées. L'activation des MDSC est rendue possible par la présence au sein de la tumeur de cytokines (IL-1β, IFNγ, IL-4, IL-13, TGF-β), de facteurs du complément ou de ligands des TLRs.

L'IFNγ et l'IL-1β produits par les cellules Th1, T-CD8 ou NK va agir de manière paracrine sur les cellules MDSC et activer la voie JAK1/STAT1. Cette voie d'ordinaire impliquée dans l'élimination

des cellules tumorales, va au contraire activer les MDSC et induire l'expression des enzymes arginase-1 et iNOS. Par ailleurs, l'expression de l'arginase-1 et de la iNOS peut être amplifiée si la voie JAK3/1/STAT6 est induite par l'IL-4 et l'IL-13. Ces observations ont été confirmées, puisque la perte de STAT1 et de STAT6 empêche l'expression de l'arginase-1 après activation de l'IL-4R α . Par ailleurs, la voie IL-4/STAT6 semble également importante pour induire la sécrétion de TGF- β par les MDSC et favoriser l'inhibition de la réponse immunitaire dans un modèle de sarcome murin (Terabe *et al*, 2003).

Les protéines du complément impliquées dans les processus de mort induits par la fixation des anticorps peuvent aussi jouer un rôle dans l'activation des MDSC. En effet, en plus de leur rôle d'attraction des MDSC, les protéines C5a et C3a peuvent induire la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote au sein des cellules MDSC granulocytaires. L'utilisation de souris déficientes pour le récepteur au C5a indique que le C5a favorise la croissance tumorale et que ce processus implique la régulation des fonctions suppressives des gMDSC (Markiewski *et al*, 2008).

L'activation des TLR (« *Toll-like Receptors* ») par des ligands présents dans le microenvironnement tumoral favorise également l'activation des fonctions immunosuppressives des MDSC. Ce phénomène est majoritairement dû à l'activation du facteur de transcription NF κ B qui induit l'expression de la COX-2, de la iNOS et de l'arginase-1. Par ailleurs, la sécrétion par les cellules tumorales d'exosomes qui contiennent la protéine HSP72 permet l'activation de la voie TLR2-Myd88 dans les cellules MDSC. Cette voie va favoriser la sécrétion d'IL-6 et l'activation des fonctions suppressives des MDSC par stimulation autocrine de STAT3 (Chalmin *et al*, 2010).

2. Mécanismes impliqués dans l'activité immunosuppressive de MDSCs

C'est au début des années 1990 que l'importance fonctionnelle des cellules MDSC dans l'immunité et le cancer a commencé à être décrite. En 1992, l'équipe de Wright montra qu'il était possible de restaurer une immunité tumorale en inhibant les fonctions suppressives des MDSC en traitant les souris porteuses d'un carcinome pulmonaire par de l'IFN γ et du TNF α (Young & Wright, 1992). Trois ans plus tard, en 1995, on découvrit une corrélation entre la présence de cellules suppressives CD34⁺, l'expression du GM-CSF et la présence de métastases chez les patients porteurs d'un carcinome épidermoïde ORL (Pak *et al*, 1995). La même année, une équipe de l'université de Chicago utilisa un anticorps monoclonal anti-Gr-1, dans le but de dépléter les souris porteuses de tumeurs en cellules granulocytaires. Cette déplétion eue pour conséquence de retarder la croissance tumorale (Lisa *et al*, 1995). Un peu plus tard, l'équipe de Dimitri Gabrilovich démontra que le VEGF-A participait à l'expansion de ces cellules et que son inhibition permettait de restaurer une immunité

anti-tumorale efficaces (Gabrilovich *et al*, 1998). Depuis, de nombreuses études ont permis de décrire plus précisément le phénotype ainsi que les mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels les MDSC induisent l'immunosuppression (résumé en Figure 14).

a) Consommation des acides aminés essentiels

Un des premiers mécanismes décrits pour expliquer l'immunosuppression induite par les MDSC est la consommation et la dégradation des acides aminés essentiels aux fonctions anti-tumorales des lymphocytes T et c'est particulièrement le cas pour l'arginine et la cystéine. L'arginine est absorbée par les MDSC *via* le transporteur CAT2 et dégradée par deux voies enzymatiques distinctes : celle de l'oxyde nitrique synthase qui libère du monoxyde d'azote (NO) et de la citrulline et celle de l'arginase-1 qui génère de l'urée et de la L-ornithine. Or, l'activation des MDSC par les ligands des TLRs ou par l'IFN γ , provoque la surexpression de NO synthase inducible (iNOS) (plutôt exprimée par les mMDSC) et de l'arginase-1 (plutôt exprimée par les gMDSC) par l'intermédiaire des facteurs de transcription STAT1, STAT3 et NF κ B (Raber *et al*, 2014). Cette activation provoque une consommation excessive d'arginine qui est associée à une chute considérable de la prolifération des lymphocytes T. En effet, les lymphocytes T, qui ne peuvent synthétiser eux-mêmes l'arginine, doivent absolument l'importer du milieu extracellulaire pour progresser dans le cycle cellulaire. L'absence d'arginine induit l'activation de la kinase GCN2 qui stoppe les cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire par inhibition de l'expression de la cycline D3 et de CDK4 (Rodriguez *et al*, 2007a). Le manque d'arginine provoque également une diminution de l'expression de la chaîne CD3 ζ , ce qui limite l'activation du TCR des lymphocytes intra-tumoraux (Rodriguez *et al*, 2002). Ce mécanisme de suppression a été confirmé chez la souris et chez l'homme dans un contexte tumoral. En effet, la déplétion en cellules MDSC permet de restaurer une prolifération des cellules T et une augmentation de l'expression du CD3 ζ . Chez l'homme, on a pu constater qu'une inhibition de la voie STAT3 permettait de limiter l'expression de l'arginase-1 et de restaurer l'activité cytotoxique des cellules T-CD8 dans le cancer de la prostate (Hossain *et al*, 2015). La cystéine est un autre acide aminé important pour la prolifération des cellules T effectrices. Cet acide aminé doit absolument être importé du milieu extracellulaire puisque les lymphocytes T n'ont pas le bagage enzymatique pour sa synthèse. En général, la cystéine est apportée par la dégradation de la cystine ou de la méthionine au sein des cellules dendritiques et des macrophages. La cystéine est ensuite exportée dans le milieu par l'intermédiaire d'un transporteur des acides aminés, le transporteur ASC. Néanmoins, la présence des MDSC dans la tumeur bloque ce processus. En effet, même si les MDSC sont capables de produire de la cystéine, elles sont incapables de la transporter dans le milieu extracellulaire car elle n'exprime par le transporteur ASC. La déplétion du microenvironnement tumoral induite par les

MDSC est donc un mécanisme supplémentaire pour induire l'immunosuppression (Srivastava *et al*, 2010).

b) Production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Le catabolisme de l'arginine provoque certes une chute de sa concentration extracellulaire, mais également une production importante d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. La dégradation de l'arginine par la voie de la iNOS, provoque une production accrue de monoxyde d'azote (NO), une molécule instable et extrêmement réactive. Le NO est capable à lui seul de moduler l'activation des lymphocytes T effecteurs en inhibant les voies de prolifération PI3K/AKT, STAT5 ou encore les MAPK par nitrosylation du TCR, du CD3 ou encore du CD8. De plus, l'instabilité du NO provoque sa transformation en peroxyde d'azote (ONOO⁻) lorsqu'il est en présence d'anion superoxyde (O₂⁻) qui provient de la dégradation de l'O₂ par les NADPH oxydases exprimées également par les MDSC. Récemment, des études viennent de montrer que cette production de peroxyde d'azote avait une influence directe sur l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale. Les mécanismes impliqués sont notamment une inhibition des capacités de migration des cellules T par nitrosylation de la chimiokine CCL2, ou encore une perturbation de la reconnaissance antigénique par nitrosylation des antigènes tumoraux (Molon *et al*, 2011).

c) Inhibition de l'activation et de la viabilité des lymphocytes T

Les MDSC peuvent également inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale en modulant directement l'activation des lymphocytes T ou en induisant leur mort. En effet, il a été clairement montré que les MDSC pouvaient produire d'importante quantité d'IL-10 et de TGF- β ce qui favorise l'inhibition des lymphocytes T conventionnels et l'expansion des lymphocytes T régulateurs. Par ailleurs, la présence de TGF- β est un facteur majeur dans la transdifférenciation des Th17 en T_{Reg} au niveau du microenvironnement tumoral (Hoechst *et al*, 2011; Huang *et al*, 2006). L'expansion des lymphocytes T_{Reg} pourrait aussi s'expliquer par la production d'adénosine permis par les MDSC *via* l'expression de CD39 (Zhang *et al*, 2013). D'autre part, l'IL-10 et le TGF- β ont un rôle majeur sur la diminution de la maturation des cellules dendritiques, qui se traduit par une chute de la production d'IL-12 (Hu *et al*, 2011), des cellules NK, ou encore des macrophages résidents en cellule de type 1 (Sica & Bronte, 2007). Enfin, certaines études montrent que les MDSC ont la possibilité d'exprimer des récepteurs inhibiteurs de la réponse immunitaire tels que la galectine-9, ou encore PD-L1 mais également la protéase ADAM7. La galectine-9 permet d'induire l'apoptose des lymphocytes T-CD4⁺ et T-CD8⁺ en se liant à la protéine Tim-3 (Sakuishi *et al*, 2011). L'expression de PD-L1 par les MDSC présentes dans la tumeur est induite par l'intermédiaire du facteur de transcription HIF-1 α qui est induit en condition d'hypoxie. Comme nous l'avons déjà évoqué, PD-L1 permet ensuite de bloquer la

réponse immunitaire anti-tumorale en bloquant les voies de prolifération et d'activation des lymphocytes T (Noman *et al*, 2014). Pour ce qui est du rôle de la protéase ADAM17, il semblerait qu'elle conduise au clivage de la protéine CD62L qui est impliquée dans la migration des cellules T naïves ou mémoires au niveau des organes lymphoïdes secondaires (Hanson *et al*, 2009).

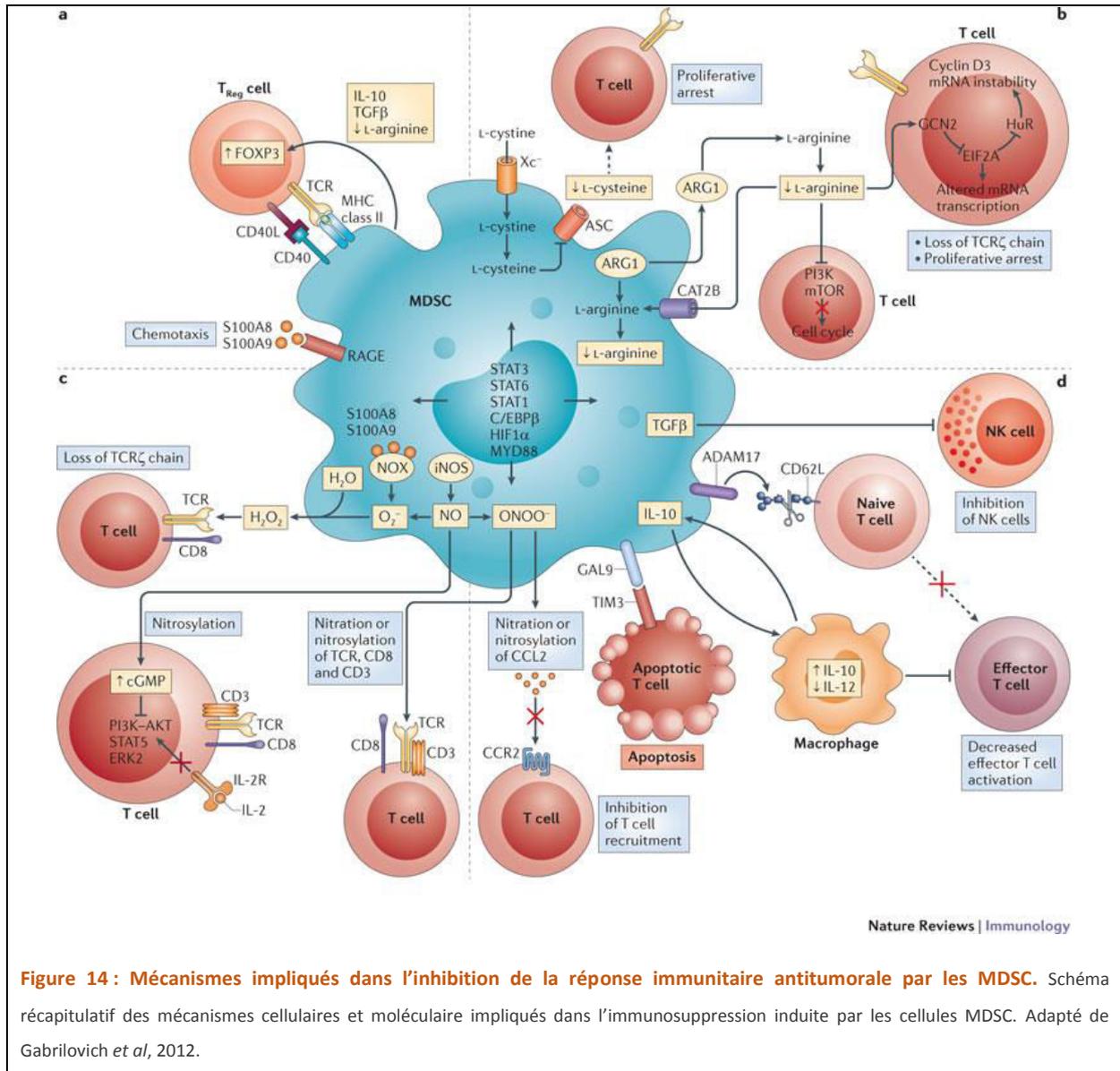


Figure 14 : Mécanismes impliqués dans l'inhibition de la réponse immunitaire antitumorale par les MDSC. Schéma récapitulatif des mécanismes cellulaires et moléculaire impliqués dans l'immunosuppression induite par les cellules MDSC. Adapté de Gabrilovich *et al*, 2012.

3. Promotion de l'angiogenèse

Comme nous l'avons vu précédemment, l'angiogenèse est un processus délétère dans un contexte de cancer puisqu'il favorise aussi bien la migration et l'évasion métastatique que l'immunosuppression. Les MDSC participent activement à l'angiogenèse. En effet, des études montrent que la co-injection de cellule tumorales coliques CT26 et de cellules MDSC dans la souris BALB/c provoque un niveau de croissance et une densité vasculaire bien plus importante qu'en

présence de cellules tumorales uniquement (Youn *et al*, 2008). Il a également été montré que le GM-CSF, permet de stimuler à la fois la myélopoïèse et l'expression de la protéine Bv8 (prokinétine) dans les cellules CD11b⁺ Gr-1⁺. Cette protéine est fortement impliquée dans le processus d'angiogenèse puisque c'est un puissant facteur mitogène pour les cellules endothéliales (Lin *et al*, 2002). Bv8 favorise également une boucle autocrine entre les cellules MDSC et l'angiogenèse puisqu'elle contribue à la stimulation de la myélopoïèse et à la génération des MDSC (LeCouter *et al*, 2004). Pour ces différentes raisons, l'utilisation d'un anticorps permettant de neutraliser la protéine Bv8 conduit à une diminution de la vascularisation tumorale. Les MDSC permettent également de faire le lien avec l'angiogenèse par l'intermédiaire des protéases matricielles (MMP2, MMP9, MMP13, et MMP14) qui digèrent et détruisent la matrice extracellulaire, une étape majeure du processus angiogénique. L'expression de ces enzymes est amplifiée par la présence de facteurs solubles dérivés de la tumeur (Yang *et al*, 2004). Dans le modèle de carcinome pulmonaire de Lewis (LLC) le transfert de cellules MDSC déficientes pour la protéase MMP9 conduit à une croissance tumorale plus faible et à une vascularisation de la tumeur moins importante qu'en présence de MDSC exprimant normalement cette enzyme. Ce mécanisme s'explique par une augmentation de la biodisponibilité du VEGF-A suite à la dégradation matricielle induite par les MDSC. Dans le modèle de carcinome mammaire 4T1, la dégradation matricielle permet également de favoriser les contacts cellulaires entre MDSC et macrophages, favorisent l'expression de l'IL-10, tout en inhibant celle de l'IL-12 et de l'INF- γ ce qui conduit indirectement à une stimulation de l'angiogenèse (Sica & Bronte, 2007; Sinha *et al*, 2008). L'hypoxie est aussi responsable des propriétés pro-angiogéniques des MDSC. Elle favorise tout d'abord l'infiltration de ces cellules dans les zones hypoxiques par l'intermédiaire de Bv8 et de CXCL2 (Du *et al*, 2004 ; Shojaei *et al*, 2007). Puis, une fois au niveau des vaisseaux nouvellement formés, l'hypoxie induit une modification du phénotype des MDSC. Elles acquièrent un phénotype de cellules endothéliales en exprimant les marqueurs CD31 (PECAM1) et VEGFR2, ce qui suggère une incorporation des MDSC directement dans l'endothélium de la tumeur (Bronte *et al*, 2000; Yang *et al*, 2004).

4. Caractéristiques phénotypiques des MDSC

Comme nous venons de le dire, les cellules MDSC représentent une population hétérogène de progéniteurs myéloïdes. Chez la souris, les deux sous-types de MDSC expriment le marqueur CD11b (ou Mac-1) et le marqueur Gr-1. Le CD11b correspond à l'intégrine α -M, impliquée dans les phénomènes d'adhésion et de migration des cellules myéloïdes et est exprimé à la fois par les cellules immatures et les cellules différenciées de type monocytes, granulocytes ou cellules dendritiques. Le marqueur Gr-1 est, quant à lui, exprimé majoritairement par les précurseurs

granulocytaires et en quantité très faible par les précurseurs monocytaires. Morphologiquement les cellules Gr-1⁺ et CD11b⁺ présentent des caractéristiques associées à la fois aux cellules de type monocyttaire (mononucléaire) et de type granulocyttaire (polynucléaire). Plus tard, on se rendit compte que l'anticorps polyclonal utilisé pour marquer le Gr-1 reconnaissait en réalité deux épitopes différents : le Ly-6G et le Ly-6C. L'utilisation d'anticorps spécifiques permis de faire la distinction entre les mMDSC (CD11b⁺ Ly-6G⁻ Ly-6C^{high}) et les gMDSC (CD11b⁺ Ly-6G^{high} Ly-6C^{low}) (Youn *et al*, 2008). Ces dernières années, d'autres molécules de surface ont pu être identifiées, permettant de faire une distinction plus précise des deux sous-types (Tableau 3) (Gallina *et al*, 2006; Huang *et al*, 2006).

Chez l'homme, les MDSC sont caractérisées par l'absence de tous les marqueurs de la lignée lymphoïde (Lin⁻ = CD3⁻, CD19⁻, CD20⁻ et CD56⁻), par l'expression du CD33, du CD11b et par l'absence ou la très faible expression du HLA-DR (Almand *et al*, 2001). Comme chez la souris, il existe également deux sous-types de MDSC chez l'homme. Les mMDSC sont Lin⁻ CD33⁺ CD11b⁺ HLA-DR^{low/-} et CD14⁺ alors que les gMDSC sont Lin⁻ CD33⁺ CD11b⁺ HLA-DR^{low/-} et CD15⁺ (Filipazzi *et al*, 2007; Poschke *et al*, 2010). La caractérisation phénotypique des cellules MDSC n'est encore pas clairement établi et de nombreux marqueurs sont encore à ce jour identifiés à la surface de ces cellules (Tableau 3).

Tableau 3 : Marqueurs membranaires des cellules MDSC monocytaires et granulocytaires chez la souris et chez l'homme

D'après (Talmadge & Gabrilovich, 2013). (NA : Non Applicable), + (ss-type) : exprimé de façon hétérogène.

Marqueurs	Souris		Homme	
	mMDSC	gMDSC	mMDSC	gMDSC
CCR2	+	+	+	-
CXCR4	+	+	+	+
CXCR2	+	+	+ (ss-type)	+
CD11b	+	+	+	+
CD11c	+ (ss-type)	+ (ss-type)	+ (ss-type)	+ (ss-type)
CD13	NA	NA	+ (ss-type)	+ (ss-type)
CD14	NA	NA	+	faible
CD15	NA	NA	-	+
CD16	faible	faible	+ (ss-type)	+ (ss-type)
CD31	-	-	-	-
CD33	NA	NA	+ (ss-type)	+ (ss-type)
CD34	NA	NA	+ (ss-type)	+ (ss-type)
CD38	NA	NA	+ (ss-type)	+ (ss-type)
CD39	NA	NA	+	+
CD45	+	+	+	+
CD62L	faible	faible	faible	faible
CD66b	NA	NA	-	+
CD80	+	+	+	+
CD115	+	+ (ss-type)	+	-
KIT	-	-	faible	+
CD124	+	+	+	-
F4/80	+	-	NA	NA
Gr-1	faible	fort	NA	NA
HLA-DR	NA	NA	-/faible	-/faible
LIN	-	-	-	-
Ly-6C	+	faible	NA	NA
Ly-6G	-	+	NA	NA
CMH-I	+	+	+	+
CMH-II	+	+	-	-
SCA1	+ (ss-type)	+ (ss-type)	NA	NA
TIE2	-	-	+	-
VEGFR1	+	+	+	+
VEGFR2	+	+	+	+
Integrine $\alpha 4\beta 1$	+ (ss-type)	-	+ (ss-type)	+ (ss-type)

5. Devenir des MDSC au sein du microenvironnement tumoral

Les MDSC ne sont pas des cellules phénotypiquement et fonctionnellement stables. Les caractéristiques des cellules MDSC sont extrêmement dépendantes de l'environnement qui les entoure et en particulier l'environnement inflammatoire et immunosuppresseur de la tumeur. Il a été montré que les cellules MDSC issues de souris porteuses de tumeurs pouvaient, après transfert dans des souris saines ou après remise en culture sans facteurs tumoraux, se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques matures. Au contraire, la présence de facteurs solubles dérivés de la tumeur, ou le transfert de cellules MDSC dans des souris porteuses de cancer empêche leur polarisation en macrophages anti-tumoraux ou en cellules dendritiques matures (Narita *et al*, 2009). Le microenvironnement tumoral peut néanmoins induire leur différenciation en macrophages de type 2 ou en cellules dendritiques tolérogènes par l'intermédiaire de l'IL-4, de l'IL-10 et du TGF- β . De

plus, la polarisation en macrophages de type 2 est fortement orientée par l'activation du facteur de transcription HIF-1 α induit en cas d'hypoxie (Corzo *et al*, 2010; Doedens *et al*, 2010).

6. Stratégies thérapeutiques permettant de cibler les MDSC

Les recherches menées en oncologie ces dernières années montrent que le succès des thérapies anticancéreuses repose fortement sur l'inhibition de l'immunosuppression. C'est pour cette raison que l'inhibition des fonctions immunosuppressives des MDSC est une stratégie intéressante pour restaurer une réponse immunitaire anti-tumorale et induire une régression tumorale. Grâce à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires permettant l'expansion et l'activation des fonctions immunosuppressives des MDSC, il a été possible d'envisager et de tester plusieurs stratégies d'inhibition (détails dans le tableau 4) :

- ✓ Inhiber la génération et l'expansion des MDSC
- ✓ Inhiber la circulation des MDSC de la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes et la tumeur
- ✓ Inhiber les fonctions immunosuppressives
- ✓ Induire la maturation en macrophages de type 1 ou en cellules dendritiques fonctionnelles
- ✓ Inhiber la polarisation en macrophages de type 2 ou en cellules dendritiques tolérogènes

Tableau 4 : Stratégies pharmacologiques permettant de cibler les MDSC dans le cancer. (Nagaraj *et al*, 2013)

Mechanism of action	Agent	Study finding	Reference
Promoting MDSC differentiation	ATRA	Induced MDSC differentiation into myeloid DC in mice/humans. Improved T cell response	Gabrilovich et al. (2001)
	Vit D3	High plasma concentrations of ATRA correlated with reduced MDSC levels HNSCC pts treated with oral VitD3 had decreased MDSC	Mirza et al. (2006) Lathers et al. (2004), Ugel et al. (2009)
Decreasing MDSC levels	Sunitinib	Treatment in RCC pts decreased MDSC (monocytic and lineage negative subsets) and increased myeloid DC in patients experiencing tumor regression	van Crujisen et al. (2008)
		Treatment in RCC pts decreased MDSC and T _{reg} levels, improved T cell function (IFNY production)	Finke et al. (2008), Ko et al. (2009)
		In mouse model (MCA 26) sunitinib reduced MDSC levels in tumor and also T _{regs} Synergized with immunotherapy to reduce tumor size Reduced PDL1 expression	Ozao-Choy et al. (2009)
		In B16 Ova mouse model sunitinib reduced MDSC and T _{eg} in tumor Reduced levels of immunosuppressive co-stimulatory molecules and chemokines involved in MDSC and T _{reg} trafficking Synergy with vaccine to boost T cell anti-tumor response	Bose et al. (2010)
	Axitinib	Sunitinib reduced the viability of granulocytic-MDSC in tumor bearing mice and reduced the proliferation of monocytic MDSC	Ko et al. (2010)
		Reduced MDSC, T _{reg} , and enhanced T cell response in tumor bearing mice	Bose et al. (2010)
	Gemcitabine	Decreased splenic MDSC, improved CD8 and NK cell anti-tumor activity in 5 murine lung cancer models Reduces number <i>ex vivo</i> and then they show apoptosis of splenocytes <i>in vivo</i>	Suzuki et al. (2005)
		Early treatment in a murine mammary carcinoma model decreased MDSC, which correlated with tumor growth inhibition	Le et al. (2009)
	5-FU	Treatment decreased splenic and intra tumor MDSC, did not affect T, B, NK, or dendritic cells. 5-FU triggers MDSC apoptosis	Vincent et al. (2010)
		Reduced MDSC in spleen; increased CTL response; and polarized MDSC to M1 phenotype	Kodumudi et al. (2010)
Inhibiting MDSC function	CDDO-Me	In a murine model, decreased MDSC inhibitory function and decreased tumor growth. In RCC patients, completely abrogated MDSC inhibitory function <i>in vitro</i> In mice, did not affect number of MDSC in spleen, but eliminated suppressive activity of MDSC on CD8 ⁺ T cells <i>in vitro</i>	Nagaraj et al. (2010)
Inhibiting MDSC function	PDE-5 inhibitor	In mice, treatment down regulated ARG1 and NOS2, abrogated suppressive pathways. In isolated cells from cancer patients, restored T cell proliferation	Serafini et al. (2006b)
		In melanoma patients, treatment decreased MDSC levels and weakened suppressive function	Umansky and Sevko (2012)
		Sildenafil increased survival of tumor bearing mice by a CD8 ⁺ T cell dependant mechanism. Decreased MDSC number and immunosuppressive function	Meyer et al. (2011)
	COX-2 inhibitor	In a murine glioma model, treatment inhibited PGE-2 production and delayed glioma development. MDSC were decreased in bone marrow and within the tumor, CCL2 chemokine was decreased also	Fujita et al. (2011)
		In ovarian cancer pts, decreased MDSC levels in ascites correlated with CXCL12 and PGE-2 inhibition	Obermajer et al. (2011)
Nitro aspirin	Increased the number and function of tumor Ag-specific T lymphocytes <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> by decreasing ARG and NOS activity in CD11 ⁺ B lymphocytes	De Santo et al. (2005)	

Nous ne détaillerons pas tous les mécanismes moléculaires liés à ces stratégies (indiqué dans le tableau 4). Nous allons focaliser notre propos sur les stratégies d'élimination des MDSC par des agents pharmacologiques et en particulier par les agents chimiothérapeutiques. Nous verrons que certains d'entre eux peuvent éliminer les cellules MDSC et ainsi restaurer une immunité antitumorale. Nous verrons également quels sont les effets inattendus et/ou délétères de ces stratégies.

C'est pour la première fois en 2005 que l'équipe de Steven Albelda montre qu'une chimiothérapie utilisée habituellement pour sa capacité à cibler directement les cellules tumorales, induit une diminution des MDSC (Suzuki *et al*, 2005). Cette chimiothérapie, la gemcitabine, fait partie de la classe des anti-métabolites. Elle est utilisée dans le traitement d'un grand nombre de cancers : bronchique non à petites cellules, pancréas, sein, vessie, ovaire. L'équipe de Steven Albelda montre effectivement que la gemcitabine permet de réduire le nombre de cellules MDSC dans la rate de souris porteuses de tumeur. Cette observation a été faite dans cinq modèles de cancers différents : TC1, LLC, AE17 dans la souris C57bl/6, AB12 et L1C2 dans la souris BALB/c. Aucun effet n'a cependant été mesuré sur les autres sous-types leucocytaires tels que les lymphocytes T-CD4⁺, T-CD8⁺ ou encore les lymphocytes B, ce qui suggère que la gemcitabine est capable de cibler spécifiquement les MDSC. Les auteurs de cette étude ont montré que l'exposition des MDSC à la gemcitabine entraînait leur mort par apoptose et par nécrose en utilisant un marquage Annexine-V/Iodure de propidium sans pour autant en expliquer le mécanisme. La déplétion en MDSC induite par la gemcitabine permet de restaurer une activité anti-tumorale des cellules NK présentes dans la rate et s'accompagne d'une diminution de la masse tumorale. En 2007, c'est en collaboration avec Suzanne Ostrand-Rosenberg que l'équipe de Steven Albelda confirme cet effet de la gemcitabine et montre également que cette chimiothérapie permet de limiter la polarisation des macrophages de type 2 par les MDSC. La gemcitabine permet également une inhibition de la production d'IL-10 et un maintien de la production d'IL-12 (Sinha *et al*, 2008). Des résultats identiques ont été observés par l'équipe de Bear HD en 2009 (Le *et al*, 2009).

En 2010, l'équipe de Julie Djeu a montré que le docétaxel possède également des capacités anti-tumorales dans le modèle de carcinome mammaire 4T1 par l'intermédiaire de l'élimination des cellules MDSC. De façon très intéressante, cette étude montre également qu'en plus d'éliminer les MDSC, le docétaxel permet d'induire la maturation de ces cellules. Dans ce modèle, les cellules CD11b⁺ Gr1⁺ expriment largement le marqueur CD206 et faiblement le marqueur CCR7, un phénotype plutôt caractéristique des macrophages de type 2 aux propriétés pro-tumorales. Le traitement des souris porteuses de tumeurs 4T1 par le docétaxel modifie le phénotype de ces cellules (CD206⁺, CCR7⁻, CMH-II⁻, CD86⁻, CD11c⁻) en cellules mature de type 1 (CD206⁻, CCR7⁺, CMH-II⁺, CD86⁺, CD11c⁺). Cette modification est fortement associée à une réactivation des cellules T-CD8⁺ qui pourront produire de l'IFN γ . Selon les auteurs de cette étude, le mécanisme moléculaire sous-jacent à ces modifications implique l'inhibition de STAT3 (Kodumudi *et al*, 2010).

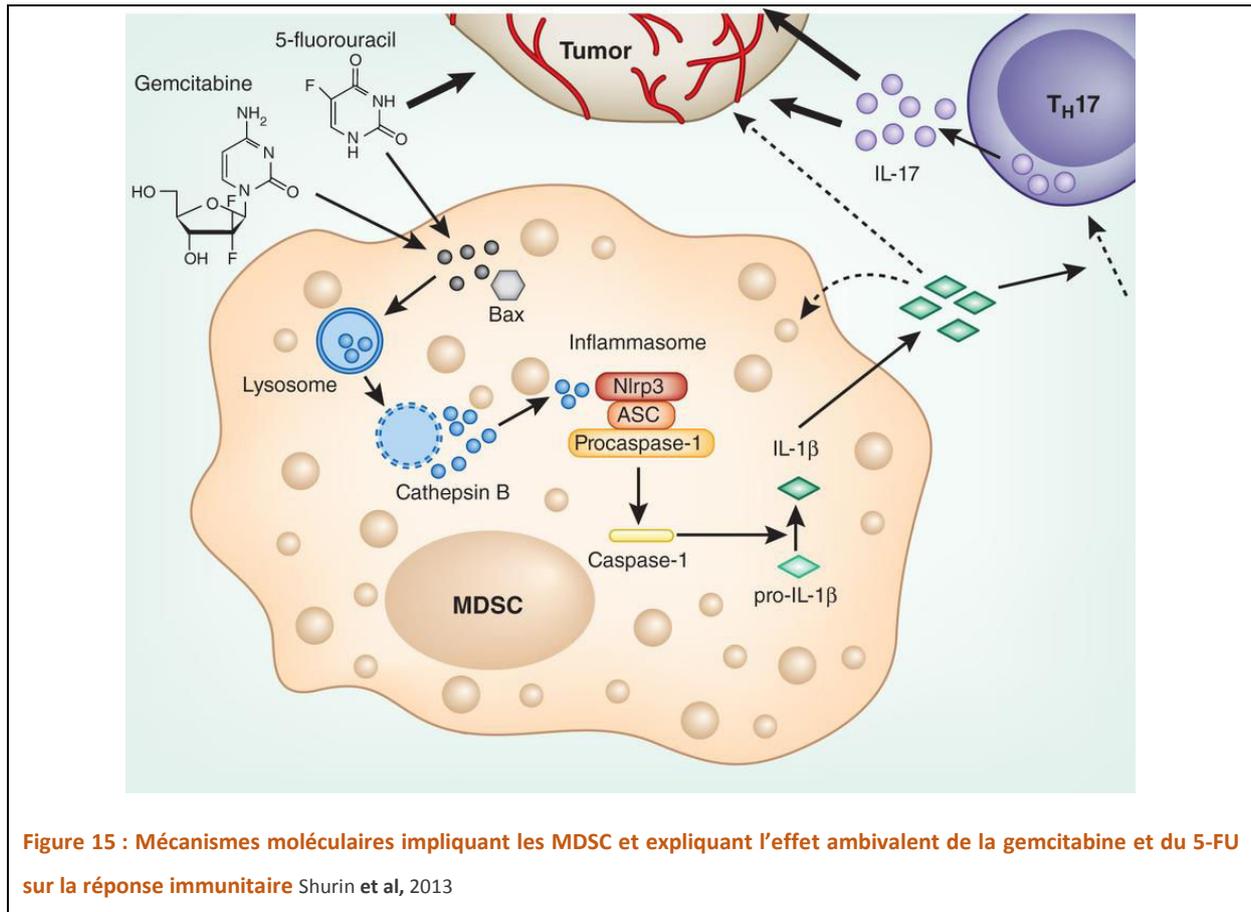
La même année, mon équipe de recherche a pu montrer qu'une chimiothérapie de la même classe thérapeutique que la gemcitabine, le 5-Fluorouracile (5-FU), favorise la déplétion des MDSC dans un modèle de lymphome T murin (EL4). Nous avons également confirmé l'effet déplétant de la

gemcitabine et montré que toutes les chimiothérapies ne permettent pas d'éliminer les MDSC dans ce modèle (doxorubicine, cyclophosphamide, oxaliplatine, paclitaxel, raltitrexed). Comme dans l'étude de Steven Albelda, mon équipe a observé un effet sélectif du 5-FU sur les MDSC (aucun effet significatif sur les autres populations leucocytaires T, NKT, NK, B, DC). La déplétion des MDSC est induite suite à l'activation de la caspase-3 et de la caspase-7 qui permettent d'induire une mort par apoptose à la fois sur les MDSC de type granulocytaire et de type monocytaire (Ly-6C^{int} Ly-6G⁺ et Ly-6C^{high} Ly-6G⁻). De manière intéressante, il semble que l'effet immuno-modulateur du 5-FU passe exclusivement par la déplétion des MDSC. En effet, le 5-FU n'a pas la capacité d'induire une déplétion des T_{reg}, n'induit pas la maturation des cellules dendritiques (expression du CD86 et du CD40) et ne provoque pas une mort immunogène des cellules tumorales (exposition de la calréticuline, relargage d'HMGB1). La suppression des MDSC permet néanmoins de restaurer la capacité des lymphocytes T-CD4⁺ et T-CD8⁺ à produire de l'IFN γ . L'activité anti-tumorale du 5-FU ne passe donc pas uniquement par une cytotoxicité directe envers les cellules tumorales mais aussi par la restauration d'une réponse immunitaire anti-tumorale par l'intermédiaire d'une déplétion des MDSC (Vincent *et al*, 2010).

En 2014, une nouvelle étude a permis de montrer dans le modèle 4T1 un effet pro-apoptotique de la doxorubicine sur les MDSC et qu'elle diminuait les fonctions immunosuppressives des MDSC survivantes (chute de l'expression de l'arginase-1 et de la NO synthase inductible). Il en résulte bien évidemment une stimulation de la réponse immunitaire anti-tumorale, notamment par une induction du nombre de cellules T effectrices CD4⁺ et CD8⁺ et des NK dans le sang et la rate et par une augmentation de la production d'IFN γ , de granzyme B et de perforine par ces cellules (Alizadeh *et al*, 2014). Ces résultats sont contradictoires avec les données publiées par notre équipe sur l'effet de la doxorubicine. La dose et la voie d'administration de la doxorubicine sont identiques entre les deux études (5 mg/kg, *i.v.*). Le modèle d'étude est néanmoins différent entre l'étude d'Alizadeh *et al*, (4T1) et de Vincent *et al*, (EL4). Cette différence est importante d'autant que nous avons vu que le microenvironnement tumoral joue un rôle majeur dans l'expansion et la survie de ces cellules. De plus, les effets biologiques induits par les traitements chimiothérapeutiques peuvent conduire à des réponses ambivalentes associant déplétion des MDSC et stimulation de leur expansion. Les mécanismes permettant la déplétion des MDSC peuvent aussi favoriser l'activation d'autres mécanismes d'échappement.

En effet, des effets biologiques ambivalents liés à la déplétion des MDSC par la gemcitabine et le 5-FU ont été observés par mon équipe de recherche. L'effet thérapeutique de la gemcitabine et du 5-FU est très puissant dans le modèle de thymome EL-4 et nous avons vu que cet effet passait en particulier par une restauration de l'immunité anti-tumorale en lien avec une déplétion des MDSC.

Cet effet reste néanmoins très transitoire et comme dans la réalité clinique, la tumeur finit par développer de nouveaux mécanismes d'échappement. C'est en détaillant les mécanismes conduisant à la mort des MDSC que mon équipe de recherche a pu mieux comprendre les mécanismes liés à l'échappement tumoral qui suit un traitement par la gemcitabine et le 5-FU. Ces deux chimiothérapies ont toutes deux un point commun, celui de provoquer l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Figure 15).



Cette activation passe par une perturbation et une dégradation de la membrane du lysosome *via* la protéine Bax, ce qui conduit au relargage de la protéase cathepsine B. Mon équipe a pu observer une interaction entre cette enzyme et un complexe multi-protéique, l'inflammasome, composé de NLRP3, ASC et de la procaspase-1. En se liant à l'inflammasome NLRP3, la cathepsine B permet son activation et le clivage de la procaspase-1 en caspase-1 active. La maturation de la caspase-1 a deux conséquences qui sont d'ailleurs liées l'une à l'autre. Premièrement, elle permet d'induire la mort par pyroptose des cellules MDSC. Deuxièmement, elle favorise la maturation de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-18 en IL-1 β et en IL-18 qui sont les formes biologiquement actives de ces deux cytokines. L'effet ambivalent de la gemcitabine et du 5-FU est fortement lié à ces deux

conséquences. La mort des cellules MDSC est une conséquence bénéfique puisqu'elle permet de lever un mécanisme d'immunosuppression. Néanmoins, cette mort dépend complètement de l'activation de la caspase-1 qui conduit au relargage de l'IL-1 β . Or, cette cytokine pro-inflammatoire joue un rôle crucial dans la polarisation des cellules Thelper et en particulier des cellules Th17. Dans les modèles de cancer murins étudiés dans notre équipe, ces cellules jouent un rôle délétère sur la croissance tumorale en stimulant l'angiogenèse et les mécanismes de résistance à la mort cellulaire. Ainsi, l'administration de 5-FU aux souris *caspase1^{-/-}*, *caspase1^{-/-}*, *nlrp3^{-/-}*, *il17a^{-/-}* ou traitées par de l'IL-1Ra, permet de limiter l'expansion des Th17 tout en maintenant une déplétion des cellules MDSC et donc un maintien de l'effet thérapeutique du 5-FU. Chez l'homme, l'effet déplétant sur les MDSC et l'induction des Th17 par la Gemcitabine et le 5-FU n'a pas été étudié. Notre équipe a néanmoins pu montrer que l'administration d'une chimiothérapie comportant du 5-FU a des patients porteurs d'un cancer colique conduisait : i) à l'activation de la cathepsine B et de la caspase-1 dans les leucocytes circulants ii) à l'augmentation sérique de l'IL-1 β (Bruchard *et al*, 2013). Ces observations ont permis de mettre en place un essai thérapeutique multicentrique de phase 1 associant anti-IL-1 β et le protocole LV5-FU2 + bevacizumab chez des patients porteurs de cancers colorectaux en situation d'échec thérapeutique. Cet essai thérapeutique aura aussi pour but de lier le profil immunitaire périphérique (taux de MDSC, Th17) à l'impact thérapeutique de cette association.

III. Les lymphocytes Th17

1. Découverte, caractéristiques biologique et fonctionnelle

La mise en place d'une réponse immunitaire adaptative de type humorale ou cytotoxique est intimement liée à la différenciation des lymphocytes T-CD4⁺. Il y a 30 ans, Mosmann et ses collaborateurs ont permis la mise en évidence du paradigme Th1/Th2 et la mise en évidence du rôle complémentaire mais néanmoins antagoniste de ces deux sous-populations (Mosmann *et al*, 1986). Les Th1 favorisent la réponse cytotoxique *via* la sécrétion d'INF- γ et inhibent la polarisation Th2, alors que ces derniers favorisent la réponse humorale par l'intermédiaire de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 et inhibent la polarisation Th1. La découverte des Th17 a eu lieu près de 20 ans après les travaux de Mosmann. L'existence des Th17 a été supposée suite à des observations faites dans un modèle expérimental d'encéphalopathie auto-immune ou « EAE » chez la souris qui était à l'origine décrit pour être un modèle dépendant des cellules Th1. Cette théorie était basée sur des expériences de déplétion cytokinique ciblant la sous-unité p40 de l'IL-12 (l'IL-12 étant composée de deux sous-unités p40 et p35) et qui montrait qu'en ciblant cette sous-unité la sévérité de la maladie était atténuée. L'IL-12 étant la cytokine indispensable à la polarisation des Th1, les scientifiques s'accordaient donc logiquement pour dire que les Th1 étaient intimement liés à la pathogénie de l'EAE. Cette théorie fut rediscutée avec les travaux de l'équipe de Rostani A qui montraient que les souris IL-12p40^{-/-} étaient résistantes à l'induction de l'EAE alors que les souris IL-12p35^{-/-} étaient quant à elles sensibles. Or, dans les deux cas, l'IL-12 n'était pas fonctionnelle et les cellules T-CD4 naïves n'avaient pas la possibilité de se différencier en cellules Th1. Comme l'absence d'IL-12p40 rendait les souris résistantes à l'EAE, les chercheurs en ont conclu qu'il existait une redondance fonctionnelle pour cette sous-unité p40 (Gran *et al*, 2002). Un an plus tard, l'équipe de Sedgwick JD montra que cette sous-unité p40 était partagée par deux cytokines bien distinctes, l'IL-12 et l'IL-23 et que c'est bien l'IL-23 qui joue un rôle dans la survenue de l'EAE (Cua *et al*, 2003; Oppmann *et al*, 2000). Plus tard, on comprit que cette cytokine jouait un rôle central pour la production de l'IL-17A et que cette cytokine a un rôle bien plus important que l'IFN γ dans le modèle d'EAE. Ces résultats ont « perturbé » le paradigme Th1/Th2 et les T-CD4⁺ producteurs d'IL-17A ont pu regrouper un nouveau sous-groupe : les Th17 (Harrington *et al*, 2005) (Figure 16).

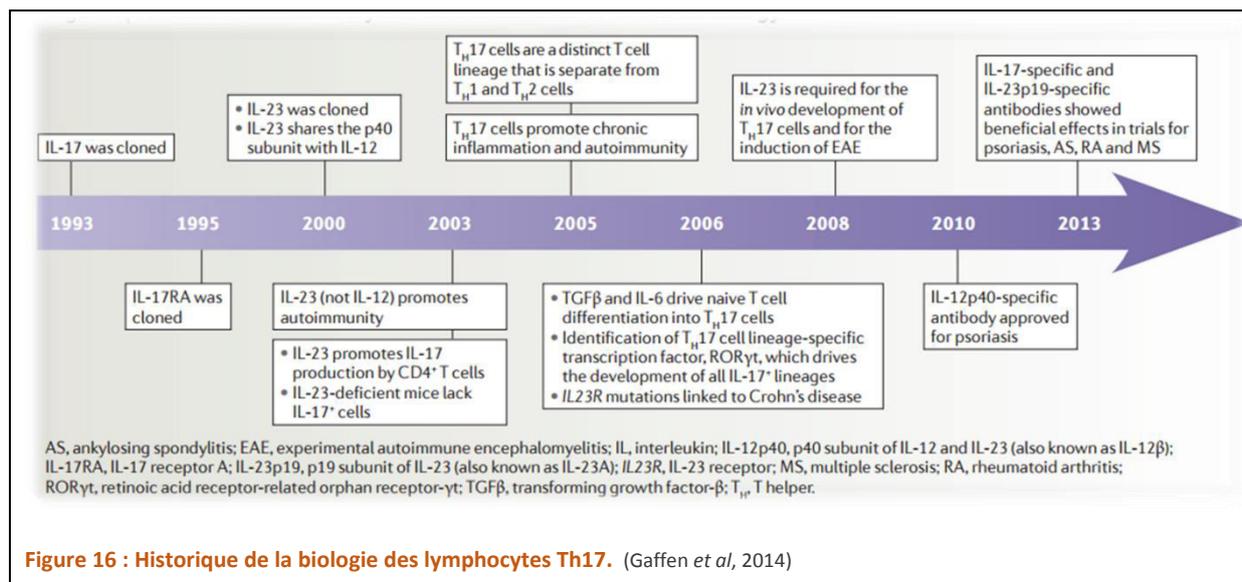


Figure 16 : Historique de la biologie des lymphocytes Th17. (Gaffen *et al*, 2014)

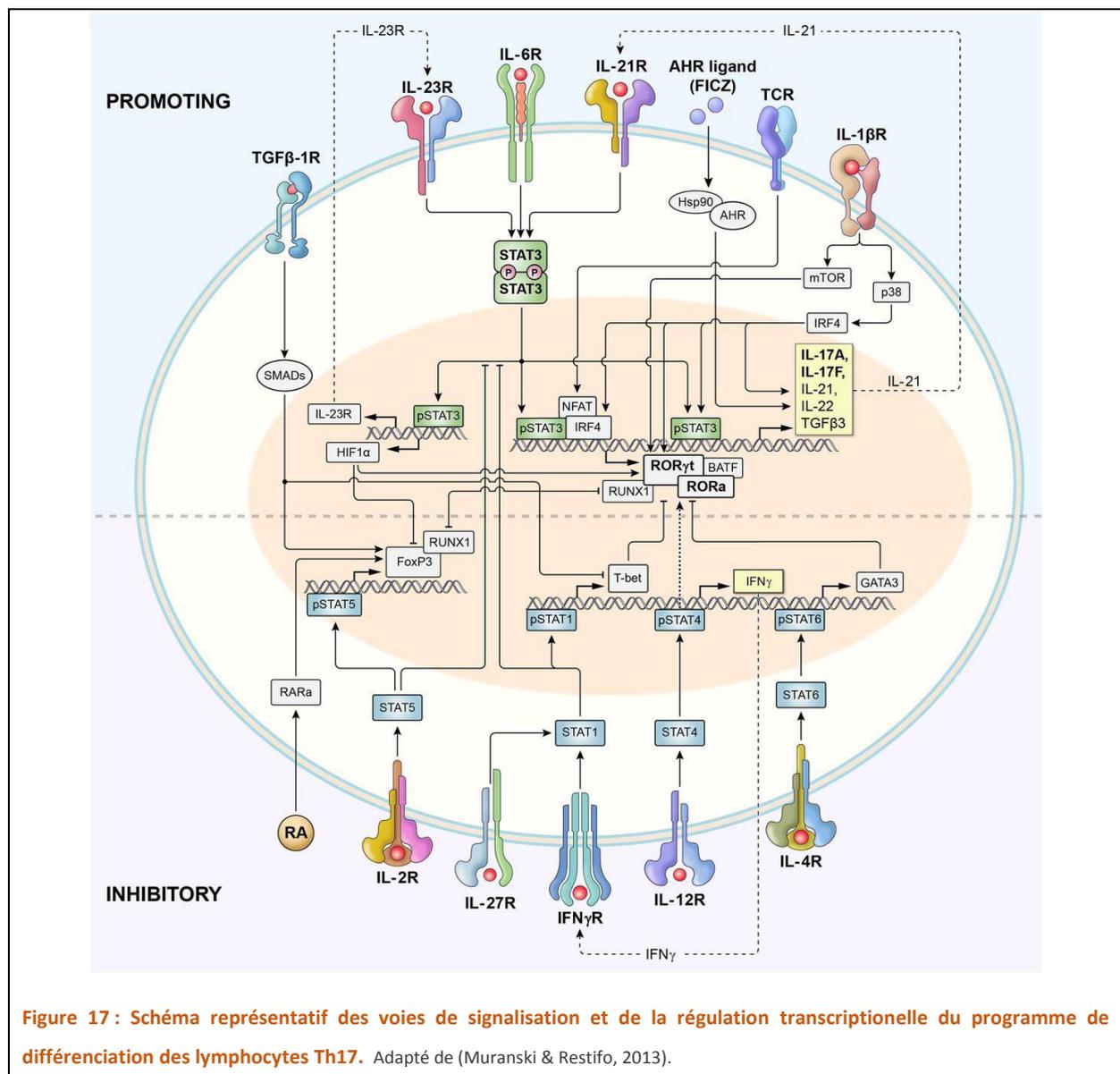
Les Th17 ont par la suite été décrits comme un sous-type cellulaire impliqué dans la protection de l'organisme face aux pathogènes extracellulaires tels que *K. pneumoniae*, *B. fragilis*, *C. rodentium*, *E. coli* ou encore certaines espèces de champignons pathogènes (Annunziato *et al*, 2008). Biologiquement parlant, les Th17 présentent des propriétés inflammatoires provenant de leur capacité à produire de l'IL-17A, de l'IL-17F, de l'IL-6, de l'IL-21, de l'IL-22 et du TNFα. Ces cytokines jouent un rôle prépondérant dans le recrutement et l'activation des neutrophiles mais elles exercent aussi une fonction importante dans l'activation des cellules NK, des lymphocytes T-CD8 et la différenciation des cellules B (Korn *et al*, 2009; Leonard & Spolski, 2005). Les propriétés pro-inflammatoires des Th17 sont cependant dépendantes de l'environnement cellulaire et cytokinique dans lequel ils se trouvent. Nous verrons que dans un contexte tumoral, ces cellules peuvent également acquérir des fonctions immuno-régulatrices et que ces propriétés impliquent le TGF-β (Martin *et al*, 2012).

2. Mécanismes moléculaires de la différenciation des Th17

D'un point de vue moléculaire, la polarisation des Th17 nécessite l'expression et l'activation d'un grand nombre de facteurs de transcription interdépendants et exprimés de manière séquentielle. L'initiation du programme débute par les signaux induits par le TGF-β et l'IL-6 après fixation sur leurs récepteurs respectifs (le TGFβ-RI et -RII et l'IL-6R) (Figure 17).

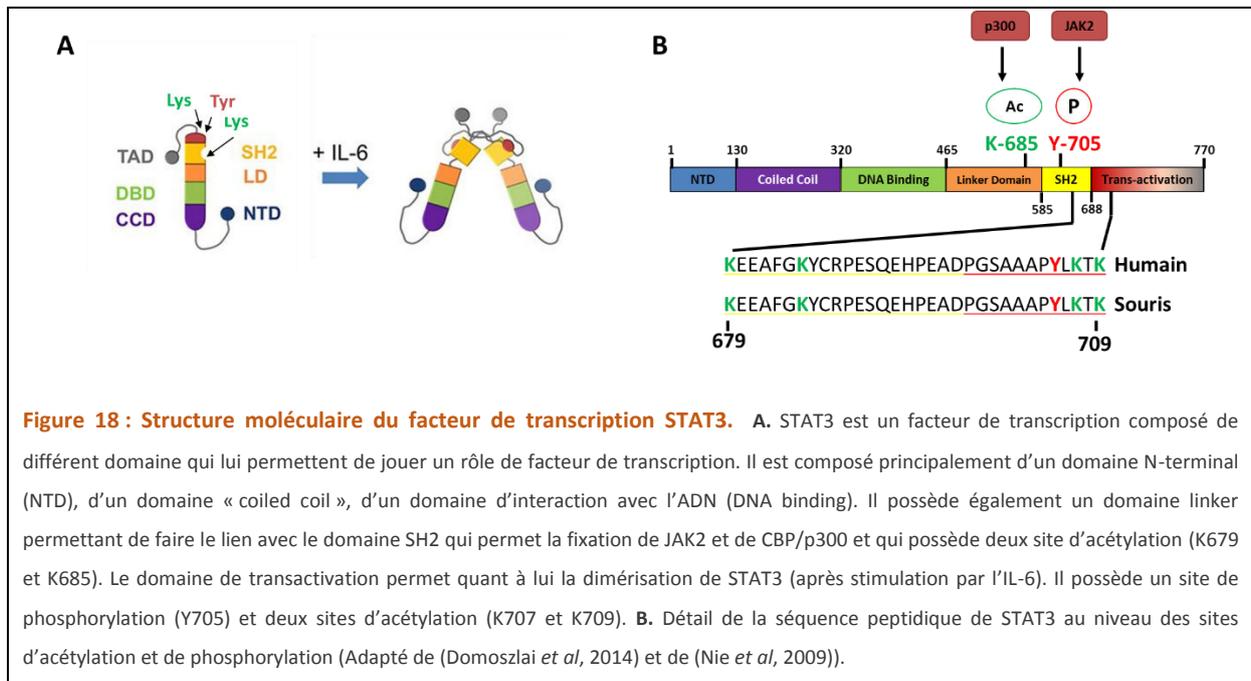
Le signal induit par le TGFβ-RI, va permettre d'induire l'activation des protéines SMAD2/3 par phosphorylation, ce qui aura pour conséquence de réprimer l'expression de *Tbx21* (*Tbet*). La répression de *Tbx21* permet de limiter la mise en place du profil Th1 et de lever la répression transcriptionnelle de *RORC*. L'activation du TGFβ-RII, quant à elle, va permettre d'induire la voie

PI3K/AKT et ainsi favoriser l'activation du complexe mTORC1 impliqué dans la régulation de la synthèse protéique, la prolifération cellulaire et permettre l'expression du facteur HIF-1 α (Kim *et al*, 2013b; Shi *et al*, 2011). Par ailleurs, l'activation de cette voie de signalisation, qui va être amplifiée par le signal induit par l'IL-6, permet de limiter l'expression protéique de Foxp3 en favorisant sa dégradation par le protéasome (Dang *et al*, 2011). L'IL-6 permet, quant à elle, l'activation du facteur de transcription STAT3. STAT3 est un facteur essentiel à la bonne mise en place du programme de différenciation et fait partie des « *master regulator* » des cellules Th17 (Ciofani *et al*, 2012) (Figure 17).



Pour migrer dans le noyau, STAT3 doit subir plusieurs modifications post-traductionnelles : une phosphorylation de la tyrosine 705 par l'intermédiaire de la kinase JAK2 et une acétylation de plusieurs lysines (K679, K685, K707 et K709) par la protéine CBP/p300 (« *CREB-binding*

protein/p300 ») (Yuan *et al*, 2005). A l'heure actuelle, aucune donnée de la littérature n'a pu montrer l'importance de l'acétylation de STAT3 dans le bon déroulement de la polarisation Th17. Cependant, plusieurs études ont pu montrer dans différents modèles pathologiques que l'activation par phosphorylation de STAT3 nécessite au préalable son acétylation. En effet, il semble que la fixation de JAK2 au niveau du domaine SH2 de STAT3 nécessite au préalable l'acétylation des lysines présentes dans ce domaine (K685 en particulier) (Nie *et al*, 2009) (Figure 18).



L'activation de STAT3 permet son homodimérisation et la formation des complexes multiprotéiques (CBP/p300 (« *CREB-binding protein/p300* »), BATF (« *basic leucine zipper transcription* »), IRF, NFAT (« *Nuclear factor of activated T-cells* »)) nécessaires à sa migration dans le noyau et à son activité de régulateur transcriptionnel. Une fois dans le noyau, il pourra induire l'expression génique de différentes cytokines et facteurs de transcription qui auront pour rôle de poursuivre le processus de différenciation. STAT3 va, entre autre permettre d'induire l'expression du récepteur à l'IL-23 (IL-23R) qui pourra capter l'IL-23 produite par les cellules dendritiques ou les macrophages. L'expression de ce récepteur est extrêmement importante puisqu'elle va permettre de maintenir une activation paracrine de la voie STAT3 et par voie de conséquence le phénotype Th17 (Iwakura & Ishigame, 2006).

Concernant les facteurs de transcription HIF-1 α , BATF, ROR α et ROR γ t, leur expression génique est directement régulée par STAT3. Comme nous l'avons vu au préalable, HIF-1 α joue un rôle important dans la répression de *Foxp3* et l'induction de *RORC*, mais il contribue également à la régulation et à l'adaptation métabolique des Th17. En effet, comparativement aux autres sous-types

Thelper et plus particulièrement au T_{Reg} , les Th17 ont un flux glycolytique très important et produisent l'ATP nécessaire à leur prolifération principalement par cette voie métabolique. HIF-1 α intervient donc comme un régulateur de l'expression génique d'un grand nombre de transporteurs (*Glut1*, *MCT4*) et d'enzymes (*HK2*, *GPI*, *TOI*, *Eno1*, *PKM*, *LDH*) impliqués dans la glycolyse. L'absence d'HIF-1 α perturbe complètement la régulation métabolique des Th17 et rend résistantes les souris à l'EAE. (Shi *et al*, 2011). Cette propriété métabolique dépendante d'HIF-1 α est extrêmement importante et à prendre en compte dans un contexte de cancer. En effet, HIF-1 α est un facteur de transcription stabilisé par le manque d'oxygène. L'hypoxie tumorale peut donc très clairement jouer un rôle dans le maintien du phénotypique Th17 et la balance T_{Reg} /Th17 par l'intermédiaire du facteur HIF-1 α (Barbi *et al*, 2013).

BATF (« *Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like* ») est un facteur de transcription également impliqué dans la polarisation Th17. Son absence perturbe complètement le bon déroulement de la maturation des Th17. Des études montrent que BATF est capable de réguler positivement l'expression génique de l'IL-17A, de l'IL-17F, de l'IL-21 et de l'IL-22 mais également de *RORC* (Schraml B *et al*, 2009).

ROR γ t est particulièrement important puisqu'il permet à la fois de réguler négativement l'expression des cytokines ou des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation lymphocytaire Th1 (*Tbx21*, *STAT4*, *IFNG*) ou Th2 (*IL4*, *IL13*, *CCL5*) et d'induire l'expression des cytokines typiques du sous-type Th17 (*IL17A*, *IL17F*, *IL21*, *IL22*, *CCL20*) (Ciofani *et al*, 2012). Il permet également le maintien du profil Th17 grâce à la stimulation autocrine (IL-21, IL-22) et paracrine (IL-23 produite par les cellules dendritiques et les macrophages) de la voie STAT3. De nombreuses études ont montré le rôle central de ROR γ t dans la différenciation Th17 et dans l'inhibition des autres polarisations Thelper (Ivanov *et al*, 2006). L'absence de ce facteur permet à elle seule de limiter presque totalement les signes cliniques de l'EAE. L'absence de ROR γ t ne permet néanmoins pas d'abolir complètement la maladie puisqu'un autre facteur de transcription faisant partie de la même famille, ROR α , contribue aussi à l'expression des cytokines Th17 (Yang *et al*, 2008).

Parmi les facteurs de transcription plus « atypiques » et qui ne sont pas régulés directement par STAT3, citons AhR (« *Aryl hydrocarbure Receptor* »), un facteur de transcription activé par la présence d'hydrocarbures aromatiques (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin). La présence des ligands d'AhR lui permette de se dissocier de la protéine de choc thermique HSP90, de lier le facteur ARNT (AhR nuclear translocator) afin de se transloquer dans le noyau pour induire l'expression de l'IL-22 (Monteleone *et al*, 2011). Pour finir, nous pouvons également parler du rôle des facteurs de transcription NFAT et SGK1 (« *Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1* »), tous deux sensibles au stress osmotique. Une étude originale publiée par Markus Kleinewietfeld dans la célèbre revue

Nature, a montré qu'un régime riche en chlorure de sodium avait pour conséquence d'amplifier la polarisation Th17 et de sensibiliser les souris à l'EAE. Les auteurs de cette étude ont pu montrer notamment que l'excès de sel provoque une activation de la voie p38/MAPK et l'activation des facteurs NFT et SGK1 qui favorise l'expression de l'IL-17A (Kleinewietfeld *et al*, 2013).

Concernant les cytokines et les facteurs de transcription qui régulent négativement la différenciation Th17, citons les cytokines de type Th1, l'IL-12 et l'IFN γ , qui par l'intermédiaire de STAT1 et de STAT4 permettent la répression de *RORC* via *Tbet* et en modulant l'activité de STAT3 (Mukasa *et al*, 2010). L'IL-27 est également impliquée dans la régulation de la balance Th1/Th17. Tout comme l'IFN γ , elle va conduire à l'activation de STAT1 et l'expression de *Tbet* (Villarino *et al*, 2010). L'IL-4, une cytokine de type Th2 permet elle aussi de contrecarrer le programme de différenciation Th17 en provoquant une déstabilisation des complexes STAT3/IRF4 au profit des complexes STAT6/IRF4 pour induire le facteur GATA3. GATA3 agira ensuite comme un répresseur transcriptionnelle des gènes Th17. L'IL-2 est également une cytokine importante dans la régulation du programme Th17. Elle module en particulier l'expression génique de *Il17a* et de *Il17f* en activant STAT5 qui entre alors en compétition avec STAT3 au niveau des promoteurs de ces deux gènes (Yang *et al*, 2011).

3. Rôle pronostique des Th17 dans le cancer : un sous-type aux deux visages

Le rôle des Th17 dans le cancer est très controversé et semble réellement dépendre du type de cancer considéré. Certaines études montrent effectivement que ces cellules peuvent être associées à un bon pronostic. En effet, il a été montré dans les cancers de l'ovaire, que l'infiltration de lymphocytes CD4⁺ IL-17A⁺ était associée à une faible infiltration de lymphocytes T_{Reg} et au recrutement de cellules T-CD8⁺ effectrices par l'intermédiaire de CXCL9 et CXCL10. Cette étude a également montré que l'infiltration Th17 était corrélée à une présence importante de macrophages anti-tumoraux (Kryczek *et al*, 2009). Dans le cancer de l'œsophage et de l'estomac, l'infiltration de cellules IL-17A⁺ est corrélée à une plus forte infiltration de cellules CD8⁺ et NK cytotoxiques et donc à un meilleur pronostic (Lv *et al*, 2011). L'ensemble de ces observations peuvent être expliquées par la capacité des Th17 à produire de l'IL-21, cytokine qui possède une grande capacité à induire une réponse cytotoxique et qui soutient aussi la maturation des cellules B (Korn *et al*, 2007). L'IL-17 est également une cytokine capable de favoriser une réponse cytotoxique dépendantes des cellules T dans les mastocytomes et les plasmocytomes chez la souris (Benchetrit *et al*, 2002). Cet effet peut être lié à une augmentation de la maturation des progéniteurs des cellules dendritiques en augmentant l'expression des molécules de co-stimulation, du CHM-II (Antonyamy *et al*, 1999). Cette maturation assure une plus forte présentation des antigènes tumoraux et pourrait expliquer l'effet

anti-tumoral de l'IL-17. Par ailleurs, l'absence d'IL-17 par déplétion ou par modification génétique induit une chute de la production d'IFN γ par les cellules NK et les T-CD8⁺ (Kryczek et al, 2009).

Les Th17 peuvent être également associés à un mauvais pronostic et c'est plus particulièrement le cas pour les cancers du sein, des poumons, du foie ou encore du colon. Notre équipe a récemment décrit un rôle délétère des Th17 dans le cancer du sein. Nous avons pu montrer que le microenvironnement tumoral favorise le recrutement des cellules Th17 circulantes. Sous l'influence du TGF- β et de l'IL-6 présentes dans la tumeur, ces cellules deviennent immunosuppressives et modulent la réponse cytotoxique par l'intermédiaire de l'adénosine produite *via* l'expression des ectonucléotidases CD39 et CD73. L'analyse histologique de patientes atteintes de cancer du sein localisé a montré que le bon rôle pronostique d'une infiltration en T-CD8⁺ était perdu si les cellules IL-17A⁺ étaient présentes en grand nombre, ce qui suggère bien une fonction immunosuppressive de ces cellules dans les cancers mammaires (Thibaudin *et al*, 2016). D'autres études confirment les données que nous avons obtenues (Benevides *et al*, 2015; Chen *et al*, 2013). Dans les cancers bronchiques, les Th17 sont associés à une diminution de la survie sans progression et la survie globale. L'étude menée par Chen Xi, montre que la présence de cellules productrices d'IL-17A est corrélée à la consommation de tabac, au stade de la tumeur et à la présence de vaisseaux lymphatiques (Chen *et al*, 2010). Des résultats similaires ont été obtenus dans le carcinome hépatocellulaire (Zhang *et al*, 2009). En ce qui concerne le cancer du côlon plusieurs équipes de recherche ont pu montrer que l'infiltration de cellules productrices d'IL-17A était associée à un mauvais pronostic. En 2011, l'équipe de Jérôme Galon a montré, à l'aide d'une analyse transcriptomique et histologique, que la présence de cellules Th17 jouait un rôle néfaste dans la progression tumorale. En effet, les patients ayant une expression tumorale importante de l'*il17a* et de *RORC* présentent une survie sans progression plus faible que ceux ayant une faible expression de ces deux ARNm. L'analyse des infiltrats immunologiques chez ces patients a confirmé l'analyse transcriptomique et a permis de montrer que l'infiltration des Th17 modulait négativement l'effet anti-tumoral d'une infiltration riche en cellules T-CD8⁺ (Tosolini *et al*, 2011). Par ailleurs, l'IL-17A produite par les Th17 est fortement associée à une élévation des taux de VEGF-A et par voie de conséquence à une forte angiogenèse de la tumeur (Liu *et al*, 2011). Cet effet pro-angiogénique est intimement lié à la capacité de l'IL-17A à stimuler l'expression de l'IL-6, l'IL-8, la PGE2 et de ICAM-1. Ces molécules sont fortement impliquées dans le processus angiogénique. Cette induction est provoquée par une augmentation de l'expression génique de ces deux cytokines, régulée en partie par la voie NF κ B induite par le récepteur à l'IL-17A (Tartour et al, 1999 ; Kehlen et al, 1999). Des données récentes non publiées de notre laboratoire indique également que l'IL-17A est associé à une angiogenèse importante et à un mauvais pronostic dans le glioblastome. Les zones tumorales

infiltrées par les cellules productrices d'IL17A ont une plus forte expression du CD31, un marqueur des vaisseaux.

Enfin, d'autres études montrent que les Th17 peuvent infiltrer d'autres types de tumeurs, comme le cancer de la prostate (Sfanos *et al*, 2008) ou encore de la vessie (Chugh *et al*, 2013). Néanmoins elles n'ont pas étudié le rôle pronostique de ces cellules. Dans le cancer du rein, une étude portant sur l'analyse des PBMC (« *peripheral blood mononuclear cells* ») a pu montrer que le taux de Th17 (CD4⁺ IL-17A⁺) était augmenté par rapport à des volontaires sains. De plus, le taux de cellules Th17 augmente avec le stade de la maladie, ce qui laisse entendre que ces cellules peuvent jouer un rôle important dans la progression des cancers rénaux (Li *et al*, 2015).

L'ensemble de ces publications montrent que le rôle des Th17 dans la progression tumorale dépend fortement du type de cancer considéré. Cette ambivalence des Th17 est en réalité liée à la génération de sous-populations Th17 induites par le microenvironnement tumoral et possédant des propriétés biologiques particulières. L'étude des mécanismes de polarisation des Th17 a montré que ces cellules étaient très plastiques et qu'en fonction de l'environnement cytokinique, elles avaient des propriétés parfois opposées. Les études sur le rôle pronostique des Th17 dont nous avons fait mention dans la partie précédente n'ont à aucun moment précisé le profil phénotypique et fonctionnel des cellules productrices d'IL-17A. Le facteur pronostique décrit dans ces études est finalement bien plus l'IL-17A que le sous-type Th17 en lui-même. Il reste encore donc de nombreuses études à mener pour caractériser plus finement ces cellules, ce qui permettra i) de mieux comprendre les mécanismes immunologiques liés à l'infiltration des cellules productrices d'IL-17A dans le cancer et ii) de définir des stratégies thérapeutiques anti- ou pro-Th17 bien mieux adaptées à chaque type de cancer.

4. La plasticité des Th17 explique leur ambivalence

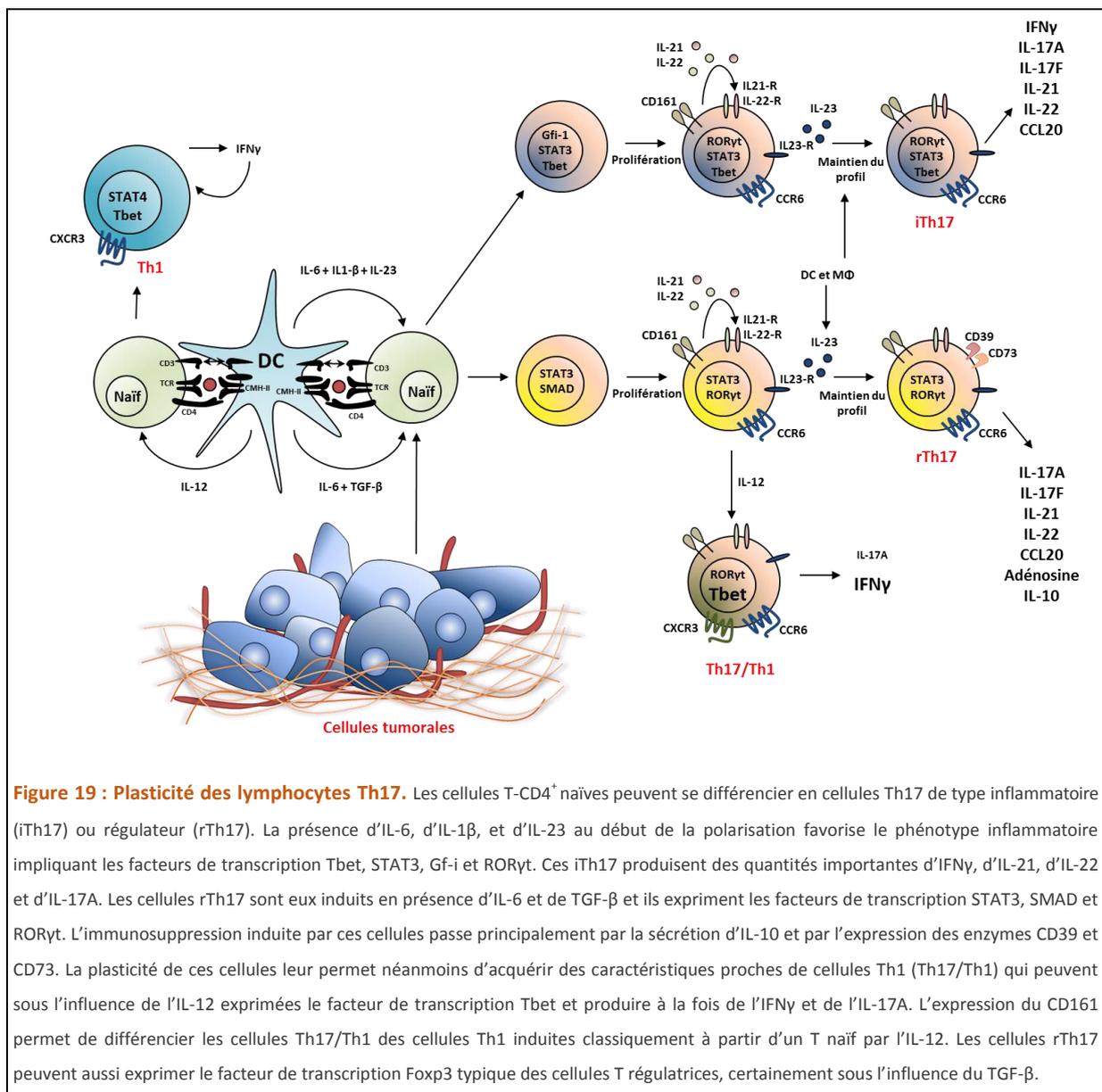
La plasticité des Th17 a pour conséquence de rendre difficile la caractérisation de leurs propriétés biologiques *in vivo*. Malgré l'observation faite lors d'études préclinique indiquant que le transfert adoptif de cellules Th17 permettait d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale, l'analyse des Th17 infiltrant naturellement la tumeur indique plutôt qu'ils favoriseraient la croissance tumorale. Il a été montré à la fois chez l'homme et la souris que les Th17 pouvaient avoir des caractéristiques phénotypiques et des propriétés différentes en fonction des cytokines présentes au moment de la différenciation des T naïfs en Th17 et même après leur maturation. Comme dit précédemment, la polarisation précoce des cellules T naïves en Th17 nécessite la présence d'IL-6 et de TGF- β . La présence d'IL-1 β et d'IL-23 permet elle, de maintenir à long terme le phénotype. On

constate ici que la polarisation de ce sous-type dépend d'un nombre important de cytokines, dont les quantités et les proportions évoluent de manière différente dans l'organisme. Il est donc logique que la signalisation induite par une cytokine présente en grande quantité dans l'environnement du lymphocyte puisse prendre le dessus sur les signaux provoqués par des cytokines présentes en plus faible quantité. Dès lors, même si qualitativement l'ensemble des cytokines indispensables à la polarisation d'un sous-type Thelper est présent, certaines d'entre elles peuvent influencer les fonctions biologiques que joueront les cellules matures.

Dans le cadre de la polarisation Th17, il est clairement montré que l'intensité des signaux induits par le TGF- β peut changer complètement la destinée biologique des Th17. C'est particulièrement vrai dans un contexte de cancer, puisqu'une grande majorité des cancers possèdent un microenvironnement riche en TGF- β (Martin *et al*, 2012). Chez la souris, notre équipe a pu montrer que la présence d'IL-6 et de TGF- β au moment de la polarisation des T naïfs en Th17, permettait d'induire l'expression des ectonucléotidases CD39 (*Entpd1*) et CD73 (*NT5E*). Ces deux enzymes permettent la dégradation de l'ATP extracellulaire en AMP puis en adénosine. Elles contribuent donc à transformer l'ATP, une molécule immunostimulante (ligand du récepteur P2X7 et activateur de l'inflamasome NLRP3) en molécule immunosuppressive : l'adénosine (ligand du récepteur A2Ar et inhibiteur des fonctions effectrices des lymphocytes). Le TGF- β permet d'inhiber le facteur Gfi-1 qui se trouve être un répresseur transcriptionnel des gènes *Entpd1* et *NT5E*. L'IL-6, permet-elle, *via* STAT3, d'induire l'expression de ces enzymes. Lorsque les T naïfs sont induits en présence d'IL-6, d'IL-1 β et d'IL-23 aucune expression des ectonucléotidases n'est observée. Lorsque l'on s'intéresse à la production d'INF γ par ces cellules, le TGF- β joue plutôt un rôle inhibiteur, alors que la présence de l'IL-1 β et de l'IL-23 induit sa sécrétion. Les signaux induits précocement sont donc le fondement des fonctions immunologiques que posséderont les Th17 et nous venons de voir que le TGF- β joue un rôle important pour diriger les Th17 vers un sous-type régulateur (rTh17) ou inflammatoire (iTh17) (Chalmin *et al*, 2012) (Figure 19).

Une fois la polarisation Th17 induite, les choses peuvent encore changer. Des études récentes montrent que les Th17 peuvent se convertir en cellules « Th1 like » ou en cellules régulatrices possédant des caractéristiques proche des cellules T_{Reg}. Il a été suggéré que l'expression de certaines protéines de surface comme CD161 et CCR6 permettaient de discriminer les cellules « Th1 » dérivant de cellules Th17 des cellules Th1 « classiques ». Les cellules induites par l'IL-6 et le TGF- β en Th17 immatures expriment CD160, CCR6 et l'IL-23R mais elles ne produisent pas d'IL-17A. Une fois en présence d'IL-23 et d'IL-1 β , elles commencent à produire de l'IL-17A et acquièrent un profil phénotypique typique des Th17 matures (production d'IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNF α). Par la suite, le phénotype Th17 est maintenu si l'environnement est favorable (riche en IL-23). Néanmoins,

dans un contexte cytokinique « pro-Th1 », riche en IL-12, les cellules Th17 matures peuvent se transdifférencier en cellules Th17/Th1, faiblement productrices d'IL-17A et qui sécrètent comme les Th1 des quantités importantes d'IFN γ . Les caractéristiques phénotypiques de ces cellules sont également modifiées, puisqu'elles exprimeront en plus des marqueurs Th17 (CCR6, CD161, IL-23R), un marqueur typique des cellules Th1 : le CXCR3. Les Th17 peuvent également se repolariser en lymphocytes régulateurs correspondant à des cellules IL-17A⁺ Foxp3⁺. Les mécanismes moléculaires associés à cette repolarisation sont encore mal compris mais impliquent certainement le TGF- β présent au niveau de la tumeur (Du *et al*, 2014) (Figure 19).



5. Stratégies thérapeutiques permettant de cibler les Th17

A l'heure actuelle, les stratégies thérapeutiques envisagées pour cibler les Th17 reposent principalement sur la neutralisation des cytokines produites par ces cellules. Les études cliniques réalisées dans le cadre de maladies auto-immunes telles que le psoriasis ou la polyarthrite rhumatoïde ont montré que cibler par des anticorps l'IL-17A (Secukinumab), l'IL-17F, le TNF α (Adalimumab), l'IL-23 (Tidrakizumab) ou encore le récepteur à l'IL-17A/F (IL-17RA, Brodalumab) sont des stratégies efficaces. Certains anticorps thérapeutiques sont déjà utilisés dans le traitement de ces pathologies, mais il est pour le moment difficile de connaître l'efficacité de ces médicaments en oncologie puisque les essais cliniques sont encore rares et que le rôle des Th17 est cancer-dépendant. L'utilisation de ces médicaments pourrait néanmoins avoir un intérêt majeur dans la prise en charge des cancers pour lesquels les Th17 jouent un rôle néfaste (côlon, sein, poumon). Les inhibiteurs de l'IL-23 pourraient même permettre de limiter la polarisation des Th17 et favoriser la polarisation Th1.

Certaines stratégies thérapeutiques reposent sur l'utilisation d'anticorps thérapeutiques capables de neutraliser les cytokines impliquées dans la mise en place du profil Th17. L'IL-6 et l'IL-1 β sont plus particulièrement ciblées car elles sont toutes deux impliquées dans l'activation des propriétés inflammatoires et angiogéniques des Th17. Le tocilizumab (anti-IL-6R) et le siltuximab (anti-IL-6) sont deux médicaments utilisés dans le traitement des maladies inflammatoires et auto-immunes et permettent une diminution du profil Th17 au profit du phénotype T_{Reg} (Mesquida *et al*, 2014; Saggini *et al*, 2014). La neutralisation de l'IL-1 β est aussi envisager pour limiter la polarisation Th17, et elle l'est en oncologie dans la prise en charge du cancer colique en association avec le 5-FU (étude clinique en cours, NCT02090101).

Des inhibiteurs de kinases sont aussi utilisés pour cibler de manière plus ou moins spécifique les Th17. Parmi eux, nous pouvons citer le Tofacitinib et l'Aprémilast. Le Tofacitinib inhibe la kinase JAK2, ce qui permet de limiter l'activation du facteur STAT3 et donc le programme de différenciation Th17. Ce médicament a montré une efficacité réelle dans le traitement du psoriasis et l'amélioration des lésions cutanées a été associée à une chute des marqueurs Th17 (expression génique de l'IL-17A, IL-22) (Krueger *et al*, 2016). L'apremilast, quant à lui, est un inhibiteur de la phosphodiesterase 4 (PDE4), une enzyme qui permet la conversion de l'AMPc en AMP. En inhibant la PDE4, l'apremilast permet d'élever la concentration intracellulaire d'AMPc qui pourra en retour freiner la réponse inflammatoire (chute de l'activation de la voie JNK et NF κ B). C'est inhibiteur n'est donc pas spécifiquement utilisé pour moduler la différenciation Th17, mais plusieurs études ont montré que

chez l'homme, l'efficacité du médicament était corrélée à une chute de la concentration plasmatique des cytokines Th17 (TNF α , IL-6, IL-17A) (Gottlieb *et al*, 2013; Schafer *et al*, 2015).

IV. Efficacité des thérapies anti-cancéreuses et modulation de la réponse immunitaire

1. Chimiothérapie et réponse immunitaire anti-tumorale

Comme nous avons pu le voir au préalable, le cancer est à l'origine une maladie génétique liée à la perte de gènes suppresseurs de tumeur ou à l'activation d'oncogènes. Ces caractéristiques confèrent aux cellules tumorales des capacités de prolifération exacerbées qui sont justement ciblées par les agents chimiothérapeutiques. Ces agents appartiennent à différentes classes et possèdent des mécanismes d'action variés, allant de la déstabilisation (agents alkylants, inhibiteurs des topoisomérases) et de l'inhibition de la synthèse de l'ADN (antimétabolites) à l'inhibition du processus mitotique (poisons du fuseau) ou encore à la production massive d'espèces réactives de l'oxygène (antibiotiques cytotoxiques). Depuis la démonstration de l'existence du concept de « l'immunoediting » des tumeurs, de nombreuses équipes de recherche se sont penchées sur l'impact immunologique que peuvent avoir les chimiothérapies. Dans la suite de ce chapitre, nous verrons que les agents chimiothérapeutiques peuvent moduler la réponse immunitaire anti-tumorale en jouant à la fois sur les cellules cancéreuses et les cellules de l'immunité. La capacité d'une cellule cancéreuse à stimuler une réponse immunitaire dépend de deux facteurs : premièrement la cellule doit présenter des antigènes considérés comme du « non-soi » (antigénicité) et deuxièmement, elle doit avoir des propriétés adjuvantes permettant la stimulation de l'immunité innée (immunogénicité) (Matzinger, 1994).

a) *Augmentation de l'antigénicité des cellules tumorales*

Certaines chimiothérapies, comme le cyclophosphamide, la gemcitabine ou encore l'oxaliplatine améliore la capacité de présentation antigénique des cellules tumorales en induisant l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et des récepteurs activateurs des cellules NK (ligands des NKG2D : MICA, MICB, ULPBs) (Wan *et al*, 2012). Il a aussi été démontré

que certaines molécules comme le 5-FU, le vémurafénib ou encore le 5-aza-2'deoxyctidine permettaient d'augmenter spécifiquement la présentation d'antigènes tumoraux tels que l'antigène carcinoembryonnaire, les antigènes testiculaires ou associés au mélanome (Chen & Emens, 2013; Frederick *et al*, 2013; Liu *et al*, 2010).

Enfin, le traitement par une drogue de chimiothérapie peut permettre de diversifier les antigènes tumoraux reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques, aussi bien qualitativement que quantitativement. Ce mécanisme a pu être décrit chez des souris porteuses de tumeurs exprimant l'ovalbumine et qui développent une réponse spontanée contre un peptide immunogène dérivé de l'ovalbumine, le peptide SIINFEKL. Le traitement de ces souris par chimiothérapie permettra d'induire une réponse anti-tumorale plus large, dirigée contre un plus grand nombre d'antigènes différents. Ce mécanisme est appelé « antigen spreading » (Jackaman *et al*, 2012).

b) Augmentation de l'immunogénicité des cellules tumorales

Comme dans le cas d'une cellule infectée par un virus, la présentation des antigènes du « non soi » est la première étape à la mise en place d'une réponse immunitaire mais elle n'est pas suffisante. Il est indispensable que les cellules émettent des signaux de stress qui permettront de « sensibiliser » le système immunitaire à la reconnaissance des antigènes. Ces signaux de dangers, appelés DAMPs (« Damage Associated Molecular Patterns ») peuvent être émis suite au relargage de molécules cytosoliques *via* la rupture de la membrane plasmique, par l'exposition membranaire de protéines ou la sécrétion de cytokines.

C'est dans ce contexte, que la question de l'effet immunogène des chimiothérapies a été posée. Les études précliniques menées sur cette thématique ont effectivement montré que l'efficacité de certains agents chimiothérapeutiques est dépendante du système immunitaire. La première preuve expérimentale de cette théorie repose sur une observation faite en 2005 dans le laboratoire du Pr. Guido Kroemer. Il a montré que l'exposition de cellules cancéreuses murines coliques (CT26) et de fibrosarcomes (MCA205) à des doses létales de chimiothérapie *in vitro* (doxorubicine) permet de vacciner des souris syngéniques contre une future injection de cellules tumorales. De plus, le fait qu'il ne soit pas nécessaire d'injecter ces cellules avec un adjuvant indique que ces cellules apportent les deux signaux nécessaires à la mise en place d'une réponse immunitaire efficace (antigènes tumoraux et DAMPs). Ce mécanisme est appelé mort immunogène (« Immunogenic Cell Death », ICD). Par la suite, l'équipe de Guido Kroemer a montré que l'activation de l'ICD n'est pas restreinte à la doxorubicine mais qu'elle peut être induite par un grand nombre d'agents chimiothérapeutiques (mitoxantrone, oxaliplatine) ou physiques (haute pression hydrostatique, rayonnement). Ces inducteurs possèdent tous la capacité d'induire une mort par

apoptose dépendante des caspases et de provoquer un stress du réticulum endoplasmique (Casares *et al*, 2005). Ces observations ont bouleversé les concepts scientifiques de l'époque qui considéraient la mort par apoptose comme une mort « silencieuse », incapable de stimuler une réponse immunitaire. Elles montraient également que l'efficacité thérapeutique des chimiothérapies n'étaient pas simplement due à leur effet cytotoxique propre mais également à leur capacité à induire une mort immunogène. Il existe actuellement un consensus sur les mécanismes et les marqueurs essentiels pour induire une mort immunogène efficace :

- ✓ L'exposition membranaire de la calréticuline (CRT) (Obeid *et al*, 2007)
- ✓ Le relargage de l'ATP (Garg *et al*, 2012b)
- ✓ Le relargage de la protéine HMGB1 (Apetoh *et al*, 2007)
- ✓ La sécrétion d'IFN α et de CXCL10 (Sistigu *et al*, 2014)

L'exposition membranaire de la calréticuline est induite précocement dans le processus d'ICD, avant la rupture de la membrane plasmique et le passage des phosphatidylsérines sur le feuillet externe de la membrane plasmique (Obeid *et al*, 2007). Les mécanismes moléculaires qui conduisent à l'exposition de la CRT passent tout d'abord par la production importante d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui permettent ensuite l'activation des voies du stress du réticulum endoplasmique. Au niveau du réticulum endoplasmique, la kinase PERK (« *protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase* ») provoque la phosphorylation d'EIF2 α qui joue un rôle majeur dans la mise en place du processus apoptotique. En effet, EIF2 α va favoriser l'activation de la caspase 8 et par conséquent le clivage de la protéine BCAP31. Ce clivage a pour conséquence d'induire une perméabilisation de la membrane mitochondriale par l'intermédiaire des protéines BAX et BAK. La combinaison du stress du réticulum et de l'activation du processus apoptotique conduit à une modulation du transport vésiculaire permettant au transport de la CRT au niveau de la membrane plasmique. Ce transport est dépendant d'un grand nombre de protéines en particulier celui des protéines VAMP1 (« *Vesicle Associated Membrane Protein 1* ») et SNAP25 (« *Synaptosomal-associated protein 25* ») (Panaretakis *et al*, 2009). L'exposition de la CRT favorise la phagocytose des corps apoptotiques par les cellules dendritiques grâce à la fixation de CD91 et favorise les processus de maturation des cellules présentatrices d'antigènes (Garg *et al*, 2012b). Il est intéressant de noter que ce mécanisme peut être mis à mal par l'expression de la protéine CD47 qui inhibe les processus de phagocytose et qui est exprimée dans de nombreux cancers (Chao *et al*, 2010).

Le relargage de l'ATP est un processus complexe contrôlé par l'activation des caspases et qui implique sa redistribution des vésicules cytoplasmiques vers les autolysosomes grâce à la mise en place du processus autophagique dépendant des protéines ATG5, ATG7 et BCN1. Les autolysosomes contiennent la protéine LAMP1 (« *Lysosomal-associated membrane protein 1* ») ce qui va favoriser la

rupture de la membrane lysosomale et le relargage de l'ATP dans le cytosol ou à l'extérieur des cellules si ses autolysosomes fusionnent directement avec la membrane plasmique. Par l'intermédiaire de la pannexine-1 (PANX1), un pore membranaire, l'ATP peut être aussi relargé dans le milieu extracellulaire (Garg *et al*, 2012b; Martins *et al*, 2014). L'ATP extracellulaire va jouer un rôle chimio-attractant sur les cellules dendritiques et également promouvoir leur activation et leur maturation. Cet effet est dépendant de la stimulation des récepteurs couplés aux protéines G de type P2YR, qui va permettre le recrutement des cellules dendritiques (Ma *et al*, 2013). La stimulation des récepteurs de la famille P2XR conduit à un relargage de potassium (K^+) et par voie de conséquence à l'activation de l'inflammasome NLRP3 au sein des cellules dendritiques. La formation de l'inflammasome NLRP3 assure ensuite la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18, deux cytokines aux propriétés pro-inflammatoires puissantes (Ghiringhelli *et al*, 2009). Les niveaux d'ATP extracellulaire sont finement régulés. En effet, une quantité trop importante de cette molécule pourrait induire une réponse inflammatoire délétère et induire des dommages tissulaires. Il existe donc à la surface de certaines cellules (cellules tumorales, lymphocyte T activés, lymphocytes T régulateurs) des enzymes appelés ectonucléotidases qui favorisent la dégradation de l'ATP. Parmi elles, CD39 et CD73 agissent de manière coordonnée en permettant la dégradation de l'ATP en AMP puis en adénosine, une molécule immunosuppressive. L'apyrase est aussi une enzyme permettant la dégradation de l'ATP (Michaud *et al*, 2012). L'expression de ces enzymes par les cellules tumorales leur permet de limiter l'immunosurveillance induite par l'ATP mais permet aussi de stopper la réponse immunitaire préexistante *via* la production d'adénosine (Senovilla *et al*, 2014).

Le relargage de la protéine nucléaire HMGB1 nécessite la perméabilisation de la membrane nucléaire et cytoplasmique. Par ce fait, ce signal immunogène est induit à un instant tardif du processus de mort cellulaire. Les processus permettant la sécrétion d'HMGB1 sont encore mal caractérisés, mais ils impliquent dans tous les cas la production massive de radicaux oxygénés et l'activation des caspases ce qui conduit à la mise en place du processus d'apoptose, de nécrose ou d'autophagie. Les radicaux oxygénés qui seront à l'origine de l'activation des caspases est primordiale puisque la dégradation des liaisons inter-nucléosomales par les caspases va favoriser le relargage d'HMGB1 qui est fixé au nucléosome. Une fois dans l'espace intercellulaire, HMGB1 pourra induire une activation massive des cellules présentatrices d'antigènes *via* la fixation de TLR2, TLR4 ou encore le récepteur RAGE (Curtin *et al*, 2009; Kokkola *et al*, 2005; Scaffidi *et al*, 2002). Par ailleurs, il a été rapporté un rôle d'HMGB1 dans les processus de chimiotactisme des cellules dendritiques. En se fixant à CXCL12, HMGB1 aurait la capacité de permettre une meilleure stimulation de CXCR4 présent à la surface des cellules présentatrices d'antigène (Schiraldi *et al*, 2012).

Les cellules tumorales peuvent également favoriser le recrutement des cellules dendritiques immatures en sécrétant la chimiokine CXCL10 qui attire les lymphocytes T effecteurs. Cette molécule est produite par l'activation de TLR3 au sein de la cellule tumorale qui, en réponse, sécrète une quantité importante d'IFN α . Par une stimulation autocrine *via* le récepteur aux interférons de type I, l'IFN α induit en retour la sécrétion de CXCL10 (Sistigu *et al*, 2014).

Il a été décrit d'autres signaux de dangers impliqués dans l'immunogénicité des cellules tumorales. Ces signaux incluent le relargage de protéines chaperonnes de la famille des protéines de choc thermique (HSP70 et HSP90) (Garg *et al*, 2012a), la sécrétion de métabolites lipidiques (céramide, spingosine-1-phosphate)(Korbelik *et al*, 2014) ou encore des produits provenant de la mitochondrie (cardiolipine, peptide-N-formylé) ou du contenu cytosolique (F-actine) (Galluzzi *et al*, 2012; Zhang *et al*, 2010)(Tableau 5).

Tableau 5 : Classification des DAMPs. (Galluzzi L <i>et al</i> , 2016)

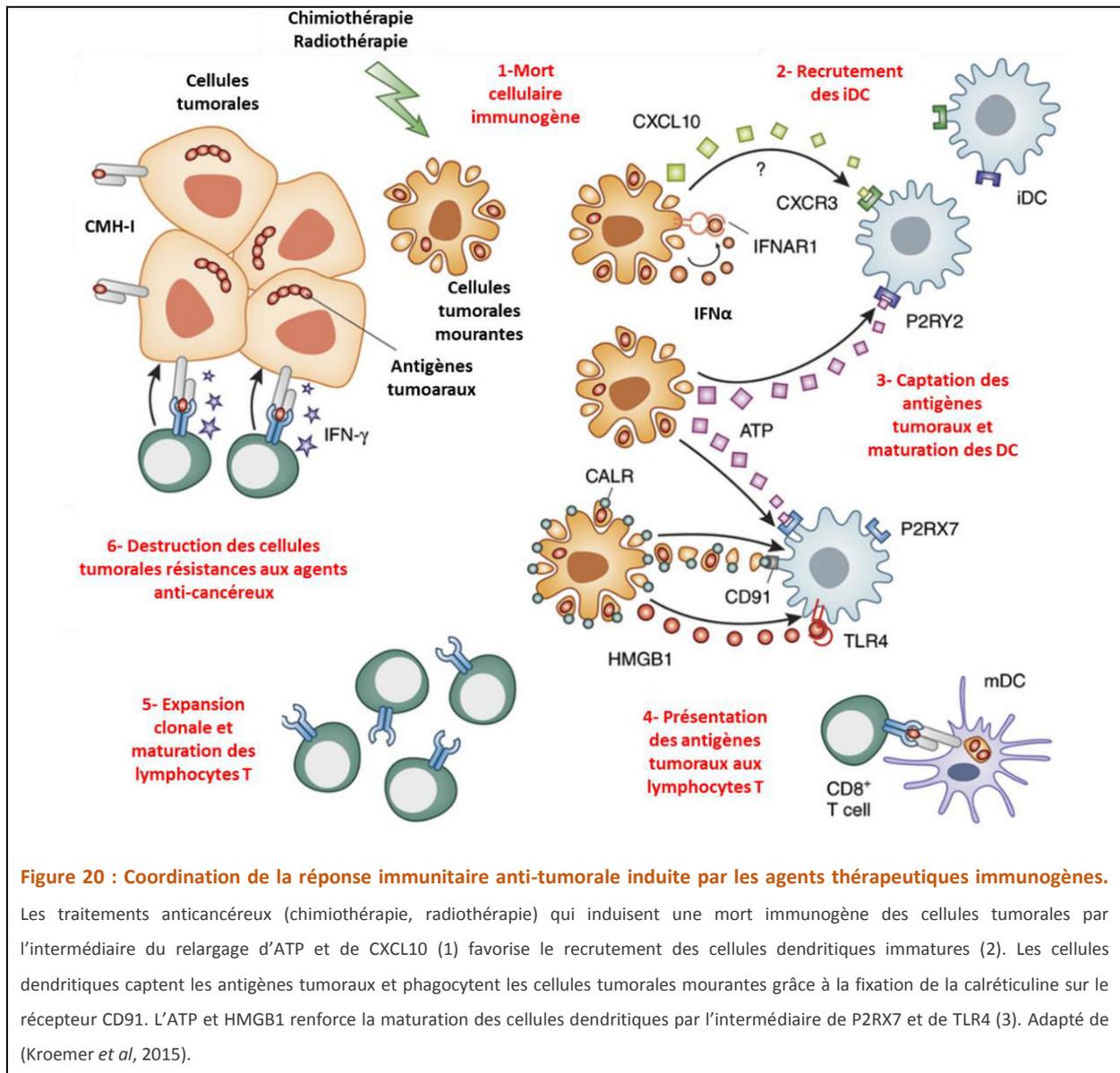
Table 1 | Danger signalling in immunogenic cell death

Danger signal	PRR	Function(s)	Note(s)	Refs
ANXA1	FPR1	Guides the final approach of APCs to dying cells	Syngeneic tumours growing in <i>Fpr1^{-/-}</i> mice are normally infiltrated by myeloid cells in response to immunogenic chemotherapeutics	39
ATP	• P2RX7 • P2RY2	Favours the recruitment of APCs and their activation	The secretion of ATP by cancer cells undergoing chemotherapy-driven ICD, but not ICD triggered by hypericin-based PDT, relies on autophagy	36,74
CALR	LRP1	Promotes the uptake of dead cell-associated antigens	CALR exposure seems to be required for the immunogenicity of dying cancer cells, but its role in the immunogenicity of cells succumbing to infection has not yet been tested	33,35, 46-48, 55,57,69, 84,87,88
Cellular RNA	TLR3	Promotes the synthesis of pro-inflammatory factors including type IIFNs	TLR3 signalling in cancer cells undergoing ICD appears to stem from the detection of cellular RNA in the endosomal compartment	37
CpGDNA	TLR9	Promotes the synthesis of pro-inflammatory factors including type IIFNs	TLR9 is involved in the detection of unmethylated CpG-rich DNA, which is generally bacterial, within the endosomal compartment	17
CXCL10	CXCR3	Stimulates T cell recruitment	CXCL10 is released by cancer cells succumbing to anthracycline-driven ICD as a consequence of autocrine and/or paracrine type IIFN signalling	37
dsDNA	CDSs	Promotes the synthesis of pro-inflammatory factors including type IIFNs	Most CDSs promote type IIFN synthesis by activating STING	19
dsRNA	TLR3	Promotes the synthesis of pro-inflammatory factors including type IIFNs	TLR3 is involved in the detection of viral dsRNA in the endosomal compartment	17
PDIA3	?	Promotes the uptake of dead cell-associated antigens	The exposure of PDIA3 with CALR is obligatory for the immunogenicity of some, but not all, forms of ICD	34,46,72
Flagellin	TLR5	Promotes the synthesis of pro-inflammatory factors including type IIFNs	Flagellin is an abundant component of bacterial flagella	17
HMGB1	• AGER • TLR2 • TLR4	Promotes the synthesis of pro-inflammatory factors including type IIFNs	HMGB1 has multiple immunostimulatory functions upon binding to various PRRs, but its role in ICD seems to depend on TLR4	35,47,55, 57,99
HSP70	LRP1	Stimulates the uptake of dead cell-associated antigens	Although the exposure of HSP70 has been shown to accompany several instances of ICD, its requirement in the process has not been tested	35,46,47, 61,87
HSP90	LRP1	Stimulates the uptake of dead cell-associated antigens	Although the exposure of HSP90 has been shown to accompany several instances of ICD, its requirement in the process has not been tested	35,47,87
Lipopolysaccharide	TLR4	Promotes the synthesis of pro-inflammatory factors including type IIFNs	Lipopolysaccharide is an abundant component of the outer wall of all Gram-negative bacteria	17
ssRNA	TLR7	Promotes the synthesis of pro-inflammatory factors including type IIFNs	TLR7 is involved in the detection of viral ssRNA in the endosomal compartment	17
Type IIFNs	IFNAR	Promote CXCL10 secretion by cancer cells and exert immunostimulatory effects	Type IIFNs support chemotherapy-driven ICD mostly via autocrine or paracrine circuitries, and they exert immunostimulatory effects by triggering IFNAR signalling in immune cells	23,37
Viral RNA	RLRs	Promotes the synthesis of pro-inflammatory factors including type IIFNs	Distinct RLRs recognize specific viral RNA species but operate via a common signalling pathway dependent on MAVS	20

AGER, advanced glycosylation end product-specific receptor; ANXA1, annexin A1; APC, antigen-presenting cell; CALR, calreticulin; CDS, cytosolic DNA sensor; CXCL10, CXC-chemokine ligand 10; CXCR3, CXC-chemokine receptor 3; ds, double-stranded; FPR1, formyl peptide receptor 1; HMGB1, high-mobility group box 1; HSP70, heat shock protein 70 kDa; HSP90, heat shock protein 90 kDa; ICD, immunogenic cell death; IFN, interferon; IFNAR, interferon α/β -receptor; LRP1, LDL receptor related protein 1; MAVS, mitochondrial antiviral signalling protein; PDIA3, protein disulfide isomerase family A member 3; PDT, photodynamic therapy; P2RX7, purinergic receptor P2X7; P2RY2, purinergic receptor P2Y2; PRR, pattern recognition receptor; RLR, RIG-I-like receptor; ss, single-stranded; STING, stimulator of interferon genes; TLR, Toll-like receptor.

La description de ces différents signaux et leurs mécanismes d'induction permet de comprendre pourquoi la stimulation du système immunitaire par une mort immunogène nécessite absolument la CRT, l'ATP et HMGB1. Ces trois signaux sont complémentaires. Ils permettent d'agir à différents niveaux de l'attraction et de la stimulation des cellules présentatrices d'antigènes. Si l'ATP et HMGB1 participent au recrutement des cellules dendritiques, il participe aussi à leur maturation. La calréticuline est là ensuite pour favoriser la phagocytose des cellules mourantes et permet plus tard l'exposition des peptides tumoraux. Ces antigènes serviront ensuite à l'activation des

lymphocytes T naïfs et mémoires présents dans les organes lymphoïdes secondaire et tertiaire. Les cellules effectrices T-CD8 et T-CD4 (de type $\alpha\beta$ et/ou $\gamma\delta$) pourront alors migrer et infiltrer la tumeur afin d'inhiber la prolifération et détruire les cellules tumorales par l'intermédiaire de l'IFN γ , du TNF α ou encore des enzymes cytotoxiques telles que la perforine et les granzymes (Matarollo *et al*, 2011 ; Klionsky *et al*, 2012) (Figure 20)



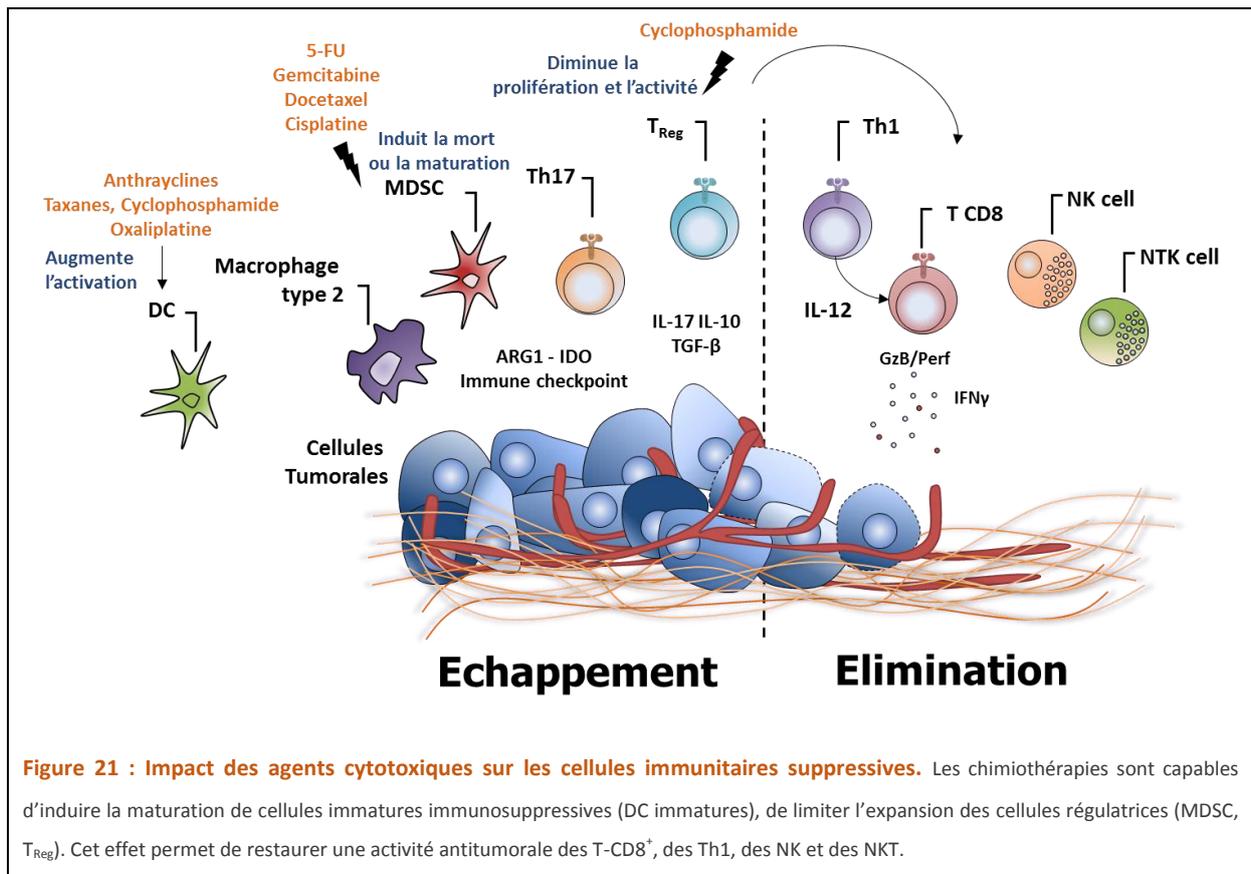
Cette notion de mort cellulaire immunogène induite par les agents thérapeutiques a été une découverte très importante. Elle a permis d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques que nous développerons par la suite quand nous parlerons de la combinaison chimiothérapie/immunothérapie. Ces découvertes ont permis également de réaliser une classification des chimiothérapies en fonction de leur capacité à induire une mort immunogène ou non. Enfin, la compréhension des mécanismes moléculaires associés à l'ICD a permis de mettre en

lumière l'existence de phénomènes de chimiorésistance liés à la perte d'un/des signaux immunogènes lié à la tumeur elle-même (expression de CD47, CD39/CD73, perte de la sécrétion de CXCL10) ou à l'hôte (polymorphisme génique). C'est le cas des patients présentant un polymorphisme de *TLR4* ou de *P2RX7* lié à une perte de fonction de la protéine. Ces malades ont une plus forte chance de résister à un traitement par oxaliplatine ou par anthracyclines (Tesniere *et al*, 2010; Vacchelli *et al*, 2012).

L'augmentation de l'antigénicité ou de l'immunogénicité ne sont pas les seuls effets immunologiques des chimiothérapies, elles peuvent aussi avoir un impact direct sur le système immunitaire, en particulier sur les mécanismes d'immunosuppression.

a) Inhibition de l'immunosuppression par les chimiothérapies

L'immunosuppression présente au niveau de la tumeur est liée à la présence des cellules leucocytaires de types lymphoïde ou myéloïde capables de stopper la réponse immunitaire. Nous avons précédemment parlé des lymphocytes T régulateurs, des cellules rTh17 ou encore des MDSC et des macrophages de type 2. Certaines chimiothérapies peuvent agir sur la prolifération ou la fonctionnalité de ces cellules et restaurer une réponse immunitaire en levant l'immunosuppression. Nous avons déjà parlé de l'effet cytotoxique du 5-FU, de la gemcitabine ou du docétaxel sur les cellules MDSC (Vincent *et al*, 2010). Toujours concernant les cellules myéloïdes, il a été montré que le paclitaxel avait la capacité d'induire la maturation et la présentation des antigènes par les cellules dendritiques à partir de cellules monocytaires immatures (Pfannenstiel *et al*, 2010). Le cyclophosphamide a également montré des effets immunologiques intéressants par sa capacité à inhiber les fonctions suppressives des lymphocytes T régulateurs (Ghiringhelli *et al*, 2004). Le cyclophosphamide empêche également la différenciation primaire des T-CD4⁺ et T-CD8⁺ naïfs en cellules T régulatrices différenciées *in vitro* par l'IL-2 et le TGF- β (Traverso *et al*, 2012). La gemcitabine, le docétaxel ou encore la vinorelbine sont également capables de dépléter les lymphocytes T régulateurs (Li *et al*, 2014; Roselli *et al*, 2013). L'inhibition de l'immunosuppression par les chimiothérapies a permis de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques associant par exemple une chimiothérapie immunogène (oxaliplatine) avec deux chimiothérapies ciblant les T_{Reg} et les MDSC (cyclophosphamide et gemcitabine) ou encore l'administration de cyclophosphamide pour optimiser une vaccination, ou l'expansion de lymphocytes T effecteurs après un transfert adoptif. Néanmoins, l'effet de ces chimiothérapies reste aspécifique et elles ne permettent pas de diminuer complètement et dans la durée la présence des cellules immunosuppressives dans le microenvironnement tumoral. L'émergence des nouvelles stratégies d'immunothérapie a permis de mettre en place des protocoles thérapeutiques justement basés sur l'inhibition spécifique d'un ou de plusieurs mécanismes d'immunosuppression (Figure 21).



2. Immunothérapie et réponse immunitaire anti-tumorale

Cibler directement le système immunitaire pour limiter et stopper la croissance des cellules cancéreuses, voici ce qu'est l'immunothérapie en oncologie. L'idée d'utiliser des agents thérapeutiques ciblant l'immunité n'est pas nouvelle et date de la fin du 19^{ème} siècle. C'est grâce aux travaux de William B. Coley et à ces résultats spectaculaires que l'immunothérapie est née. Il a eu l'idée d'utiliser un mélange composé de toxines bactériennes (*Straptococcus pyogenes* et *Bacillus prodigiosus*) pour traiter un de ses patients atteint d'un cancer vésical disséminé. Le résultat fut incroyable puisque son patient, un homme de 26 ans, fut en régression complète et ne mourut que 26 ans plus tard d'une attaque cardiaque (Coley, 1991). Ces résultats ont été obtenus avant les travaux Paul Ehrlich et d'Elie Metchnikoff et les premières preuves de l'existence d'une immunosurveillance des tumeurs en 1909. Il faudra attendre les années 50 pour que la recherche en immuno-oncologie s'accélère avec entre autre la mise en évidence de l'existence des antigènes tumoraux (Foley, 1953) et la découverte du premier antigène tumoral (Abelev *et al*, 1963) ou encore la découverte de l'interféron gamma en 1965 par Wheelock E (Wheelock, 1965). A partir de cette époque, quatre grandes stratégies d'immunothérapie ont été envisagées :

- ✓ L'immunothérapie **non spécifique** : basée sur l'utilisation d'agents capable de stimuler largement l'immunité (BCG, cytokines (IL-2, GM-CSF, IL-12))
- ✓ L'immunothérapie **active** : vaccination contre des peptides tumoraux reconnus par les cellules effectrices cytotoxiques
- ✓ L'immunothérapie **adoptive** : transfert autologue de cellules immunitaires activées *in vitro* contre un large spectre de peptides tumoraux du patient
- ✓ L'immunothérapie **passive** : basée sur l'utilisation d'anticorps capables de moduler la réponse immunitaire par inhibition des mécanismes d'immunosuppression ou par stimulation des voies d'activation lymphocytaire.

À la fin des années 1960, mis à part l'utilisation d'adjuvant tel que le BCG pour la prise en charge de certains cancers (vessie), il était encore trop tôt pour que ce mette en place ces stratégies thérapeutiques. Les connaissances des mécanismes fondamentaux de la réponse immunitaire étaient encore largement méconnues et il faudra attendre la fin des années 1980 et le « boom » du génie génétique pour que les limites technologiques ne soient plus un frein à la recherche. Le génie génétique a notamment permis de mettre en place l'utilisation de protéines recombinantes et d'améliorer les techniques pour la production d'anticorps thérapeutiques. En 1986, Steven Rosenberg montre que l'administration d'interleukine-2 ou d'interféron-alpha peut avoir un effet thérapeutique dans le mélanome (Lotze *et al*, 1986 ; Kirkwood *et al*, 1985). En 1985, les premiers résultats de l'effet thérapeutique d'un transfert de cellules T montrent qu'il est possible d'obtenir des réponses objectives dans les modèles précliniques (Shu & Rosenberg, 1985). Néanmoins, l'efficacité modérée des facteurs de croissance immunologiques, du transfert adoptif de lymphocytes T ou de la vaccination plongea l'immunothérapie dans une période de scepticisme. L'explication de l'effet modéré de ces traitements s'explique maintenant grâce à une meilleure compréhension des mécanismes qui régulent la réponse immunitaire. L'identification d'une multitude de récepteurs membranaires capables de réguler positivement ou négativement la réponse effectrice a grandement permis de redonner de l'espoir quant à l'efficacité clinique de l'immunothérapie.

a) Concept de base sur la biologie des points de contrôles immunologiques

L'efficacité modérée des stratégies d'immunothérapie non spécifique, adoptive et active que nous venons d'évoquer, s'explique par le point commun qui les caractérise. En effet, toutes ses stratégies ont pour unique objectif la stimulation massive de l'immunité contre la tumeur. Néanmoins, mais fort heureusement pour nous, notre système immunitaire est équipé d'un ensemble de mécanisme d'auto-inhibition qui permettent d'éviter les conséquences désastreuses d'une réponse inflammatoire chronique et incontrôlée. Cette auto-inhibition qui fait suite à l'activation du système immunitaire, implique un grand nombre de récepteurs membranaires qui

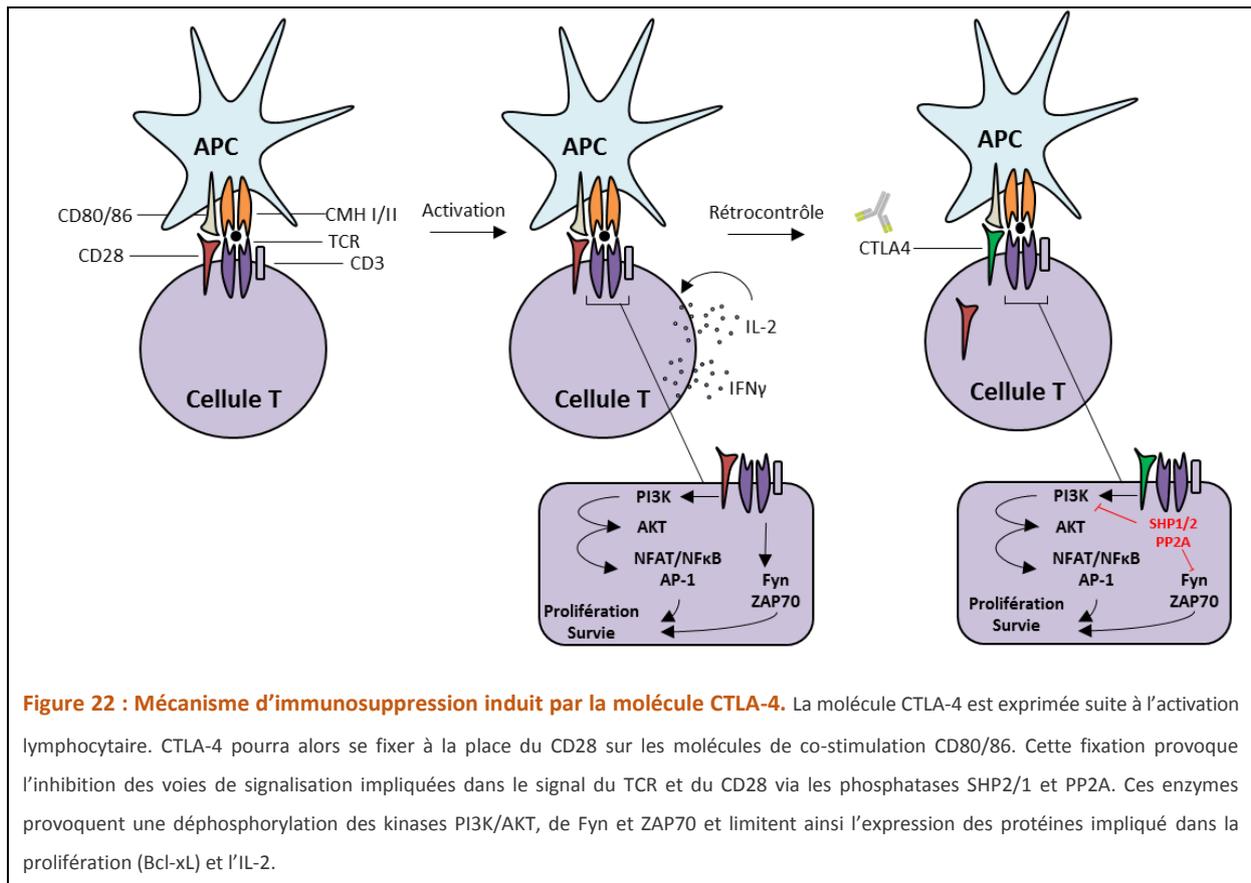
joue le rôle de point de contrôle immunologique, appelé plus communément « immune checkpoint ». La découverte de ces points de contrôle est assez récente. Elle a été permise grâce à l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation primaire ou secondaire des lymphocytes B, NK et T.

b) Les points de contrôles immunologiques : régulation de l'activation lymphocytaire précoce

CTLA-4

CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4, CD152) est le premier récepteur inhibiteur identifié grâce à Golstein P en 1987 (Brunet *et al*, 1987) et il sera d'ailleurs le premier récepteur inhibiteur ciblé en oncologie. CTLA-4 est exprimé à la surface des lymphocytes T où il régule l'amplitude du signal induit par le CD28 dans les premiers instants de l'activation lymphocytaire. Le CD28 ne régule pas en soi l'activation lymphocytaire puisque c'est la fixation du TCR au niveau du CMH-I ou du CMH-II qui est le premier signal activateur. Néanmoins, sans la stimulation du CD28 par le CD80 (ou B7.1) ou le CD86 (ou B7.2), le lymphocyte ne pourra pas proliférer correctement et il entrera dans un état d'anergie. L'affinité de CD80 et de CD86 pour le CD28 est plus faible que pour CTLA-4 (Linsley *et al*, 1994). La fixation de CTLA4 à la place du CD28 empêche d'une part la mise en place des signaux d'activation et d'autre part favorise l'inhibition par l'intermédiaire de phosphatases qui stoppent la signalisation du TCR et du CD28, en particulier en inhibant les kinases ZAP70, Lyn ou encore Fyn (Rudd *et al*, 2009). La perte de ces kinases empêche l'activation des facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et la sécrétion des cytokines (IL-2) tels que NF-AT, NF- κ B et AP-1 (Fraser *et al*, 1999). De plus, CTLA-4 semble également jouer sur la biologie des cellules présentatrices d'antigène en provoquant une trans-endocytose de CD80/CD86 (Qureshi *et al*, 2011). CTLA-4 n'est pas régulé de manière transcriptionnelle. C'est l'activation primaire du lymphocyte, en particulier *via* ZAP70, qui provoque son recrutement à partir de vésicules cytosoliques au niveau de la membrane plasmique (Elke V *et al*, 2009). L'engagement de CTLA-4 peut avoir lieu aussi bien au sein d'un lymphocyte T-CD8⁺ que T-CD4⁺. Néanmoins, il semble que CTLA-4 influence plus majoritairement la biologie des cellules T-CD4⁺ en induisant notamment les capacités immunosuppressives et la prolifération des lymphocytes T régulateurs. L'absence de CTLA-4 au contraire provoque une perte complète de la fonctionnalité des T_{Reg} et favorise l'activation et la prolifération des cellules T-CD4⁺ effectrices, ce qui contribue à la mise en place d'une réaction inflammatoire exacerbée chez la souris (Zheng *et al*, 2006). CTLA-4 joue un rôle important dans la réponse immunitaire anti-tumorale. La régulation de cette réponse a lieu principalement au sein des organes lymphoïdes secondaires, lieu de la rencontre avec les cellules dendritiques et non au niveau de la tumeur. Il est important de préciser également que les ligands de CTLA-4 (CD80 et CD86)

peuvent être exprimés par d'autres types cellulaires que les cellules présentatrices d'antigènes, les cellules T notamment. Ce rôle inhibiteur de CTLA-4 au moment du « priming » des cellules T permet de stopper la réponse immunitaire et surtout son maintien dans le temps. En effet, la stimulation chronique du système immunitaire par les antigènes tumoraux favorise l'activation prolongée des cellules T et conduit à une forte expression de CTLA-4. L'inhibition de CTLA-4 par un anticorps permet d'obtenir, chez la souris, des régressions complète ou partielle de la tumeur (Leach *et al*, 1996; van Elsas *et al*, 1999) (Figure 22)



LAG-3

LAG-3 (« *Lymphocyte-Activation Gene 3* », CD223) est un récepteur inhibiteur découvert en 1990 (Triebel *et al*, 1990). Cette protéine possède comme le CD4, la possibilité de se fixer à la molécule CMH-II exprimée par les cellules présentatrice d'antigène et les lymphocytes T et B activés. Le gène codant pour LAG-3 possède une homologie de séquence de 20% avec le gène codant pour le CD4. Bien qu'elle soit très similaire d'un point de vue structural, LAG-3 possède une affinité pour le CMH-II bien plus forte que le CD4. Le mécanisme d'inhibition induit par LAG-3 est donc similaire à celui de CTLA-4 puisque LAG-3 va entrer en compétition avec le CD4 pour limiter la fixation du lymphocyte au CMH-II. LAG-3 est très peu exprimé à la surface du lymphocyte T naïf

comparativement au CD4. À l'inverse, le lymphocyte T activé présente une expression forte de LAG-3 et une faible expression du CD4. C'est au moment de l'activation lymphocytaire que s'opère ce changement. LAG-3 est à l'origine présent au niveau de vésicules cytosoliques où il interagit avec la protéine Rab11b, et c'est l'activation du TCR qui entraîne une rapide translocation de LAG-3 au niveau membranaire par l'intermédiaire de Rab11b (Woo *et al*, 2010). LAG-3 possède une unique queue intracytosolique qui diffère du CD4. Il possède un domaine de type « KIEELE » essentiel pour ces fonctions inhibitrices (Workman *et al*, 2002). La fixation de LAG-3 au CMH-II provoque une forte diminution du signal calcique, une chute de l'expression de l'IL-2, réduit la production des cytokines de type Th1 et augmente celle de l'IL-10 (Huard *et al*, 1994). De plus, la présence de LAG-3 limite fortement le temps de contact entre le lymphocyte et les cellules présentatrices d'antigène. La surexpression de LAG-3 au niveau d'un lymphocyte T naïf provoque sa polarisation en T régulateurs (Li *et al*, 2007), alors que l'absence de LAG-3 provoque une prolifération massive des cellules CD4 effectrices et les rend moins sensibles à l'immunosuppression induite par les T_{Reg} (Durham *et al*, 2014; Segal *et al*, 2014). LAG-3 peut également être exprimé par les cellules CD8 et il est capable là encore d'induire un signal inhibiteur (Grosso *et al*, 2007). Comme pour CTLA-4, LAG-3 peut être retrouvé en grande quantité à la surface des lymphocytes T activés dans les organes lymphoïdes des souris infectées par un virus ou porteuses d'une tumeur (Blackburn *et al*, 2009). LAG-3 peut être exprimé avec d'autres récepteurs inhibiteurs (PD-1, CTLA-4) aussi bien chez la souris que chez l'homme (Baitsch *et al*, 2012; Matsuzaki *et al*, 2010). Chez la souris, l'utilisation d'anticorps permettant de neutraliser LAG-3 ne permet pas à elle seule d'induire une régression tumorale. Néanmoins, lorsque l'anticorps anti-LAG-3 est administré en combinaison avec un anti-PD-1, l'effet thérapeutique est très synergique (Woo *et al*, 2012) (Figure 23).

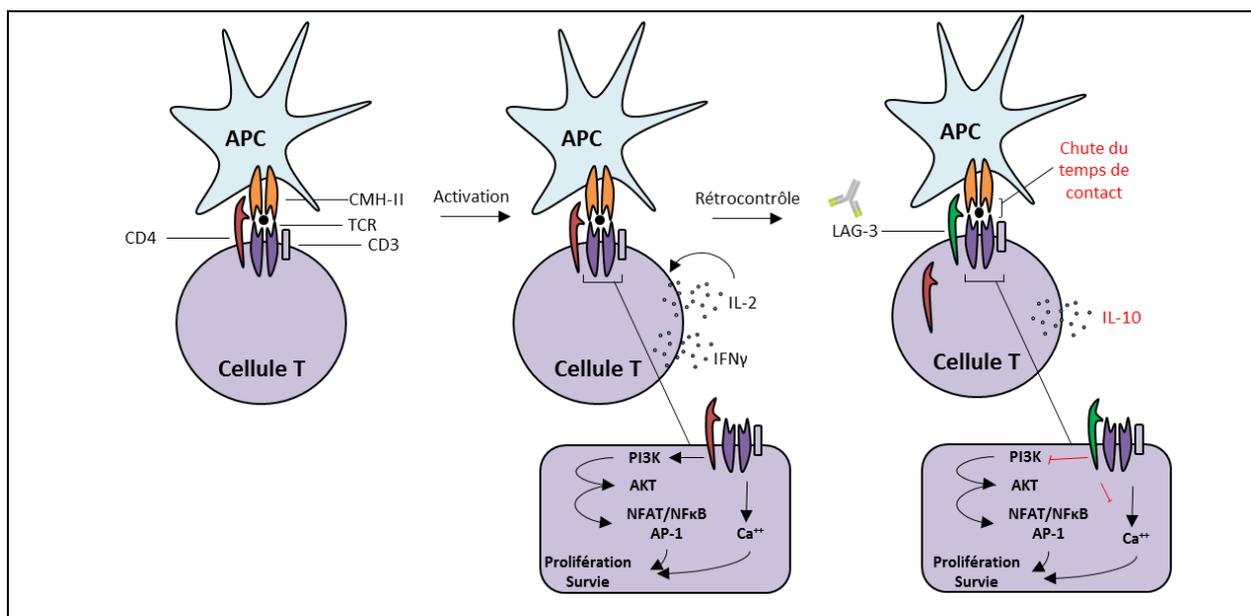


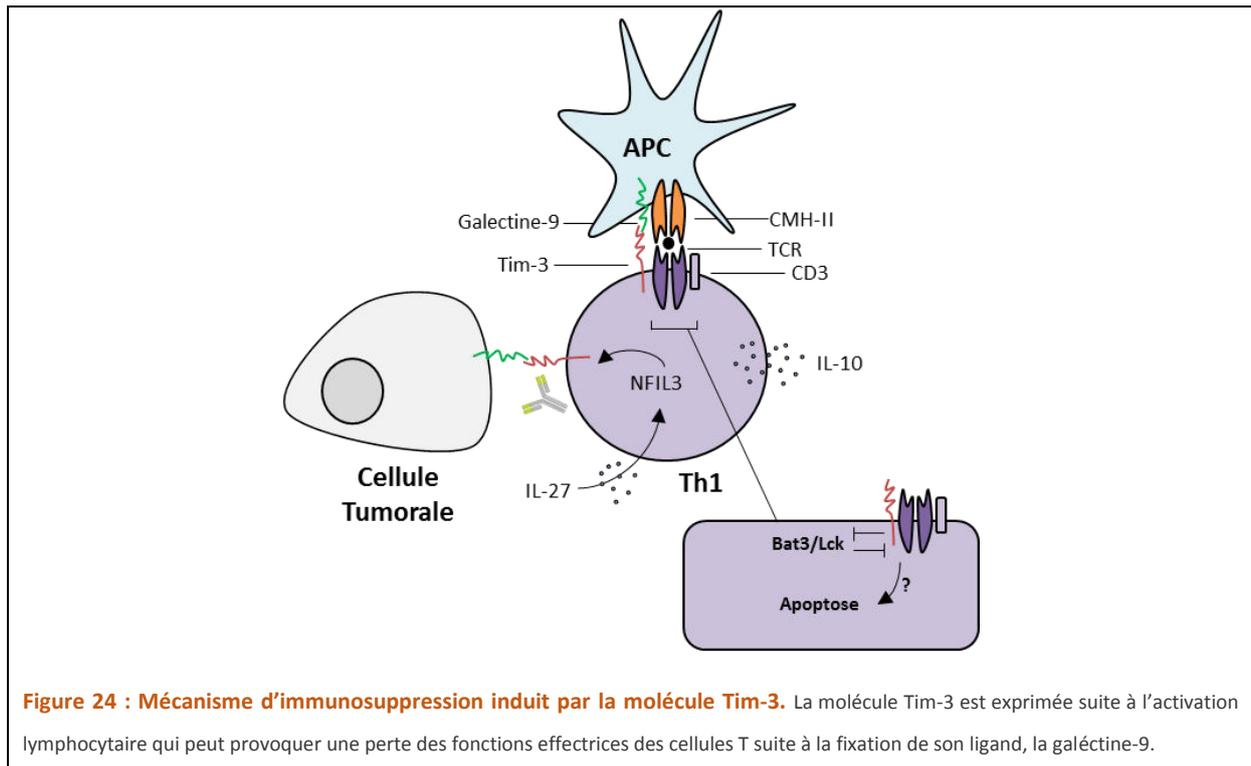
Figure 23 : Mécanisme d'immunosuppression induit par la molécule LAG-3. La molécule LAG-3 possède une affinité pour le CMH-II plus forte que la molécules CD4. Grâce à ses domaines protéiques inhibiteurs LAG-3 provoque une diminution des signaux de prolifération de l'activation lymphocytaire.

c) Les points de contrôle immunologiques : régulation du maintien de l'activation lymphocytaire

Nous venons de voir que la réponse immunitaire pouvait être régulée négativement dès les premiers signaux d'activation induit par le CD28 ou le CHM-II en prenant l'exemple de CTLA-4 et de LAG-3. Il existe également des récepteurs inhibiteurs capables de moduler la réponse immunitaire au moment de la réponse effectrice. C'est le cas notamment de Tim-3 et PD-1.

Tim-3

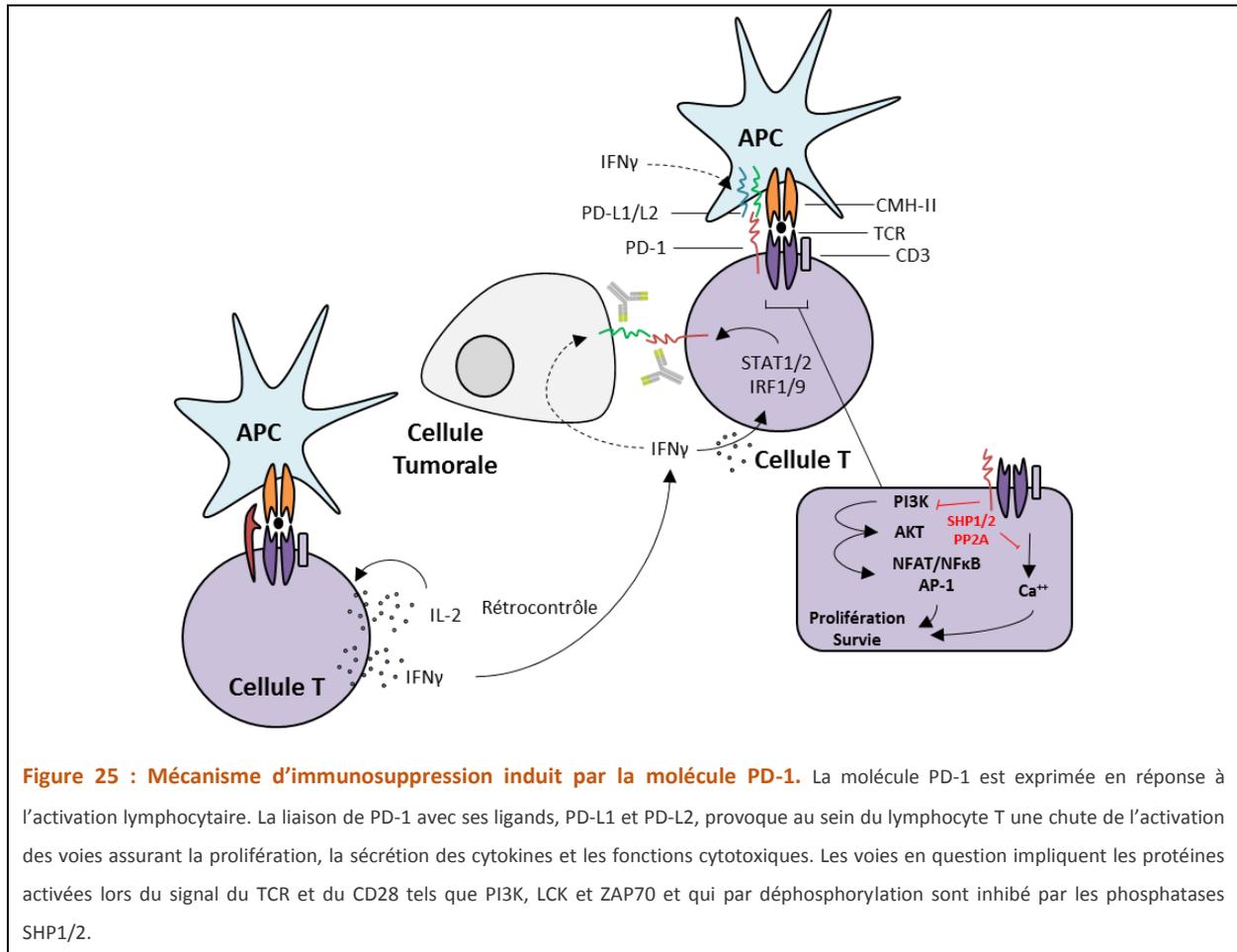
Tim-3 (« *T cell Immunoglobulin and Mucin-3* ») est un récepteur inhibiteur exprimé par les lymphocytes T activés et en particulier par les cellules Th1. Il peut être exprimé également par les NK et les monocytes (Sanchez-Fueyo *et al*, 2003). L'absence de Tim-3 chez la souris ne provoque pas en soi de maladies auto-immunes, mais elle permet néanmoins d'accélérer les processus inflammatoires dans les modèles de diabète et de maladies neurodégénératives (Monney *et al*, 2002; Sanchez-Fueyo *et al*, 2003). Ce récepteur peut être induit par différentes cytokines présente dans le microenvironnement tumoral tel que l'IL-27, qui vient récemment d'être décrite pour sa capacité à induire Tim-3 via le facteur de transcription NFIL3 (Zhu C *et al*, 2016). Tim-3 se lie principalement à la galectine-9 (Gal9), qui provoque la mort par apoptose des cellules Th1 et favorise la sécrétion d'IL-10. Des travaux récents ont montré que la protéine CECAM1 pouvait être co-exprimée et interagir avec Tim3 et influencer la fixation de Tim-3 à son ligand (Huang *et al*, 2015). La fixation de Tim-3 à son ligand lui permet d'inhiber le complexe Bat3/Lck qui assure normalement l'inhibition de la signalisation intracellulaire induite par Tim-3. La perte de Bat3 provoque une forte activation lymphocytaire de type Th1, qui est à l'origine d'une inflammation importante et incontrôlée (Rangachari M *et al*, 2012)(Figure 24) Tim-3 est un récepteur inhibiteur qui joue un rôle important dans l'inhibition des cellules effectrices intra tumorales. En effet, Tim-3 est retrouvé à la surface des lymphocytes infiltrant les tumeurs dans de nombreux modèles (CT26, B16F10, 4T1) et il est bien souvent co-exprimé avec le récepteur PD-1. L'expression de Tim-3 reflète un état anergique prononcé mais elle témoigne aussi d'une activité anti-tumorale préalable importante. Les cellules qui expriment Tim-3 auront un niveau de production de TNF α , d'IFN γ et d'IL-2 diminué. Ainsi, l'inhibition de Tim-3 par un anticorps neutralisant permet de restaurer une immunité tumorale et d'induire la régression d'un grand nombre de tumeur (Sakuishi *et al*, 2010).



PD-1

PD-1 (« *Programmed cell Death-1* », CD279) est un récepteur inhibiteur découvert par hasard en 1992, alors que l'équipe qui l'a identifié cherchait en réalité à trouver de nouveaux gènes impliqués dans la mort cellulaire programmée sur deux lignées cellulaires hématopoïétiques (LyD9 et 2B4.11) (Ishida *et al*, 1992). Cette équipe de recherche a constaté que l'activation par le phorbol-myristate-acétate (PMA) et la ionomycine provoquait la mort de ces cellules. C'est en analysant une banque d'ADNc réalisée peu avant le processus de mort que l'ADNc de PD-1 a pu être identifié. Son rôle direct dans le processus de mort cellulaire programmé a finalement été infirmé et son rôle est resté méconnu jusqu'en 1998. Les travaux de Honjo T ont décrit l'apparition spontanée d'une maladie auto-immune de type lupus chez les souris déficientes pour PD-1 (*Pdcd1*^{-/-}) (Nishimura *et al*, 1998). PD-1 fut identifié à la surface des lymphocytes T-CD4⁺, T-CD8⁺, B ou NK et également sur certaines cellules myéloïdes telles que les cellules dendritiques et les monocytes. Il est induit lors de l'activation lymphocytaire. Son rôle est donc complémentaire à celui de CTLA-4 ou de LAG-3 qui jouent eux, un rôle sur le « priming » de la cellule. PD-1 est induit par l'intermédiaire des trois signaux d'activation du lymphocyte. Le BCR ou le TCR favorise son expression par la voie ZAP70/PLCγ et les facteurs de transcription AP1, NFAT et NF-κB qui induisent l'expression génique du gène de PD-1. Le signal induit par le CD28 provoque l'activation de la voie PI3K/AKT qui permet de soutenir les voies induites par le TCR. Enfin la stimulation par les cytokines, l'IFNγ mais aussi l'IL-2, l'IL-7, l'IL-15 et l'IL-21 permettent d'induire PD-1 par les voies STAT1/STAT2 et par l'intermédiaire des facteurs de

transcription IRF1 et IRF9 (Okazaki *et al*, 2013). Les voies induites par PD-1 au sein du lymphocyte T le sont grâce à sa queue cytoplasmique composée d'un motif ITIM et d'un motif ITSM (Long E *et al*, 1999). Ces motifs permettent d'inhiber la réponse immunitaire par l'intermédiaire de phosphatases, comme SHP-2, qui provoquent une inhibition de la voie LCK/ZAP70/PI3K et conduit à une forte diminution de la production des cytokines de type Th1 (IFN γ , TNF α , IL-2), de la prolifération (chute de l'expression du Ki67) et de l'activité cytotoxique (Granzyme, Perforine) (Nirschl & Drake, 2013) (Figure 25).



Les ligands de PD-1 sont PD-L1 (« *Programmed cell Death Ligand 1* », B7-H1, CD274) et PD-L2 (« *Programmed cell Death Ligand 2* », B7-DC ou CD273). Ils ne sont pas uniquement portés par les cellules présentatrices d'antigène comme c'est le cas pour les ligands de CTLA-4 et de LAG-3. En effet, PD-L1 peut être exprimé par les lymphocytes T activés, les cellules myéloïdes mais aussi par les cellules endothéliales et épithéliales normales ou cancéreuses. PD-L2 est exprimé de manière plus restreinte que PD-L1 et il est principalement retrouvé à la surface des cellules dendritiques et tumorales (Freeman *et al*, 2000; Latchman *et al*, 2001; Obeid *et al*, 2016). La présence de PD-L1 à la surface de cellules non-hématopoïétiques indique bien que le rôle de PD-1 peut se situer au niveau

des tissus périphériques et que dès lors, il peut jouer un rôle important dans l'immunité de la tumeur. L'expression de PD-L1 par les cellules du stroma tumoral ou par les cellules cancéreuses elles-mêmes, peut favoriser l'échappement de la tumeur au système immunitaire. L'étude histologique de nombreux types de cancers montre que l'expression importante de PD-L1 est associée à des cancers plus avancés et de moins bon pronostics (Ghebeh *et al*, 2006; Kim *et al*, 2013a). Il existe deux mécanismes de résistance à l'immunité impliquant la voie PD-1/PD-L1. La résistance innée et la résistance adaptative (Figure 26). Ces deux processus peuvent coexister. Les cellules tumorales peuvent exprimer à leur surface des ligands des récepteurs inhibiteurs de manière constitutive suite aux dérégulations génétiques ou en réponse à des signaux inflammatoires présents dans leur environnement (IFN γ). L'expression constitutive de PD-L1 a pu être retrouvée dans de nombreux types de cancers (sein, gliome, prostate, poumon). Ce phénomène est lié à l'activation constitutive des différentes voies oncogéniques telles que les voies PI3K/AKT, ALK, STAT3 ou encore MAPK (Crane *et al*, 2009; Parsa *et al*, 2007). La mise en place d'une résistance adaptative passe par les mécanismes d'induction physiologique de PD-L1 qui prennent place lors d'une stimulation par l'IFN γ afin de protéger les tissus d'une réponse immunitaire excessive. C'est dans ce dernier cas que les cellules stromales peuvent également participer à l'inhibition de la réponse cytotoxique. Les voies de signalisation qui permettent d'induire PD-L1 par l'IFN γ implique l'activation de la voie JAK2/STAT1, P13K/AKT et Ras/MAPK qui conduit par l'intermédiaire des facteurs de transcription IRF1, cJun, cFos et NF- κ B d'induire l'expression génique de PD-L1 (Ritprajak & Azuma, 2015). L'IFN γ n'est pas la seule cytokine à induire PD-L1. Les interférons de type I et II, le TNF α , l'IL-2, 7, 10, 12, 15 et 21 peuvent aussi induire son expression.

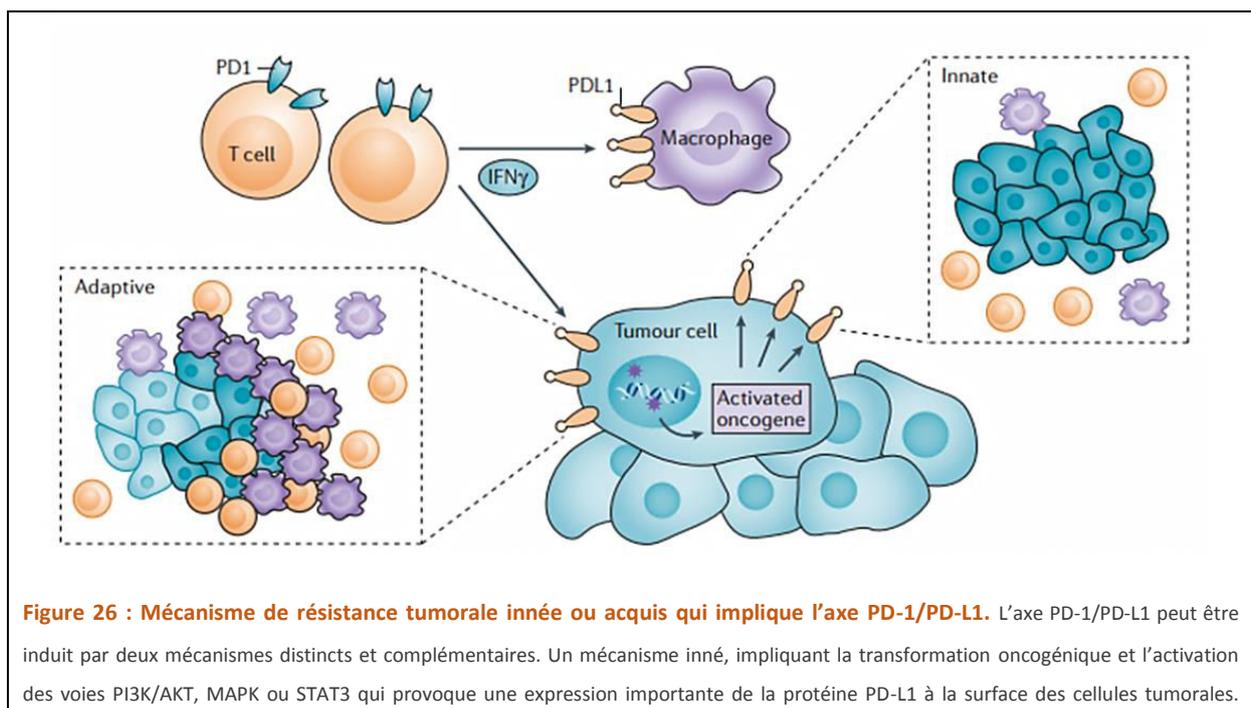


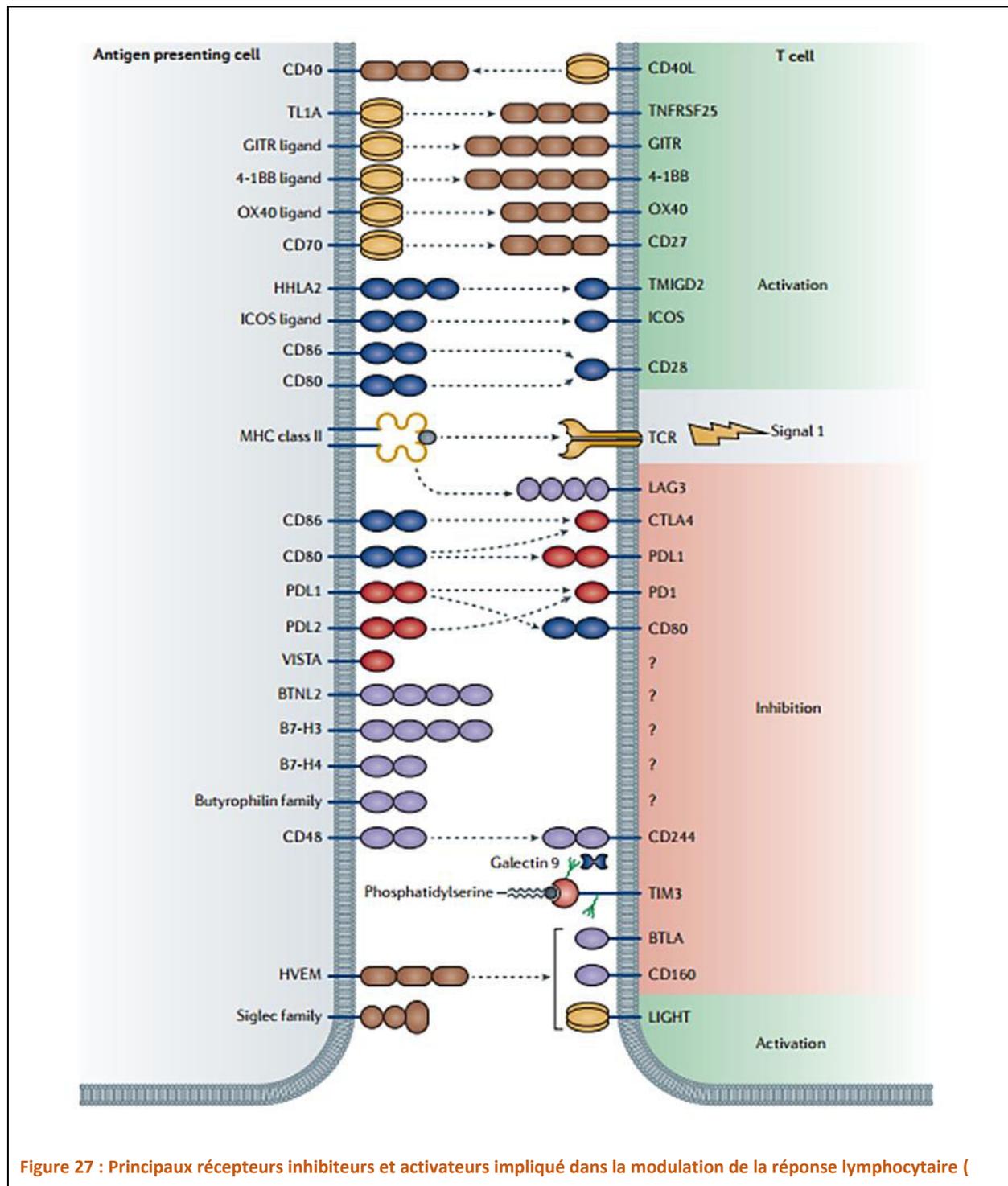
Figure 26 : Mécanisme de résistance tumorale innée ou acquis qui implique l'axe PD-1/PD-L1. L'axe PD-1/PD-L1 peut être induit par deux mécanismes distincts et complémentaires. Un mécanisme inné, impliquant la transformation oncogénique et l'activation des voies PI3K/AKT, MAPK ou STAT3 qui provoque une expression importante de la protéine PD-L1 à la surface des cellules tumorales.

L'acquisition de cet axe d'immunosuppression peut aussi être induit suite à l'exposition des cellules cancéreuses et du stroma tumoral aux cytokines inflammatoires tels que l'IFN γ . La mise en place de cet axe provoque une inhibition profonde des cellules T effectrices infiltrantes. (Topalian SL *et al*, 2016)

Dans les modèles précliniques de cancer, l'analyse de l'infiltrat lymphocytaire a permis d'établir que PD-1 était très fortement exprimé sur les lymphocytes T-cytotoxiques et que cette expression les rend sensibles à l'anergie induite par la tumeur. Cibler à l'aide d'anticorps neutralisant PD-1 permet d'obtenir chez la souris de bons résultats en termes d'inhibition de la croissance tumorale dans plusieurs types de cancers (Sakuishi *et al*, 2010).

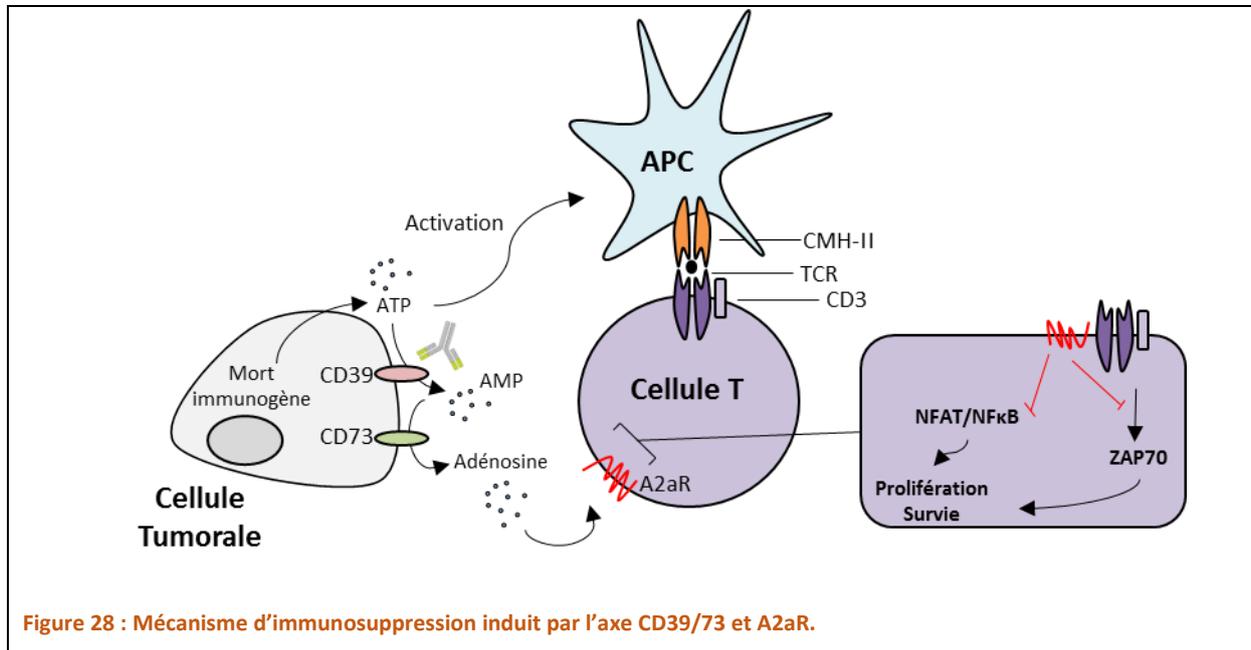
Autres récepteurs inhibiteurs

Bien évidemment, depuis la découverte de CTLA-4, LAG-3, Tim-3 ou encore PD-1 et de par les résultats prometteurs qu'il a été possible d'obtenir en ciblant ces protéines, d'autres récepteurs inhibiteurs ont pu être identifiés (Figure 27).



L'axe **CD39**, **CD73** et un des récepteurs à l'adénosine, **A2aR**, sont aussi des protéines membranaires faisant partie des récepteurs inhibiteurs. La production d'adénosine à partir de l'ATP extracellulaire provoqué par le couple CD39/CD73 permet d'induire une immunosuppression forte. L'adénosine a la capacité de se fixer au récepteur A2aR présent à la surface des cellules effectrices et induit un signal négatif. Cette inhibition comprend la perte d'activation de la voie NFκB, NFAT ou encore ZAP70. Cette voie enzymatique induit aussi une perte de l'immunogénicité des cellules

tumorales *via* la chute de l'ATP extracellulaire. Cibler cet axe est donc particulièrement intéressant puisqu'il permet de jouer sur ces deux paramètres et donc d'induire une réponse immunitaire puissante (Deaglio *et al*, 2007)(Figure 28).



TIGIT (T Cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) est un récepteur inhibiteur décrit en 2009 (Yu *et al*, 2009). Initialement, TIGIT a été décrit comme un inhibiteur de la maturation des cellules dendritiques et de la production d'IL-12 par ces dernières. Il a également été montré que l'expression de TIGIT par les NK ou les lymphocytes T provoque leur inhibition lorsqu'il se fixe à la protéine PVR (« Polio Virus Receptor, CD155). La biologie de TIGIT s'est compliquée lorsque les récepteurs CD226 et CD96 ont été identifiés comme pouvant interagir avec CD155. CD226 joue un rôle activateur, alors que CD96 joue un rôle inhibiteur (Lozano *et al*, 2012).

Le récepteur **VISTA** (V-domain Ig-containing Suppressor of T cell Activation) identifié en 2011 à la surface des lymphocytes T-CD4, T-CD8, des cellules dendritiques et des monocytes. VISTA est capable d'interagir avec VISTA-R et inhibe la fonction biologique des cellules T effectrices. L'inhibition de VISTA permet d'induire une réponse immunitaire forte et de limiter la croissance tumorale (Wang *et al*, 2011).

L'efficacité des agents thérapeutiques ciblant les récepteurs inhibiteurs repose tout de même sur l'existence préalable d'une réponse immunitaire au niveau de la tumeur. Il est donc logique de penser que les patients qui recevront un inhibiteur de ces récepteurs ne pourront pas tous répondre au traitement. L'utilisation de plusieurs anticorps dirigés contre différents récepteurs aura certainement un effet supérieur et ces stratégies sont en cours d'évaluation. Par ailleurs, nous n'avons pas parlé de l'utilisation des anticorps activateurs qui ciblent les récepteurs co-activateurs

des cellules T effectrices (OX40, CD27, CD137, ICOS, GITR, 4-1BB, CD40L) qui permettent également d'induire une réponse immunitaire efficace contre un grand nombre de tumeurs. La découverte de ces récepteurs immuno-modulateurs est une avancée majeure pour l'immunothérapie et nous allons voir que les stratégies d'inhibition de ces récepteurs sont une révolution pour l'oncologie.

d) Le retour en force de l'immunothérapie !

Avec les résultats obtenus dans sur les modèles précliniques entre la fin des années 1990 et le début des années 2000 avec les anticorps anti-CTLA4, les laboratoires de recherche et les industriels ont accéléré le développement d'agents thérapeutiques capable de cibler cette voie. Les premiers anticorps anti-CTLA4 testés en clinique dans le mélanome ont été l'ipilimumab (Bristol-Myers-Squibb) et le tremelimumab (Pfizer). Le traitement par tremelimumab fut rapidement abandonné pour des raisons d'inefficacité par rapport au traitement de référence (dacarbazine). L'ipilimumab a lui été approuvé par la FDA (« *Food and Drug Administration* ») et l'EMA (European Medicines Agency) en 2011 pour le traitement du mélanome métastatique. Les études de phase III ont montré qu'il apportait un bénéfice en termes de survie lorsqu'il est associé à un vaccin gp100, passant de 18% de survie à 2 ans contre 5% avec le vaccin seul (Hodi S *et al*, 2010). Les méta-analyses réalisées récemment ont montré que l'ipilimumab permettait d'induire approximativement 20% de réponse sur une durée de 3 ans minimum. Dans le traitement d'autres types de cancers, les anti-CTLA4 ont également montré un bénéfice clinique. Dans le cancer du pancréas, l'association ipilimumab/GVAX permet d'obtenir une chute des taux de CA19-9 (Dung T *et al*, 2013). Il permet également d'obtenir des réponses satisfaisantes dans le cancer de la prostate malgré une étude de phase III montrant que l'ipilimumab n'induisait pas de réponse pour les patients porteurs de cancer de la prostate résistant à la castration et au docétaxel et ayant été traité par radiothérapie (Kwek S *et al*, 2012).

Les anti-PD-1, le nivolumab notamment, ont montré une efficacité très importante dans le mélanome. Une étude réalisée sur 418 patients atteints de mélanome avancé a montré une supériorité du nivolumab comparativement à la dacarbazine. Dans le groupe nivolumab, le taux de réponse complète a été de 8% alors qu'il a été de 1% dans le groupe dacarbazine. D'autre part, le taux de réponse objective ainsi que la durée de réponse est bien supérieure dans le groupe nivolumab (32% *versus* 13% de réponse objective ; durée médiane de réponse non atteinte *versus* 6 mois) (Robert C *et al*, 2015). Dans le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) l'étude CheckMate 057, a comparé le nivolumab au docétaxel et a montré un allongement de la survie globale médiane. Cet essai a également montré un taux de réponse objective à 19% pour le nivolumab contre 12% pour le docétaxel. De manière similaire, l'étude CheckMate 017 a comparé le nivolumab au docétaxel dans les carcinomes épidermoïdes bronchiques avancés ayant progressé

après une première ligne de chimiothérapie à base de sels de platine. Cette étude confirme un bénéfice en faveur du nivolumab en terme de survie globale. Le taux de RO était de 20% pour le nivolumab contre 9% pour le docétaxel. Enfin, la survie sans progression était en faveur du nivolumab (HR = 0.62 (95% CI, 0.47 - 0.81; $p < 0,001$)) (Brahmer *et al*, 2015). Le nivolumab a ainsi obtenu son autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement du mélanome métastatique en 2014, pour le traitement du CBNPC et du rein en 2015. Depuis, un autre anticorps anti-PD-1, le Pembrolizumab a reçu l'autorisation de mise sur le marché. En 2016, la FDA a également autorisé l'utilisation de l'atezolizumab (anti-PD-1) pour le traitement du cancer vésical et l'utilisation du nivolumab pour le lymphome de Hodgkin. Les stratégies actuelles visent également à combiner les anticorps qui neutralisent les récepteurs inhibiteurs. En 2015, la FDA a donc annoncé qu'elle allait accélérer l'acceptation d'une combinaison anti-CTLA-4/anti-PD-1 pour le traitement du mélanome métastatique suite au résultat publié en juin 2015 indiquant que cette combinaison permettait d'induire une réponse plus forte qu'avec les deux monothérapies (Larkin *et al*, 2015).

Les anticorps anti-PD-L1 ont également montré une efficacité thérapeutique significative dans le traitement de différents cancers. La phase I du MEDI 4736 a montré des réponses objectives dans le mélanome (17%), le cancer du poumon (10%), de l'ovaire (6%) et du rein (12%) (Brahmer *et al*, 2012). D'autres études ont montré un bénéfice clinique une nouvelle fois dans le cancer du rein, du poumon et le mélanome (Hamid O *et al*, 2013 ; Cho DC *et al*, 2013 ; Spigel *et al*, 2013).

Concernant les autres récepteurs inhibiteurs, les études cliniques sont en cours pour déterminer si les anticorps anti-LAG3, anti-Tim3 sont efficaces et si l'association de ces anticorps avec un anti-PD-1 ou un anti-CTLA4 permet d'obtenir des réponses plus importantes.

L'utilisation des anticorps dirigés contre les récepteurs inhibiteurs ne permettent malheureusement pas encore d'induire des réponses prolongées sur la majorité des patients. Les études précliniques montrent néanmoins qu'il est possible d'amplifier la réponse thérapeutique en combinant le blocage des récepteurs immunomodulateurs à des thérapies plus « conventionnelles ». De plus des questions se posent quant au schéma d'administration de l'immunothérapie et des combinaisons thérapeutiques. Nous allons voir pourquoi ces combinaisons peuvent effectivement être synergiques et discuter des résultats obtenus chez l'homme.

3. Combiner l'immunothérapie à la chimiothérapie : une stratégie payante ?

Dans le but d'augmenter les taux de réponses cliniques il est important d'aborder la question des associations thérapeutiques et de la manière dont il faut les administrer. L'oncologie possède maintenant de nombreuses armes permettant « d'attaquer » la tumeur par différentes stratégies

(immunothérapie active, thérapie ciblée, radiothérapie, chimiothérapie) et associer ces thérapies à des bloqueurs des récepteurs inhibiteurs pourrait être une stratégie payante. Nous développerons dans la suite de ce chapitre le bénéfice que pourrait avoir la combinaison chimiothérapie/immunothérapie.

Nous avons vu précédemment que l'effet thérapeutique des chimiothérapies ne passait pas uniquement par une cytotoxicité directe vis-à-vis des cellules tumorales mais qu'elle pouvait dans certains cas permettre l'activation de l'immunité. Nous avons décrit en détails les mécanismes induits par les chimiothérapies qui favorisent l'antigénicité (expression du CHM-I, des ligands activateurs ou inhibiteurs des NK) et l'immunogénicité (mort cellulaire immunogène) des cellules tumorales. Nous avons également parlé de l'effet des chimiothérapies sur l'immunosuppression induite par certaines populations leucocytaires.

Une étude récente vient justement de montrer qu'une chimiothérapie immunogène (oxaliplatine) associée à une chimiothérapie inhibitrice des T_{Reg} (cyclophosphamide) permettait de sensibiliser des tumeurs à l'origine résistantes à l'immunothérapie (anti-PD-1 et anti-CTLA-4). A l'inverse, l'utilisation d'une chimiothérapie non immunogène (cis-platine et paclitaxel) ne permet pas d'obtenir d'effet synergique. L'analyse histologique des tumeurs (tumeur spontanée des poumons, KRas/Trp53) montre que les lymphocytes T sont présents dans la périphérie de la tumeur et proche des vaisseaux sanguins. Le traitement par une chimiothérapie immunogène permet le recrutement de ces cellules au cœur de la tumeur. Ce mécanisme est dépendant d'une mort immunogène des cellules tumorales, qui favorise le recrutement et l'activation des cellules dendritiques *via* TLR4 (sécrétion d'HMGB1). La chimiothérapie utilisée module à la hausse également le ratio T-CD8/ T_{Reg} . L'inhibition des T_{Reg} par le cyclophosphamide permet certainement d'amplifier l'effet de l'immunothérapie en limitant l'immunosuppression (Pfirschke *et al*, 2016). Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres chimiothérapies et dans d'autres modèles de cancer. Dans un modèle de mésothéliome, l'association gemcitabine + anti-CTLA4 permet d'induire une infiltration massive de lymphocytes T-CD4 et T-CD8 exprimant le marqueur d'activation ICOS et le marqueur de prolifération Ki67. L'effet thérapeutique de cette association est puissant et permet d'obtenir 50% de régression complète (Lesterhuis *et al*, 2013). Les mécanismes moléculaires à l'origine des effets de cette association ne sont pas décrits dans cette étude. Nous pouvons néanmoins penser que l'utilisation de la gemcitabine permet de limiter l'expansion des cellules myéloïdes immunosuppressives ce qui permet d'éliminer un mécanisme d'immunosuppression supplémentaire avec le blocage de CTLA-4. Des résultats identiques ont été obtenus avec l'association chirurgie/gemcitabine/anti-CD40 (l'anti-CD40 est un anticorps activateur) (Broomfield *et al*, 2005). Des résultats non publiés obtenus au sein de notre laboratoire montrent que l'association anti-PD-

1/5-FU/oxaliplatine permet d'obtenir environ 40% de régression tumorale dans les modèles de cancers coliques MC38 et CT26. Comme pour l'association oxaliplatine/cyclophosphamide, cette combinaison permet d'induire le recrutement de CD8 cytotoxiques producteurs d'IFN γ et exprimant les marqueurs d'activation CD69, CTLA4, PD-1 et Tim-3. Le recrutement de ces cellules passe aussi par l'induction de la mort immunogène qui favorise en retour une réponse spécifique des antigènes tumoraux (AH-1 pour la lignée CT26 et SIINFEKL pour la lignée MC-38-OVA et CT26-OVA). Il est également important de noter que l'utilisation du 5-FU permet de diminuer la présence des cellules myéloïdes immunosuppressives dans la tumeur et la rate. Cependant, comme chez l'homme, et malgré une infiltration intra tumorale en T-CD8 importante, l'efficacité thérapeutique de l'association 5-FU/oxaliplatine reste transitoire. Cet effet est en partie dû au mécanisme de résistance adaptatif à l'immunité que nous avons décrit précédemment. En infiltrant la tumeur, les cellules T-CD8 vont réduire la croissance tumorale par la sécrétion de protéases et de cytokines cytotoxiques (IFN γ). La production d'IFN γ va permettre un ralentissement de la croissance tumorale mais elle va aussi favoriser l'expression de PD-1 et de PD-L1. Ces deux molécules pourront par la suite stopper la réaction immunitaire et permettre à la tumeur d'échapper une nouvelle fois à l'immunosurveillance. Ce processus biologique ouvre la porte à une nouvelle association thérapeutique séquentielle : 5-FU/oxaliplatine puis anti-PD-1 ou anti-PD-L1. Dans le modèle CT26 et MC38, cette stratégie permet d'obtenir des taux de régression significatifs. Alors que la chimiothérapie ou l'immunothérapie utilisée seule ne permettent pas d'en obtenir (Dosset M, en soumission). Ces études précliniques sont encore peu nombreuses et il reste encore beaucoup de travail pour déterminer quelles peuvent être les meilleures combinaisons et les meilleurs schémas d'administration.

Certains essais cliniques sont en cours pour justement évaluer l'efficacité de ces associations. De récentes études chez l'homme montrent que ces stratégies thérapeutiques sont prometteuses. En 2011, l'équipe de Caroline Robert a montré que la combinaison dacarbazine + ipilimumab possède un effet supérieur comparativement au groupe placebo + ipilimumab. La survie globale à 1 an et 2 ans était de 47,3% contre 36,3% et de 28,5% contre 17,9% (Robert *et al*, 2011). L'utilisation de la dacarbazine en association avec un anticorps ciblant les récepteurs inhibiteurs présent à la surface des cellules NK pourrait être également intéressante. En effet, notre équipe a pu montrer que cette chimiothérapie permettait d'induire l'expression des ligands de NKG2D (MICA, MICB, ULBP chez l'homme et RAE1, H60 et MULT1 chez la souris), ce qui sensibilise les cellules tumorales à la lyse induite par les NK. En combinant cet effet à un blocage des récepteurs inhibiteurs (KIR), l'impact thérapeutique pourrait être augmenté (Hervieu *et al*, 2013). Dans le cancer bronchique, l'activité du nivolumab n'est pas la même lorsqu'il est associé aux combinaisons gemcitabine/cisplatine, pemetrexed/cisplatine ou paclitaxel/carboplatine. Les taux de survie à 2 ans indiquent que la

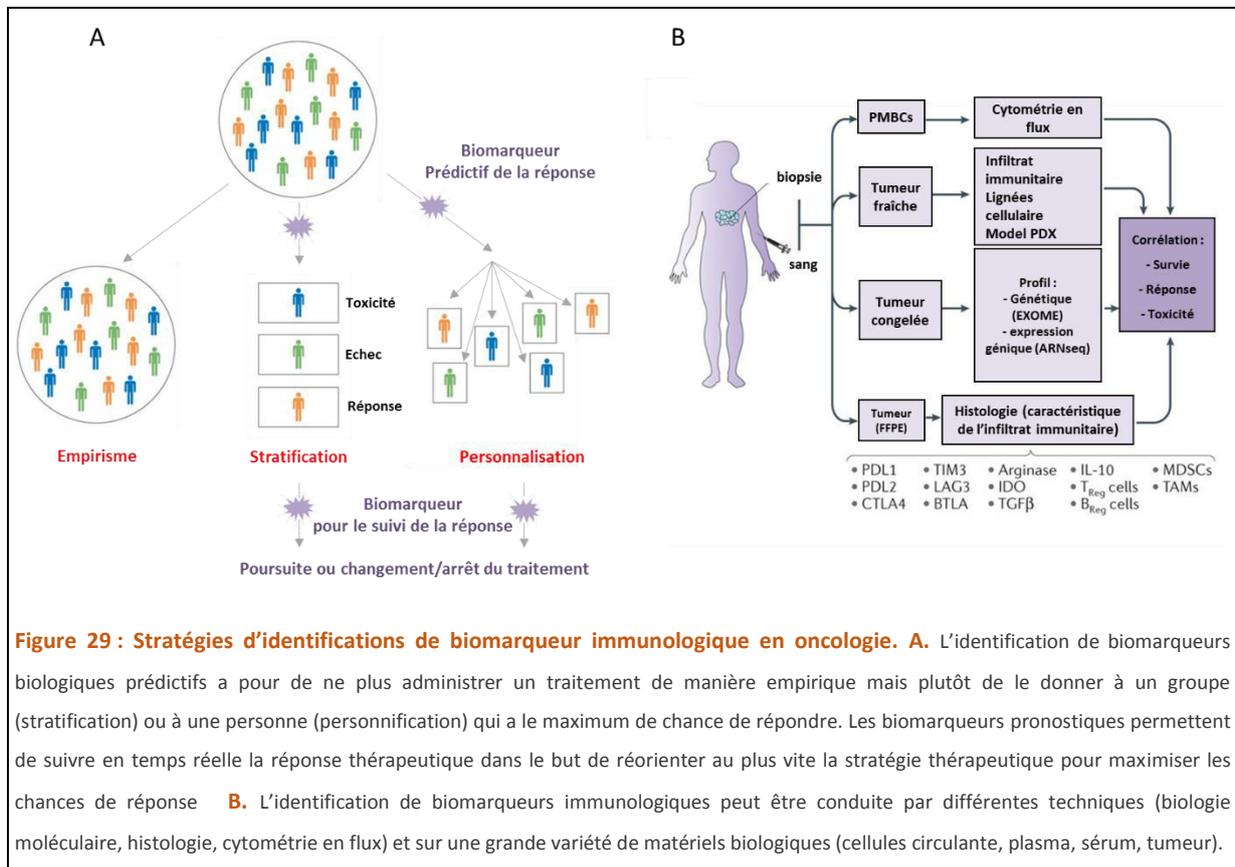
meilleure combinaison est paclitaxel/carboplatine avec 62% de survie contre 25% et 33% dans les groupes gemcitabine/cisplatine et pemetrexed/cisplatine (Rizvi *et al*, 2016). Cette étude n'avait pas pour but d'expliquer pourquoi la combinaison paclitaxel/carboplatine avait un effet plus important que les autres, mais on pourrait penser que l'effet immunogène de cette combinaison est supérieur aux autres.

4. Biomarqueurs immunologiques de réponse thérapeutique

Les parties précédentes ont clairement démontré que le système immunitaire est un acteur majeur, voire indispensable, de l'efficacité des chimiothérapies et des immunothérapies anticancéreuses. Depuis plusieurs années, la prise en charge du cancer n'est plus basée sur la mise en place d'un traitement empirique « X », administré à chaque patient présentant un cancer « Y ». A l'heure actuelle, les stratégies mises en place consistent plutôt à identifier un profil biologique permettant d'identifier un groupe (stratification) ou un individu (personnification) pour lesquels l'efficacité du traitement sera connue avant son administration (profil prédictif). Une fois le traitement débuté, un profil biologique permettant de suivre l'état de réponse ou de non réponse permettra de réorienter le traitement (Figure 29A). Depuis les progrès biotechnologiques réalisés ces dernières années dans les domaines de la biologie moléculaire, de l'analyse tissulaire et cellulaire (histologie multiparamétrique, protéomique, étude des populations cellulaires par cytométrie en flux, ect) il est possible d'identifier à différentes échelles les caractéristiques biologiques des tumeurs, de leur microenvironnement et des modifications périphériques (sang) qu'elles entraînent (Figure 29B). L'exemple le plus parlant attestant de la réussite de cette nouvelle médecine concerne l'analyse de l'activation des oncogènes portés par la tumeur (fusion BCR-ABL, KRAS, BRAF, EGFR, ect) qui permet d'identifier des patients capables de répondre ou non à des thérapies ciblées spécifiquement contre ces protéines. Au cours de la dernière décennie, les biomarqueurs de ces thérapies ciblées ont été très importants et ils ont permis non seulement de mieux sélectionner les patients mais aussi de mieux comprendre les mécanismes de toxicité ou de résistance au traitement. L'identification et le suivi de biomarqueurs immunologiques par immunomonitoring sont à l'heure actuelle très étudiés. L'état originel et l'évolution de la réponse immunitaire peut conduire à un échec ou à une réussite de l'immunothérapie et des traitements ciblant directement la tumeur qui ont besoin de l'immunité pour être efficace. On comprend dès lors que l'identification de marqueurs tumoraux ou immunologiques témoignant d'une (in)sensibilité de la tumeur au système immunitaire est cruciale.

Marqueurs tissulaires de réponse à la chimiothérapie et à l'immunothérapie

La caractérisation du microenvironnement tumoral qui à l'heure actuelle est la plus complète chez l'homme, a été réalisée dans le cancer colorectal. Le bon pronostic des patients est fortement corrélé à l'expression de gènes associés à une réponse immunitaire de type 1 (gènes liés à la présentation des antigènes, à la signalisation du TCR et à l'IFN γ , ou encore associés à la fonction cytotoxique des lymphocytes T).



L'expression de ces gènes est corrélée à l'infiltration de lymphocytes T effecteurs mémoires (CD45RO⁺ CCR7⁻ CD28⁺ CD27⁺) au niveau du stroma tumoral (analyse par immunohistochimie) (Pages *et al*, 2005). La présence de ces cellules au sein de la tumeur est également liée à une forte expression de chimiokines telles que CX3CL1 (fractalkine) qui favorise l'attraction des Th1 et CXCL10/CXCL9 qui favorisent la migration des cellules CD45RO⁺ (Mlecnik *et al*, 2010). Les études prospectives réalisées montrent que la classification des cancers colorectaux selon des critères immunologiques permet d'identifier plus finement les patients qui présenteront une rechute que les critères de la classification de Duke ou de l'UICC-TNM (Union for Internationale Cancer Control-Tumor Node Metastasis) (Galon *et al*, 2006; Ogino *et al*, 2009). D'autres études ont pu être menées dans divers types de cancers et des résultats similaires à ceux observés dans le cancer colorectal ont pu être obtenus (cancer du sein, du poumon, de l'ovaire, du mélanome et du foie) (Dieu-Nosjean *et al*, 2008; Hiraoka *et al*, 2006; Rody *et al*, 2009).

La question qui se pose alors est, est-ce que cet infiltrat immunitaire influence positivement la réponse à la chimiothérapie et à l'immunothérapie ? Plusieurs études permettent de répondre à cette question par l'affirmative. Dans le cancer du sein, traité par chimiothérapie néoadjuvante (taxane et anthracycline), la présence de lymphocytes T mémoires (CD45RO⁺) et de cellules dendritiques matures au sein de la biopsie initiale prédit d'une réponse thérapeutique forte (Denkert *et al*, 2010). Dans la même idée, l'analyse du ratio CD8/ T_{Reg} (CD4⁺ Foxp3⁺) permet d'identifier les patientes qui rechuteront rapidement après chimiothérapie (Ladoire *et al*, 2008; Ladoire *et al*, 2011). Des observations similaires ont pu être faites dans le cancer de l'ovaire traité par une chimiothérapie à base d'un sel de platine. La présence initiale de cellules CD3⁺ CD56⁺ et l'absence de cellules CD4⁺ CD25⁺ (T_{Reg}) prédit d'une réponse thérapeutique favorable (Bamias *et al*, 2008). La présence initiale de cellules immunitaires de type 1 dans la tumeur au moment du diagnostic témoigne qu'il existe une réponse immunitaire anti-tumorale en place. Si l'absence de cellules T mémoires dans la tumeur est de mauvais pronostic, l'utilisation d'une chimiothérapie immunogène (anthracycline, oxaliplatine) pourrait permettre de restaurer une réponse initialement absente. En effet, l'analyse histologique des marqueurs de la mort immunogène chez les patientes porteuses d'un cancer du sein (traitées par anthracycline) montrent que la présence d'un marquage p62 et de LC3 ponctué (autophagie) ainsi que l'absence de marquage nucléaire d'HMGB1 est de bon pronostic (Ladoire *et al*, 2016). Des observations similaires ont pu être réalisées dans le cancer du côlon métastatique. L'infiltration en cellules T-CD3⁺, T-CD8⁺ et l'expression du granzyme B prédit d'une bonne réponse à la chimiothérapie (Halama *et al*, 2011 et données non publiées de notre équipe). De plus, l'administration de chimiothérapie à base de 5-FU et d'oxaliplatine au niveau de la cavité péritonéale permet le recrutement des cellules immunitaires par l'intermédiaire du relargage d'HMGB1, ce qui favorise la régression tumorale (Cottone *et al*, 2015).

La réponse immunitaire *in situ* est également un facteur important de la réponse à l'immunothérapie. Dans le cadre des traitements ciblant la voie PD-1/PD-L1, l'évaluation de l'expression tumorale de PD-L1 (mélanome, poumons) par immunohistochimie (IHC) a montré que cette analyse pouvait être intéressante et permettre d'identifier les patients capables de recevoir un bénéfice clinique. L'expression de PD-L1 à la surface des cellules immunitaires présentes au niveau de la marge d'invasion est également fortement corrélée à une meilleure réponse en particulier si cette expression est associée à une infiltration importante en cellules CD8⁺ (Herbst *et al*, 2014; Tumei *et al*, 2014). Néanmoins, de nombreuses questions restent en suspens concernant l'IHC de PD-L1. Ainsi, plusieurs anticorps anti-PD-L1 ont été testés sans permettre de définir le meilleur anticorps. De plus, le seuil de positivité reste variable d'une étude à une autre et inclut parfois les cellules tumorales ou celles du microenvironnement tumoral. De plus, l'IHC sur biopsie pose

également le problème de l'hétérogénéité temporo-spatiale de l'expression de PD-L1. En effet, l'expression de PD-L1 varie dans le temps et peut être modifiée par les traitements chimiothérapeutiques mis en place en 1^{ière} intention (Sheng *et al*, 2016) Or, dans la plupart des essais thérapeutiques, la biopsie utilisée pour l'IHC PD-L1 est celle obtenue au moment du diagnostic de la maladie ce qui n'est pas forcément représentatif du niveau d'expression de PD-L1 au moment de la mise sous immunothérapie. Cette question devrait être résolue par la remontée en première ligne de certains anticorps ciblant PD-1 ou PD-L1. Il existe néanmoins le problème de l'hétérogénéité spatiale de l'expression de PD-L1 au sein de la tumeur. Ce phénomène est à l'origine d'une vision très parcellaire de la réalité, lorsque l'évaluation est réalisée sur une biopsie (Ilie *et al*, 2016). Enfin, PD-L2, un autre ligand de PD-1 qui a été moins étudié jusqu'à présent, semble également exprimé à la surface des cellules tumorales et pourrait aussi influencer la réponse aux anti-PD-1 (Kim *et al*, 2015a; Kim *et al*, 2015b). Concernant cette fois le rôle prédictif du profil moléculaire dans la réponse à l'immunothérapie, l'étude POPLAR, comparant un anti-PD-L1 au docétaxel dans le cancer bronchique non à petites cellules avancé et métastatique ayant progressé après chimiothérapie, a montré qu'il était possible de discriminer les patients répondeurs à l'anti-PD-L1 en analysant avant traitement l'expression de gènes associés à une réponse cytotoxique (*CD8A*, *GZMA*, *GZMB*, *IFN γ* , *EOMES*, *CXCL9*, *CXCL10*, *Tbx21*, *PD-L1*, *PD-L2*, et *PD-1*). Les patients qui présentaient une forte expression de ce panel métagénique ont eu un bénéfice thérapeutique supérieur de l'anti-PD-L1 en terme de survie globale, ce qui n'était pas le cas des patients ayant reçu du docétaxel (Fehrenbacher *et al*, 2016). Dans le mélanome, l'expression avant traitement des gènes associés à la réponse Th1, du CTLA4 et une faible quantité de *CX3CL1* est associée à une meilleure réponse aux anti-PD-L1 (Herbst *et al*, 2014). Ces analyses montrent que la présence au sein de la tumeur d'une réponse immunitaire préexistante est impliquée dans l'efficacité de l'immunothérapie par anticorps inhibiteurs. C'est ce qui révèle également l'observation d'une meilleure réponse clinique chez les patients présentant une diversité du TCR plus importante (Tumeh *et al*, 2014). Cette diversité implique le statut propre du système immunitaire et sa capacité à induire la prolifération d'une multitude de clones anti-tumoraux mais elle dépend aussi du statut mutationnel des tumeurs. Ce statut mutationnel pourrait constituer un biomarqueur prédictif de l'efficacité aux nouvelles immunothérapies. Lors du développement tumoral, les cellules cancéreuses acquièrent plus ou moins de mutations somatiques au sein de leur génome. Ces altérations génétiques peuvent conduire à l'expression de protéines anormales, propres aux cellules cancéreuses, et constituant des néo-épitopes pouvant être identifiés par le système immunitaire du patient, et servir de support à l'initiation d'une réponse T cytotoxique anti-tumorale. Néanmoins, toutes les tumeurs ne présentent pas la même charge mutationnelle, et par voie de conséquence, elles n'ont pas toutes la même capacité à stimuler une réaction immunitaire

(immunogénicité). Ainsi, l'équipe du Dr. Rizvi a montré que la réponse au pembrolizumab (anti-PD-1) était associée au nombre de mutations et de néoantigènes retrouvés dans diverses tumeurs solides (Rizvi *et al*, 2015). Ces résultats ont également été validés dans une série de mélanomes traités par ipilimumab, un anticorps anti-CTLA-4, permettant potentiellement de généraliser le concept pour l'ensemble des immunothérapies ciblant la synapse immunologique.

Marqueurs périphériques de réponse à la chimiothérapie et à l'immunothérapie

L'analyse du profil immunologique périphérique comprend différents aspects :

- ✓ Numération des sous-populations leucocytaires
- ✓ Caractérisations phénotypique et fonctionnelle des populations leucocytaires
- ✓ Analyse de la réponse lymphocytaire spécifique d'un antigène
- ✓ Analyse du profil cytokinique et chimiokinique

L'étude de la réponse immunitaire périphérique est confrontée à la question de sa capacité réelle à refléter l'état de la réponse immunitaire au sein de la tumeur. Néanmoins, dans le cas de cancers disséminés, il est aussi légitime de se poser la question de la supériorité d'une analyse tissulaire d'un site métastatique, qui n'est pas non plus le reflet de la réponse présente au sein d'un autre site ou de la tumeur primitive. En effet, ces différents sites peuvent avoir une clonalité différente, une immunogénicité propres et par conséquent une infiltration immunologique différentes. Le profil périphérique offre, dans ce cas, la possibilité d'appréhender dans sa globalité l'état du système immunitaire. La caractérisation du profil périphérique offre aussi l'avantage d'être facilement réalisable (prélèvement sanguin) et peu coûteux (pas d'hospitalisation, test simple). La difficulté actuelle qui freine la découverte de biomarqueurs thérapeutiques circulants réside dans la mise en œuvre technique des analyses. Elles ne sont pas standardisées d'un laboratoire à l'autre et l'identification phénotypique des populations n'est pas normalisée. Il n'existe donc pour le moment aucun marqueur sanguin reconnu, associé à la réponse thérapeutique des chimiothérapies et des immunothérapies. Ces analyses n'ont donc à l'heure actuelle « qu'un » but cognitif qui peut servir à générer de nouvelles hypothèses de travail.

De nombreuses études prospectives et rétrospectives ont néanmoins pu mettre en évidence un lien entre la réponse immunitaire périphérique et l'efficacité thérapeutique des chimiothérapies et des immunothérapies. Dans le cancer colorectal métastatique, une étude publiée en 2016 a montré que le statut immunologique périphérique (analyse sur PBMC) avant chimiothérapie (FOLFOX (n=4), FOLFOX + bevacizumab (n=21) et XELOX (n=15) ; FOLFOX = 5-FU + oxaliplatine + leucovorine ; XELOX = capecitabine + oxaliplatine) est corrélé à la réponse clinique. L'analyse de 25 variables immunologiques a montré qu'un faible taux de lymphocytes T-CD4⁺ et T-CD8⁺ effecteurs

mémoires et qu'un taux élevé de cellules myéloïdes immunosuppressives de type monocytaire sont associés à une plus faible survie sans progression. Les auteurs de cette étude ont également analysé l'évolution sous chimiothérapie des paramètres immunologiques et ils n'ont pas observé de différences significatives (Tada *et al*, 2016). Une autre étude cherchant là encore à évaluer l'impact du profil immunitaire sanguin (analyse sur PBMC) d'une chimiothérapie (FOLFIRI (5-FU + irinotecan + leco-leucovorine) + bevacizumab) utilisé en première ligne de traitement du cancer colorectal a montré qu'une augmentation du ratio lymphocytes T-CD4⁺ totaux/lymphocytes T_{Reg} était associé à un meilleur pronostic clinique (Roselli *et al*, 2016). Dans l'adénocarcinome pancréatique, les auteurs de l'étude CapRI ont analysé le profil immunologique (sur sang total) avant traitement chez des malades allant recevoir une chimiothérapie (5-FU) ou une chimioradioimmunothérapie (5-FU + radiothérapie + IFN α). Les résultats montrent qu'un taux élevé en lymphocytes T-CD8 effecteurs terminaux (CCR7⁺ CD45RA⁺) est un bon facteur prédictif et pronostique. Ces cellules ont une capacité de prolifération limitée mais elles possèdent des propriétés anti-tumorales importantes. Un pourcentage élevé de T-CD8 naïfs (CCR7⁺ CD45RA⁺) prédit d'une augmentation de la survie uniquement chez les patients traités par la triple combinaison. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la combinaison 5-FU/radiothérapie allait favoriser la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique des antigènes tumoraux (dépendante des T-CD8 naïfs) et que l'IFN α pouvait favoriser leur maturation en cellules effectrices aux propriétés anti-tumorales (CCR7⁺ CD45RA⁻). Il est cependant important de noter qu'un taux préalablement élevé en cellules effectrices prédit d'une mauvaise réponse thérapeutique ce qui peut amener à penser que ces cellules ne sont pas attirées au sein de la tumeur pour y exercer leur fonction et qu'elles sont retenues en périphérie par un mécanisme inexpliqué (chute de la production de chimiokines, perte de l'expression des récepteurs aux chimiokines...). Cette hypothèse semble logique et est appuyée par une autre observation qui montre qu'un taux sanguin élevé en cellules CD4⁺ CTLA-4⁺ est associé à un bon pronostic. La majorité des cellules T-CD4⁺ CTLA-4⁺ sont des cellules régulatrices. Leur augmentation en périphérie pourrait signifier qu'elles ne s'accumulent pas dans la tumeur et donc qu'elles ne peuvent pas y exercer un rôle immunosuppresseur (Karakhanova *et al*, 2015). Dans le cancer bronchique non à petites cellules, le taux périphérique de cellules myéloïdes immunosuppressives de type monocytaire est associé au stade de la maladie et à la réponse au traitement (Huang *et al*, 2013). Une étude récemment publiée a montré que la chimiothérapie de première ligne associée au bevacizumab permettait de réduire le nombre de cellules myéloïdes immunosuppressives et que cette chute est associée à une réponse thérapeutique (Koinis *et al*, 2016). Dans le cancer du sein HER2 positif, le taux de lymphocytes T régulateurs circulant est un signe prédictif de non réponse à la chimiothérapie. Après traitement par le trastuzumab, la chute de ces cellules est associée à un pronostic favorable (Perez *et al*, 2007).

Le rôle prédictif et pronostique du profil immunologique périphérique est aussi très étudié chez les patients traités par immunothérapie. Dans une récente méta-analyse, il a pu être montré qu'un ratio neutrophile/lymphocyte (NLR) supérieur à 4 est associé à une survie globale plus importante dans les cancers solides avant traitement par ipilimumab. Cette observation a pu être confirmée dans le mélanome métastatique (Friedman F et al, 2016). Dans une autre étude chez des malades atteints d'un mélanome avancé traité par ipilimumab, il a pu être montré que l'augmentation du nombre absolue de lymphocytes totaux (NAL) et une baisse des lymphocytes régulateurs entre le début et la douzième semaine de traitement étaient associés à une meilleure survie (Simeone *et al*, 2014). Dans la même idée, les patients présentant un NAL supérieur à 1000 cellules/ μ L au moment de la deuxième cure d'ipilimumab présente une médiane de survie de 11,1 mois contre 4,8 pour ceux présentant un NAL inférieur (Ku *et al*, 2010). Le NAL est également associé à la réponse aux anti-PD-1 (nivolumab) (Johnson *et al*, 2015 ; Callahan MK, ASCO Meeting Abstract, 2013). Concernant l'évolution de la réponse lymphocytaire spécifique des antigènes tumoraux, il a pu être montré que la présence d'anticorps et de lymphocytes T spécifiques du peptide NY-ESO-1 est associée à une meilleure réponse à l'ipilimumab et au nivolumab (Yuan *et al*, 2008). Dans une large cohorte de patients porteurs de mélanome métastatique, 22 présentaient une séropositivité pour NY-ESO-1 avant traitement par ipilimumab, 34 après traitement et 78 étaient séronégatifs. L'analyse de la survie globale de cette cohorte a permis de montrer que la présence d'une réponse anti-NY-ESO-1 était fortement associée à une meilleure réponse thérapeutique (Yuang J *et al*, 2011). Dans deux autres études (mélanome et cancer de la vessie), le traitement par ipilimumab ne favorise pas d'augmentation du NAL mais il permet d'induire une activation lymphocytaire, en témoigne l'augmentation de l'expression des marqueurs ICOS, HLA-DR et Ki67 par les lymphocytes circulants. Par ailleurs, un niveau préalablement élevé en cellules myéloïdes immunosuppressives est associé à un plus faible taux de réponse objective (Callahan & Wolchok, 2013; Liakou *et al*, 2008). Sur une cohorte de 94 patients porteurs de mélanome métastatique, un taux initial élevé en cellules myéloïdes immunosuppressives est associé à une plus courte durée de vie (8 mois *versus* 13). Les auteurs de l'étude ont montré qu'il existe une corrélation inverse entre le taux de MDSC et celui des lymphocytes T spécifiques du peptide NY-ESO-1 (Weide *et al*, 2012). Chez les patients atteints de mélanome métastatique et traités de manière néoadjuvante par l'ipilimumab, la chute du taux en cellules MDSC est associée à une bonne réponse (Meyer *et al*, 2014; Tarhini *et al*, 2014). De la même manière, chez les patients traités par une double immunothérapie (anti-CTLA4 et anti-PD-1), un taux circulant initialement faible en MDSC est fortement associé à une moins bonne réponse (Callahan & Wolchok, 2013).

D'autres équipes se sont intéressées au rôle prédictif de la diversité et de la clonalité du TCR dans la réponse à l'immunothérapie. L'équipe de Ribas a pu montrer que l'immunothérapie par anti-CTLA4 permet d'élargir le répertoire du TCR au sein des cellules T circulantes. Néanmoins, cette augmentation n'est pas liée à la réponse thérapeutique (Robert *et al*, 2014). Une autre étude a montré que c'est la maintenance de la diversité de ce TCR qui permet d'identifier la réponse aux anti-CTLA4. Cette observation indique clairement que l'immunothérapie est efficace à la condition qu'il existe une réponse polyclonale contre la tumeur avant traitement (Cha *et al*, 2014).

Objectifs des travaux de thèse

Nous avons pu voir dans l'introduction que l'échappement tumoral à l'immunosurveillance implique différents facteurs comme la perte de l'immunogénicité des cellules cancéreuses, l'immunosuppression et l'angiogenèse induite par les lymphocytes T régulateurs (T_{Reg}) et/ou les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC) ou encore l'expression de récepteurs inhibiteurs à la surface des lymphocytes effecteurs (PD-1, Tim-3, CTLA4). Nous savons depuis plusieurs années que ces mécanismes d'échappement peuvent être modulés par différentes approches thérapeutiques et en particulier les chimiothérapies. Un des objectifs de notre équipe est donc de mieux comprendre le rôle immunologique de ces agents afin d'identifier de nouvelles associations thérapeutiques avec l'immunothérapie.

L'équipe a pu mettre en évidence un rôle ambivalent du 5-fluorouracile (5-FU) qui induit sélectivement la mort des MDSC, ce qui, transitoirement, permet la restauration d'une réponse anti-tumorale dépendante des $T-CD8^+$ (Vincent *et al*, 2010). Le mécanisme moléculaire à l'origine de cette cytotoxicité implique l'activation de la caspase-1 par l'inflammasome NLRP3. Néanmoins, cette activation favorise la sécrétion d'IL-1 β , qui accentue les propriétés pro-angiogéniques des lymphocytes Th17 et par voie de conséquence accélère le processus d'échappement (Bruchard *et al*, 2013). Ces observations se sont poursuivies par mon premier objectif de thèse, celui d'étudier l'impact d'une première ligne de traitement par FOLFOX-bevacizumab (5-FU + oxaliplatine + anti-VEGF : FOLFOX-bevacizumab) sur le profil immunologique périphérique d'une cohorte prospective de cancer colorectal métastatique (g- et mMDSC/sous-types Thelper). Nous avons pu mettre en évidence que cette association thérapeutique pouvait chez certains malades moduler ce profil (MDSC et Th17) et que cette modulation est intimement liée à la réponse thérapeutique. Ce travail avait également pour objectif de mieux caractériser les cellules MDSC circulantes afin de comprendre les mécanismes périphériques d'immunosuppression qu'elles occasionnent (Limagne *et al*, 2016a).

Le projet suivant s'est inscrit dans la poursuite des travaux menés au sein de l'équipe sur la mise en évidence de cibles pharmacologiques permettant d'inhiber la polarisation des lymphocytes Th17. L'équipe a pu montrer que les Th17 murins différenciés en présence d'IL-6 et de TGF- β exprimaient les enzymes CD39 et CD73, qui leur confère *in vivo* des propriétés immunosuppressives (Chalmin *et al*, 2012). Un peu plus tard, l'étude des effets immunologiques de l'acide docosahexénoïque (DHA) a montré que l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ permettait d'inhiber la polarisation des Th17 (Berger *et al*, 2013). Pour ma part, l'objectif a été d'étudier le rôle

d'une activation pharmacologique de la désacétylase SIRT1 sur la polarisation des lymphocytes Th17 *in vitro* et *in vivo* et d'évaluer son potentiel thérapeutique chez la souris. Nous avons aussi cherché à identifier *ex vivo* chez l'homme l'impact d'une tel activation afin de proposer l'utilisation d'agents thérapeutiques capables de limiter la différenciation des Th17 dans un contexte de cancer. (Limagne E *et al*, soumis).

Enfin, dans un dernier temps, nous avons réalisé un suivi du profil immunologique périphérique élargi (Thelper, T_{Reg}, T-CD8⁺, NK, cellules myéloïdes) sur une cohorte prospective de cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) de stade IIIb/IV, traités en deuxième ou troisième ligne de traitement par un anti-PD-1 (nivolumab). En parallèle de cette cohorte, une cohorte des volontaires sains a également pu être générée. Nous avons eu pour objectif premier l'analyse des différences immunologiques périphériques entre les volontaires sains et les CBNPC. Le taux de réponse objective au nivolumab reste relativement faible dans le cancer bronchique (environ 20%). Nous avons donc dans un second temps cherché à établir un profil prédictif de réponse à 6 mois sur la base du profil immunologique établi au moment de la mise sous anti-PD-1. Le profil qui sera présenté dans la dernière partie des résultats est préliminaire. Il nous a néanmoins permis d'émettre certaines hypothèses liées aux mécanismes de résistances à l'anti-PD-1. A terme, nous espérons que ce travail permettra une meilleure compréhension des mécanismes immunologiques impliqués dans la réponse ou la résistance à l'immunothérapie par anti-PD-1.

RESULTATS

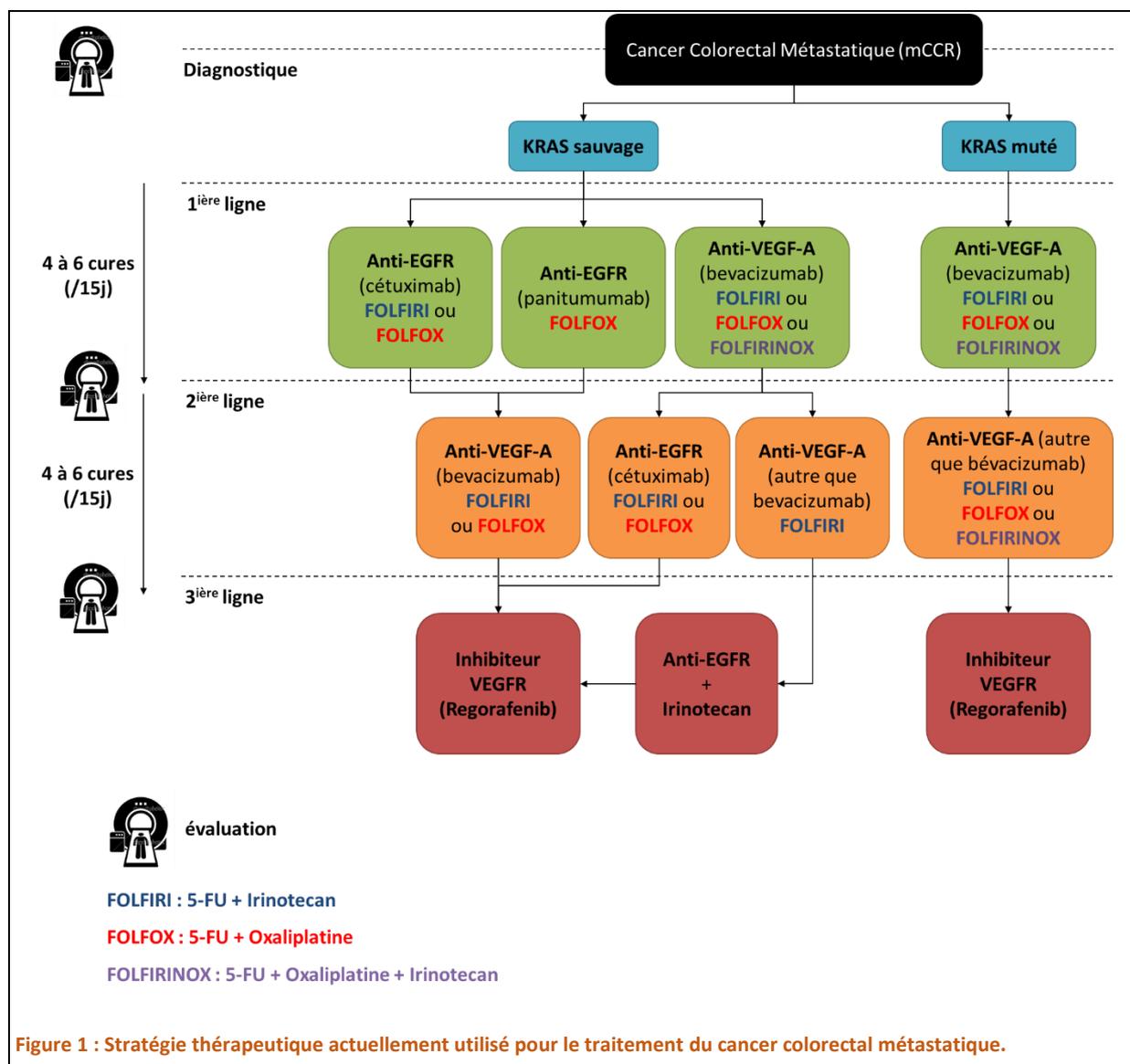
PROJET 1

Accumulation of MDSC and Th17 cells in patients with metastatic colorectal cancer predict the efficacy of a FOLFOX-bevacizumab drug treatment regimen

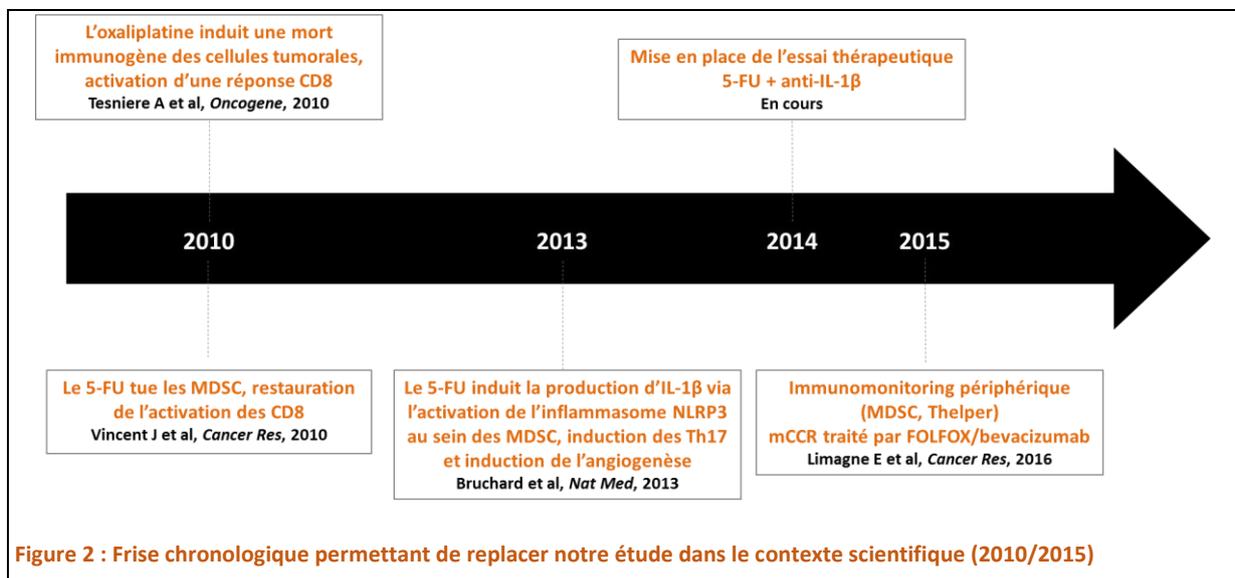
La prise en charge du cancer colorectal métastatique (mCCR) non opérable fait appel à l'heure actuelle à l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques, de thérapies ciblées (anti-VEGF-A ou anti-EGFR) et d'inhibiteurs de kinase (VEGFR, EGFR) (Figure 1).

Le schéma thérapeutique choisi dépendra de différents points :

- ✓ L'état général du patient (état de la fonction cardiaque, hépatique et rénale, bilan hématologique)
- ✓ Les facteurs prédictifs de l'évolution de la maladie (LDH et phosphatases alcalines normales, nombre de site métastatique, tumeur non symptomatique)
- ✓ Les caractéristiques moléculaires de la tumeur (mutation *KRAS*, *BRAF*)



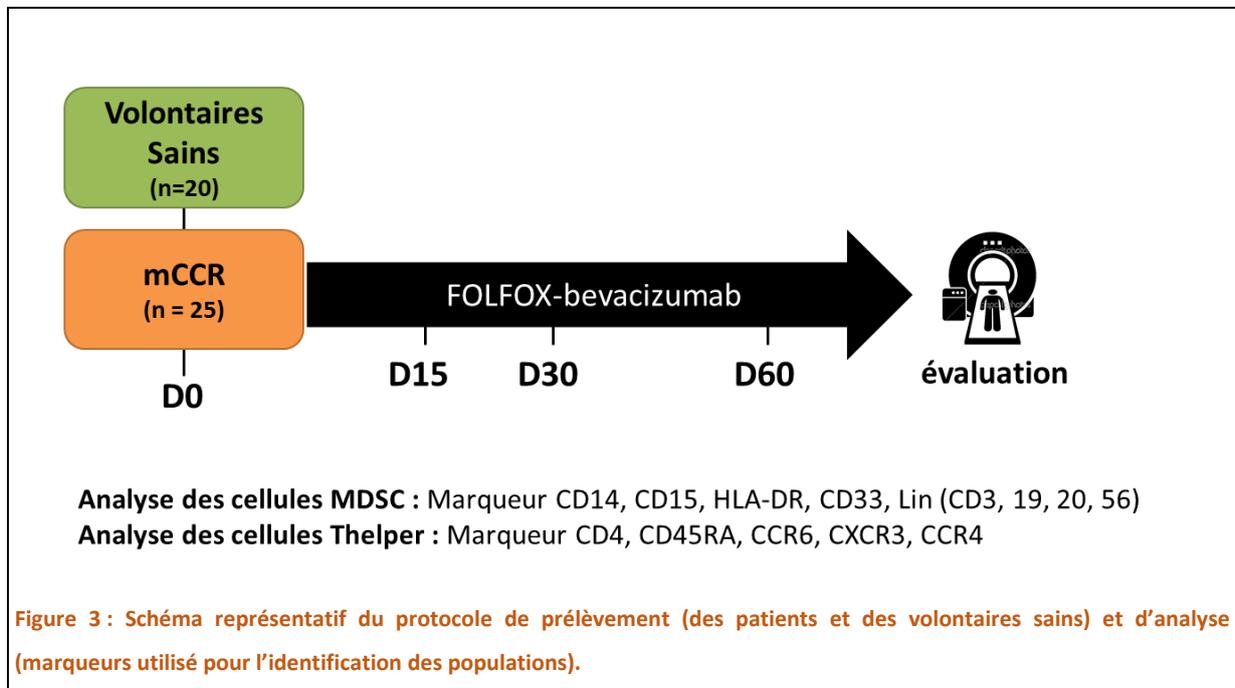
Les drogues de chimiothérapie utilisées dans le traitement du cancer ont été décrites comme ayant un impact sur la réponse immunitaire anti-tumorale. Comme nous l'avons vu en introduction, le 5-FU est capable de réduire la quantité de cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC) présentes dans la tumeur, les organes lymphoïdes ou le sang dans plusieurs types de cancers chez la souris (Vincent *et al*, 2010). L'oxaliplatine permet quant à lui d'induire une mort cellulaire immunogène capable de stimuler la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique de la tumeur (Pfirschke *et al*, 2016 ; Dosset *et al*, soumis). En jouant sur deux paramètres d'instincts de l'immunité, la combinaison de ces deux molécules chez l'homme (FOLFOX) pourrait expliquer son efficacité thérapeutique. Par ailleurs, l'utilisation d'un anti-angiogénique (anti-VEGF-A, bevacizumab) décrit comme capable de limiter l'expansion des MDSC pourrait permettre d'augmenter l'efficacité du FOLFOX chez l'homme (Horikawa *et al*, 2016). Ces chimiothérapies peuvent néanmoins avoir un effet ambivalent sur la progression tumorale. C'est particulièrement le cas du 5-FU qui, de par son effet cytotoxique sur les MDSC, provoque une recrudescence des Th17. Cet effet sur les Th17 est lié à la production d'IL-1 β *via* l'activation de l'inflammasome NLRP3 au sein des MDSC (Bruchard *et al*, 2013). Suite à ces différentes observations, un essai clinique de phase 1b ayant pour but d'évaluer l'efficacité thérapeutique d'un anti-IL-1 β associé à une chimiothérapie à base de 5-FU a été mis en place à Dijon (NCT02090101) (Figure 2).



A l'heure actuelle, aucune donnée de la littérature n'indiquent si la combinaison FOLFOX-bevacizumab permet d'induire des modifications immunologiques chez l'homme et si ses modifications modulent la réponse au traitement.

Pour répondre à cette question, nous avons dans un premier temps comparé le profil immunitaire périphérique de 25 patients atteints de mCCR (au moment du diagnostic) à 20 volontaires sains. Cette première analyse nous a permis de mettre en évidence les populations

associées au cancer et de lier ces modifications à la réponse thérapeutique. Dans un second temps, nous avons réalisé le suivi des patients au cours de leur traitement de première ligne et étudié l'impact pronostic des modifications immunologiques induites par la chimiothérapie (Figure 3). Enfin, nous avons également entrepris de caractériser phénotypiquement (expression des récepteurs inhibiteurs) et fonctionnellement (activité immunosuppressive) les MDSC chez l'homme.



Accumulation of MDSC and Th17 Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Predicts the Efficacy of a FOLFOX–Bevacizumab Drug Treatment Regimen

Emeric Limagne^{1,2,3,4}, Romain Euvrard^{1,2}, Marion Thibaudin^{1,2}, Cédric Rébé^{1,2,3,4}, Valentin Derangère^{1,2,3,4}, Angélique Chevriaux^{1,2,3,4}, Romain Boidot^{1,2,3,4}, Frédérique Végran^{1,2,3,4}, Nathalie Bonnefoy^{5,6,7}, Julie Vincent³, Leila Bengrine-Lefevre³, Sylvain Ladoire^{1,2,3,4}, Dominique Delmas^{1,2}, Lionel Apetoh^{1,2,3}, and François Ghiringhelli^{1,2,3,4}

Abstract

Host immunity controls the development of colorectal cancer, and chemotherapy used to treat colorectal cancer is likely to recruit the host immune system at some level. Although pre-clinical studies have argued that colorectal cancer drugs, such as 5-fluorouracil (5-FU) and oxaliplatin, exert such effects, their combination as employed in the oncology clinic has not been evaluated. Here, we report the results of prospective immunomonitoring of 25 metastatic colorectal cancer (mCRC) patients treated with a first-line combination regimen of 5-FU, oxaliplatin, and bevacizumab (FOLFOX–bevacizumab), as compared with 20 healthy volunteers. Before this therapy was initiated, T regulatory cells (Treg), Th17, and granulocytic myeloid-derived suppressor cells (gMDSC) were increased significantly in mCRC, but only a high level of gMDSC was associated with a poor prognosis. Chemotherapy modulated

the Treg/Th17 balance by decreasing Treg and increasing Th17 cell frequency by 15 days after the start of treatment. Increased Th17 frequency was associated with a poor prognosis. FOLFOX–bevacizumab treatment elicited a decrease in gMDSC in 15 of 25 patients and was associated with a better survival outcome. Notably, the gMDSCs that expressed high levels of PD-L1, CD39, and CD73 exerted a robust immunosuppressive activity, relative to other myeloid cells present in blood, which could be reversed by blocking the CD39/CD73 and PD-1/PD-L1 axes. Our work underscores the critical prognostic impact of early modifications in Th17 and gMDSC frequency in mCRC. Furthermore, it provides a clinical rationale to combine FOLFOX–bevacizumab chemotherapy with inhibitors of ATP ectonucleotidases and/or anti-PD-1/PD-L1 antibodies to more effectively treat this disease. *Cancer Res*; 76(18); 5241–52. ©2016 AACR.

Introduction

Colorectal cancer is the fourth most commonly diagnosed cancer worldwide and is a major cause of cancer-related deaths. Numerous studies have demonstrated a link between chronic inflammation and many cancers, including colorectal cancer. For example, inflammatory bowel disease is associated with increased

incidence of colorectal cancer (1). Colorectal cancer is controlled by the immune system: Accumulating evidence shows that T-cell infiltration of primary tumors is associated with better prognosis (2, 3). Similar findings were also observed in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC; ref. 4). In particular, infiltration with memory CD8 T cells, follicular helper T cells, or regulatory T cells (Treg) is associated with better tumor prognosis in colorectal cancer (5–7). However, infiltration with Th17 cells is associated with poor prognosis (8) due to the secretion of proinflammatory cytokines like IL17A, which can promote angiogenesis or other protumor effects (9).

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) are a heterogeneous population composed of myeloid cells blocked at several stages of differentiation. These cells were observed to accumulate in the blood, lymph nodes, bone marrow, and tumor sites of tumor-bearing patients and in experimental animal models of cancer (10, 11). These cells are characterized by their ability to inhibit both innate and adaptive immune responses, thus having a negative effect on antitumor immunity (12). In humans, MDSCs are not well characterized, partially because no unified markers are currently available for these cells. However, these cells typically express the common myeloid markers, CD33 and CD11b, but lack markers of mature myeloid cells, such as HLA-DR. Among human MDSCs, the monocytic subset comprises CD14⁺ cells, and

¹INSERM, U866, Dijon, France. ²UFR des Sciences de Santé, Université de Bourgogne-Franche Comté, Dijon, France. ³Centre Georges François Leclerc, Dijon, France. ⁴Plateforme de Transfert en Biologie Cancérologique, CGFL, Dijon, France. ⁵Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, France. ⁶INSERM U1194, Université de Montpellier, Montpellier, France. ⁷OREGA Biotech, Ecully, France.

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

E. Limagne and R. Euvrard share first authorship of this article.

L. Apetoh and F. Ghiringhelli share senior authorship of this article.

Corresponding Authors: Emeric Limagne, Centre Georges-François Leclerc, 1 rue du Pr Marion, Dijon 21000, France. Phone: 038-039-3383; Fax: 038-039-3434; E-mail: elimagne@cgfl.fr; and François Ghiringhelli, fghiringhelli@cgfl.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3164

©2016 American Association for Cancer Research.

the granulocytic subset comprises CD15⁺ cells (13, 14). We previously reported that 5-fluorouracil (5-FU) could induce MDSC depletion in mouse models of cancer (15) but enhance Th17 cell accumulation (15, 16).

Currently, mCRC patients are frequently treated in front line with a combination of chemotherapies, which associates 5-FU with either oxaliplatin (FOLFOX) or irinotecan (FOLFIRI). In addition to the chemotherapeutic regimens, patients are often treated with biotherapies, such as antiangiogenic agents like the anti-VEGF mAb bevacizumab or anti-EGFR mAb. The effect of such combination chemotherapies on peripheral immune responses is currently poorly explored. In addition, the prognostic value of initial immune parameters and their putative alteration by chemotherapy is also unknown.

In this work, we have first compared blood repartition of memory T-helper cells and MDSC [granulocytic MDSC (gMDSC) and monocytic MDSC (mMDSC)] subsets in 20 healthy volunteers versus 25 consecutive mCRCs treated with FOLFOX plus bevacizumab combination as first line and tested the association of immune parameters with patients' outcome.

Patients and Methods

Patients and healthy donors

Between January 2014 and October 2014, we collected whole blood from healthy volunteers ($n = 20$) and mCRC patients ($n = 25$) at the Centre Georges François Leclerc (Dijon, France). mCRC patients were diagnosed in our cancer center and were proposed to be treated with FOLFOX plus bevacizumab as a first-line regimen. FOLFOX regimen was given every 14 days as follows: oxaliplatin (85 mg/m² over 2 hours), leucovorin (400 mg/m² over 2 hours), and 5-FU (400 mg/m² bolus, then 2,400 mg/m² over 46 hours). Bevacizumab was given at a dose of 5 mg/kg once every 2 weeks.

After 12 cycles or sooner in case of toxicity, responder patients received a maintenance treatment with bevacizumab, leucovorin (400 mg/m² over 2 hours), and 5-FU (400 mg/m² bolus, then 2,400 mg/m² over 46 hours every 2 weeks). All patients must have received at least four cycles of chemotherapy to be evaluable. Tumor response was prospectively assessed every four cycles according to RECIST criteria by CT scan (17). Treatment was repeated until the occurrence of disease progression or unacceptable toxicity, whichever occurred first.

Validation set

We added another study of immunomonitoring performed on 20 patients treated in Centre Georges François Leclerc for mCRC in second or third line by 5-FU-based chemotherapy plus bevacizumab combination.

All patients gave informed consent approved by the local Ethics Committee. The collection of blood sample is authorized by the French authorization (nr. AC2014-2460). No additional blood samples beyond those required for routine testing were taken. Whole blood of mCRC patients was sampled before (D0) and after chemotherapy (D15, D30, and D60) on EDTA-K2 tubes (BD Biosciences) for complete blood count, which was performed in our Clinical Biology Unit (Centre Georges François Leclerc) and on heparinized tube for leucocyte phenotyping. All analyses were performed following the first 6 hours after sampling. Review of pathology reports confirmed the diagnosis. Information regarding clinical, pathologic, and

biological characters of patients and healthy volunteers is presented in Supplementary Table S1.

Flow cytometry

Antibodies and cytometry procedure. Anti-CXCR3-PE-Vio700 (REA232), anti-CCR6-PE (REA190), anti-CD25-APC (4E3), anti-CD45RA-APV-Vio770 (T6D11), anti-CD4-VioGreen (VIT4), anti-CD8-VioGreen (BW135/80), anti-CD33-APC-Vio770 (AC104.3E3), anti-HLA-DR-Vioblue (AC122), anti-CD15-VioGreen (VIMC6), anti-CD14-PerCP-Vio700 (TUK4), anti-CD3-FITC (BW264/56), anti-CD56-FITC (REA136), anti-CD19-FITC (LT19), anti-CD20-FITC (LT20), anti-TNF- α -PE (REA656), and anti-Foxp3-PE (3G3) were purchased from Miltenyi Biotec. Anti-CCR4-BV450 (1G1), anti-PD-L1-APC (MIH1), anti-Ki-67-eFluor450 (20Raj1), and anti-PD-1-PerCP-eFluor710 (J105) were purchased from BD Biosciences and eBioscience, respectively. Anti-CD4-Alexa Fluor 700 (RPA-T4), anti-CD39-PE (A1), anti-CD73-Brilliant Violet 421 (AD2), and anti-IL17A-Pacific Blue (BL168) were purchased from BioLegend. All events were acquired by a BD LSR-II cytometer equipped with BD FACSDiva software (BD Biosciences), and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star).

Leucocyte population identification and numeration. For leucocytes identification by flow cytometry, whole blood removed to heparinized tube (100 μ L) was stained with different antibody cocktail for 45 minutes at room temperature. For MDSC identification, we used lineage cocktail (CD3, 56, 19, and 20), CD33, CD15, CD14, and HLA-DR antibody. For Treg analysis, we used CD4, CD45RA, CD25, and Foxp3 antibodies, and for other T-helper subsets, we used CD4, CD45RA, CD25, CCR6, CXCR3, and CCR4 antibodies. The gating strategy is described in Supplementary Fig. S1 and S2. After surface staining, 2 mL of red blood cells lysis solution (BD Biosciences) was added for 10 minutes, centrifuged (400 \times g, 5 minutes), and then resuspended in flow cytometry buffer (eBioscience). Foxp3 staining was carried out according to the manufacturer's protocol using the fixation/permeabilization solution (eBioscience).

Suppression assays

To test MDSC subset suppressive activity, total CD3⁺ lymphocytes and MDSC subsets were sorted from mCRC patient blood (around 15 mL). For gMDSC and granulocytes isolation (around 7.5 mL of blood), we used Whole Blood CD15 MicroBeads and column following the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). For mMDSC and monocytes isolation (around 7.5 mL of blood), we performed peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolation on lymphocyte separation medium (Eurobio). CD15⁺ cells and PBMCs were then stained with anti-CD33-APC-Vio770 (AC104.3E3), anti-HLA-DR-Vioblue (AC122), anti-CD15-VioGreen (VIMC6), anti-CD14-PerCP-Vio700 (TUK4), and anti-CD3-FITC (BW264/56) in flow cytometry buffer (eBioscience) for 30 minutes. Myeloid subsets (gMDSC, mMDSC, monocytes, and granulocytes) and total T cells were cell sorted on ARIA-III (BD Biosciences). CD3⁺ cells were activated with 2 μ g/mL anti-CD3 (Bio X Cell) and anti-CD28 (Bio X Cell) as effector cells and cocultured with or without gMDSC, mMDSC, granulocytes, or monocytes (T-cell/myeloid cell ratios are 10:1 or 25:1) for one week in culture medium (AIM V Medium, Fisher Scientific) in the presence of 2 μ mol/L of ATP (Sigma). In some experiments, the CD39-neutralizing antibody

(OREGA Biotech, clone BY40, 10 µg/mL) and/or anti-PD-1 antibody (Nivolumab, 2 µg/mL) were added. In some experiments, TNF α and Ki67 expression was assessed in CD3⁺ T cells by flow cytometry after 24 hours of coculture with or without MDSCs. This was performed in the presence of anti-CD3 (2 µg/mL, Bio X Cell) and anti-CD28 (2 µg/mL, Bio X Cell). Mouse IgG1 (11711, R&D Systems) and human IgG4 (ET904, eBioscience) antibodies were respectively used as a control for anti-CD39 and anti-PD-1 antibody efficacy.

Measurement of cytokines

After 5 days of culture, cell culture supernatants were assessed by ELISA for human TNF α (Biolegend) according to the manufacturer's protocol.

For intracellular cytokine staining, cells were stimulated for 4 hours at 37°C in culture medium containing PMA (50 ng/mL; Sigma-Aldrich), ionomycin (1 µg/mL; Sigma-Aldrich), and monensin (GolgiStop; 1 µL/mL; BD Biosciences). After staining for surface markers [anti-CD3-FITC (BW264/56)], cells were fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions (Fixation/Permeabilization Kit; eBiosciences), then stained for intracellular products. Antibodies used for intracellular staining were as follows: phycoerythrin (PE)-conjugated anti-TNF α or eFluor 450–conjugated anti-Ki67.

qRT-PCR

Total RNA from T cells was extracted with TRI Reagent (Ambion), reverse transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), and was analyzed by qRT-PCR with the SYBR Green method according to the manufacturer's instructions using the 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Expression was normalized to the expression of human *ACTB*. Primers designed to assess gene expression are as reported in Supplementary Table S2.

Statistical analyses

For the analysis of data, comparison of continuous data was achieved by the Mann–Whitney U test or Wilcoxon Test and comparison of categorical data by Fisher exact test, as appropriate. All *P* values are two tailed. *P* < 0.05 was considered significant. Data are represented as mean \pm SEM. All patients were followed up until death or the end of data recording (May 30, 2015). Progression-free survival (PFS) was calculated from the date when therapy started to the date of disease progression, and overall survival was calculated from the date when therapy started to the date of death. Median follow-up with its 95% confidence interval (CI) was calculated using the reverse Kaplan–Meier method. Survival probabilities were estimated using the Kaplan–Meier method, and survival curves were compared using the log-rank test. Analyses were performed using MedCalc Software.

Determination of the required number of patients

We proposed to separate patients using median as a cutoff to have comparable number of patients in the two groups. The rate of PFS under FOLFOX–bevacizumab is about 60% at 6 months (18). We decided to only foster on clinically relevant biomarker that could separate a group of patients with 6 months PFS rate of 40% versus 80%. With a risk α of 5% and a power of 80%, we needed a minimum of 11 patients per group to detect a difference. For this reason, we decided to include 25 patients.

Results

Accumulation of Treg and Th17 and Th1 depletion in mCRC patients

We first analyzed the frequency of circulating immune cell populations from mCRC patients at baseline compared with healthy individuals. The clinical characteristics and blood parameters of patients and healthy volunteers are summarized in Supplementary Table S1 and Supplementary Fig. S3. To assess the frequency of memory T-cell subpopulations, we relied on their chemokine receptor expression using a gating strategy adapted from Mahnke and colleagues (19). The transcription factor Foxp3 occurred with a concomitant high expression of CD25, while Th1, Th2, Th17, and Th17/Th1 cells were analyzed on the basis of their expressions of CCR6, CXCR3, and CCR4 (Supplementary Fig. S1). To validate our gating strategy, we analyzed IFN γ and IL17A cytokine expressions in memory T-CD4 cells regarding chemokine receptor expression (Supplementary Fig. S4). The frequency of memory Th2 cells was comparable between healthy volunteers and mCRC patients while there was a small decrease in memory Th1 (*P* = 0.035) in mCRC (Fig. 1A). In contrast, we observed a significant increase in the number of Treg (*P* < 0.0001) and Th17 cells (*P* = 0.019) while inflammatory Th17 cells expressing the CXCR3 marker, and called Th17/Th1 in the article, did not accumulate in mCRC patients (*P* = 0.071) (Fig. 1A). We then studied the prognostic role of accumulation of Treg or Th17 cells. We separated patients into two groups using median as a cutoff, and we did not observe any association between Treg (*P* = 0.68) or Th17 (*P* = 0.42) accumulation and PFS during first-line chemotherapy and overall survival (Fig. 1B and C and not shown). Th1, Th2, and inflammatory Th17 cells were also not associated with prognosis (not shown). Together, these data show alterations in the frequency of memory T-helper populations in mCRC patients compared with healthy donors. However, these changes do not seem to affect tumor prognosis.

Effect of FOLFOX–bevacizumab regimen on subsets of memory CD4 T cells

Chemotherapy using 5-FU was shown to affect both MDSC levels and T-cell polarization (15, 16). Oxaliplatin was also shown to improve antitumor T-cell functions via a mechanism called immunogenic cell death (20). We observed that one cycle of chemotherapy did not significantly alter the number of circulating lymphocytes (Supplementary Fig. S5). T-helper frequencies (Th1, Th2, Treg, Th1/Th17, and Th17) were monitored at days 0, 15, 30, and 60 after chemotherapy. In the 25 mCRC patients, we did not observe any change in the frequency of Th1, Th2, and Th17/Th1. For Treg and Th17 cells, we observed only a respective decrease (*P* = 0.013) and increase (*P* = 0.047) frequency at day 15 that did not persist during follow-up (Fig. 2A). As a control, we could not detect significant modification of Treg and Th17 frequencies in untreated patients (data not shown). Importantly, when we focused on the impact of modifications of memory CD4 T-helper cell frequency on PFS, we observed a subset of patients whose Treg number is decreased 15 days after the first cycle of chemotherapy. This modulation is maintained during the whole follow-up (D30, *P* = 0.021; D60, *P* = 0.013). Nevertheless, Treg frequency modulation at day 15 was not associated with PFS (*P* = 0.42; Fig. 2B and C). Concerning Th17 cells' frequency modulation, we also observed a subset of patients whose Th17 percentage increased 15 days after the first cycle of chemotherapy. This increase is only

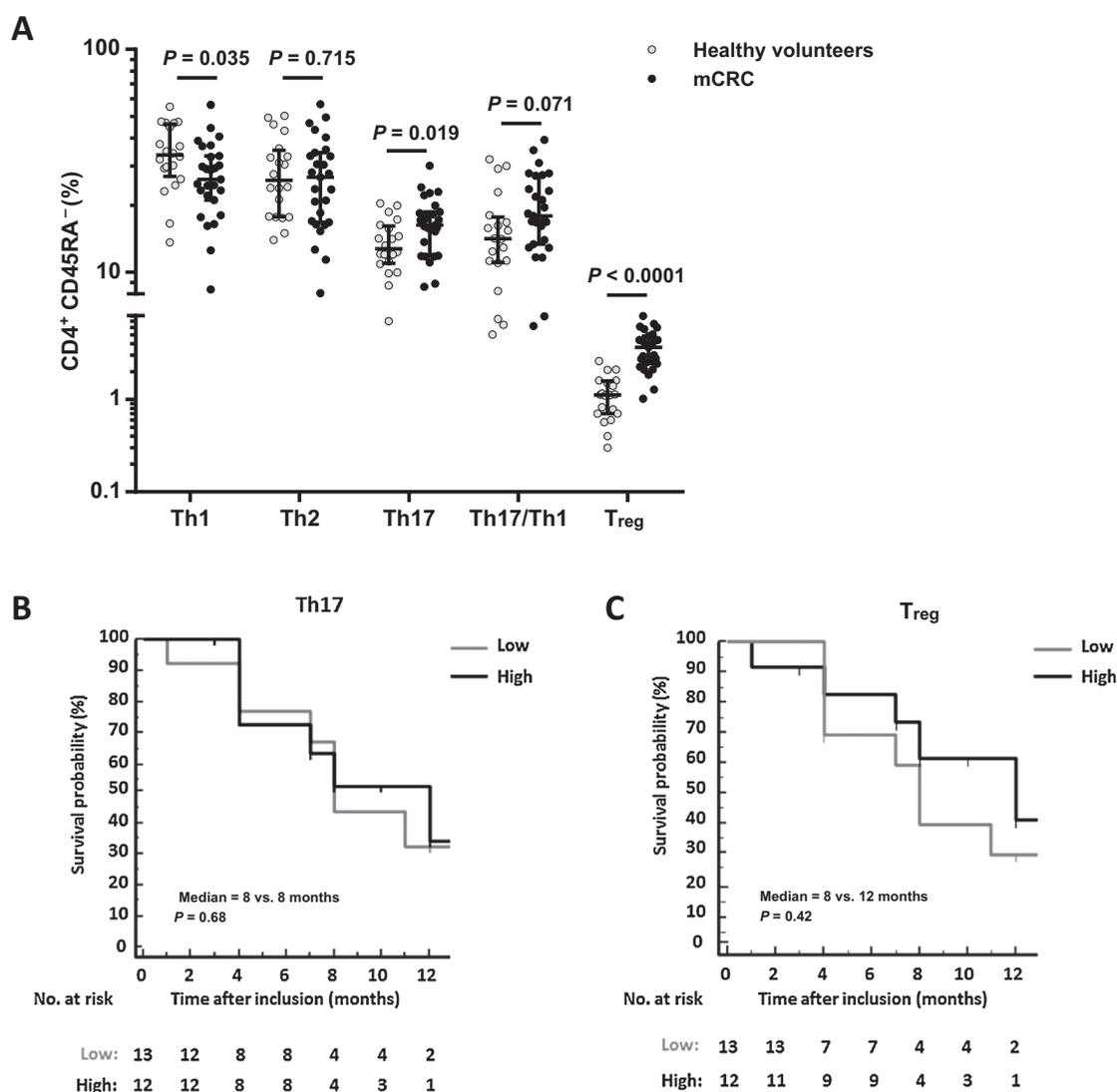


Figure 1.

Treg, Th17 accumulation, and Th1 depletion in mCRC patients. **A**, whole blood of healthy volunteers or mCRC patients was stained with anti-CD4, anti-CD45RA, anti-CCR6, anti-CXCR3, anti-CCR4, anti-CD25, and anti-Foxp3 antibodies and analyzed by flow cytometry. The frequency of memory CD4 (CD45RA⁻ CD4⁺), Th1 (CCR6⁻ CXCR3⁺), Th2 (CCR6⁻ CXCR3⁻ CCR4⁺), Th17 (CCR6⁺ CXCR3⁻), Th17/Th1 (CCR6⁺ CXCR3⁺), and Treg (CD25^{high} Foxp3⁺) cells is depicted. The data presented constitute the analyses performed on 20 healthy volunteers and 25 mCRC patients. **B**, Kaplan-Meier curve of PFS for patients with mCRC according to the presence of a high or low level of Th17 cells in blood (using median frequency as a cutoff). **C**, Kaplan-Meier curve of PFS for patients with mCRC according to the presence of a high or low level of Treg cells in blood (using median frequency as a cutoff).

transitory. However, this increase in Th17 cell frequency at day 15 was associated with a poor PFS ($P = 0.048$; Fig. 2D and E). In the group of patients with increased Th17 frequency, we observed 46% of partial response after 3 months of treatment, while all patients presented a partial response upon RECIST criteria in the group of patients with a decrease of Th17 cell frequency ($P = 0.03$, Fisher exact test). We could observe similar prognostic role of Th17 frequency decrease after a cycle of 5-FU-based chemotherapy plus bevacizumab in a series of 20 metastatic colorectal cancer patients treated by this protocol in second or third line [median PFS of 7 months vs. 4 months for patients with decreased vs. increased Th17 frequency ($P = 0.04$; data not shown)]. Together, these results show that after the first cycle of chemotherapy, Treg

frequency decreased to a normal level while Th17 frequency increased in some patients. Increased Th17 level is associated with poor prognosis and resistance to therapy.

Accumulation of MDSCs in mCRC patients

We also investigated the frequency of MDSCs using the Lin⁻ CD33^{high} HLA-DR⁻ cell labeling. Using CD14 and CD15 labeling, we separated the two types of MDSCs: gMDSCs, which express CD15 and CD14 marker; and mMDSCs, which express the CD14 marker only (Supplementary Fig. S2). To validate our gating strategy, we cell sorted from mCRC whole-blood CD15⁺ cells using magnetic beads. These cells were then separated cells upon CD33 labeling and we observed that only CD15⁺ CD33^{high}

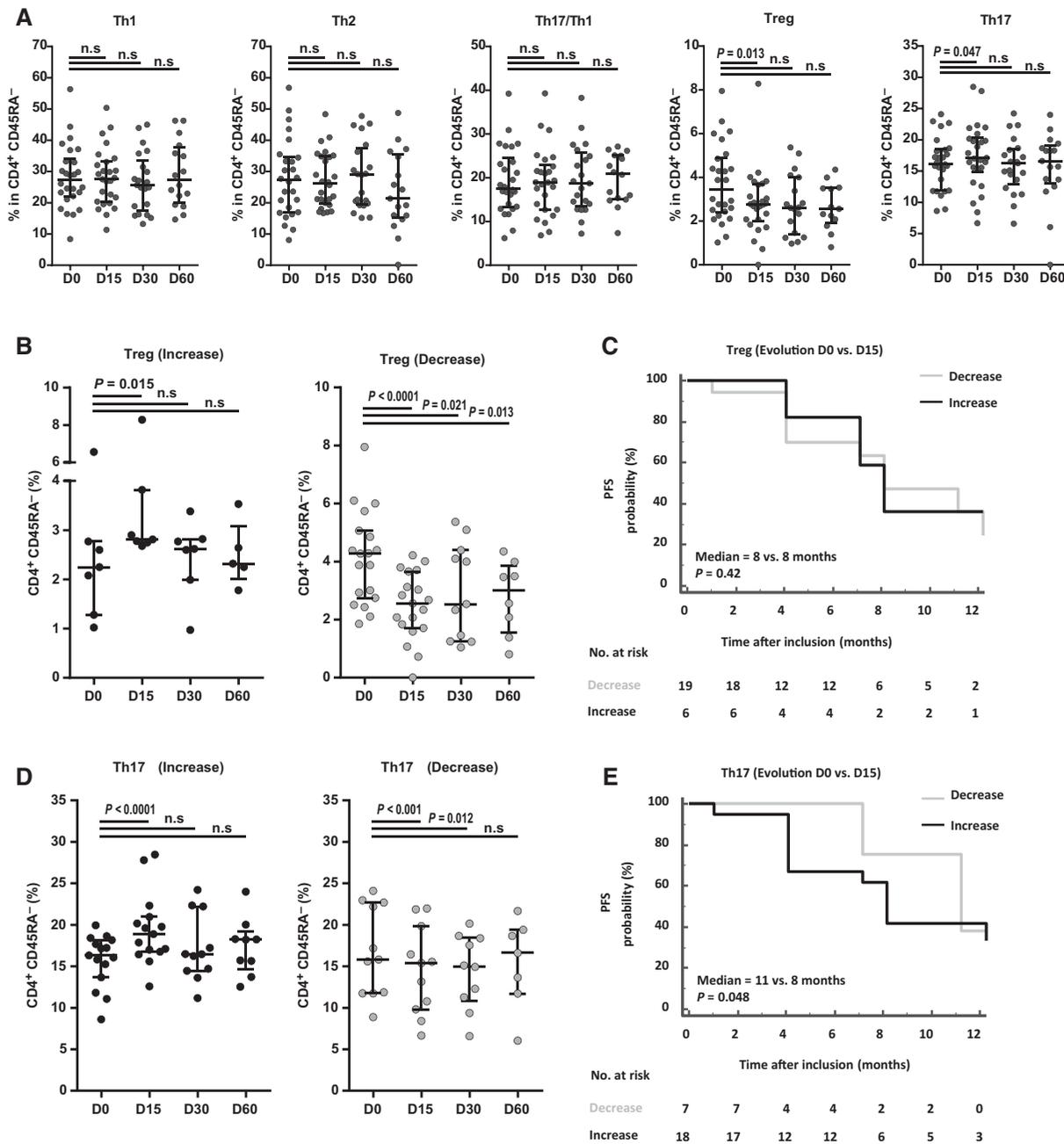


Figure 2.

Effect of FOLFOX-bevacizumab regimen on memory CD4 T-cell subsets. **A**, whole blood of mCRC patients was stained with anti-CD4, anti-CD45RA, anti-CCR6, anti-CXCR3, anti-CCR4, anti-CD25, and anti-Foxp3 antibodies and was analyzed by flow cytometry before (D0) and after (D15, D30, and D60) first-line chemotherapy. Memory CD4 T-cell frequency is depicted as described in Fig. 1. The data presented constitute the analyses performed on 25 mCRC patients. **B**, evolution (D0, D15, D30, and D60) of Treg cell frequency in the blood of a patient with an induction or a decrease of Treg after chemotherapy (D0 vs. D15). **C**, Kaplan-Meier curve of PFS for patients with mCRC according to the evolution (increase vs. decrease) of Treg cell frequency in blood before (D0) and after (D15) chemotherapy. **D**, evolution (D0, D15, D30, and D60) of Th17 cell frequency in the blood of a patient with an induction or a decrease of Th17 after chemotherapy (D0 vs. D15). **E**, Kaplan-Meier curve of PFS for patients with mCRC according to the evolution (increase vs. decrease) of Th17 cell frequency in blood before (D0) and after (D15) chemotherapy. n.s., not significant.

cells exerted immunosuppressive function and could be called gMDSCs, while CD15⁺ CD33^{low} cells did not exert suppressive function and could be called granulocytes (Fig. 3A–C). For CD14⁺ cells isolated from PBMC, all cells expressed CD33 labeling but

only cells with HLA-DR^{low} expression had immunosuppressive function and could be called mMDSCs (Fig. 3A–C). In addition, only CD15⁺ CD33^{high} gMDSCs but not CD15⁺ CD33^{low} granulocytes expressed CD124 (IL4R α), a classical marker of MDSC

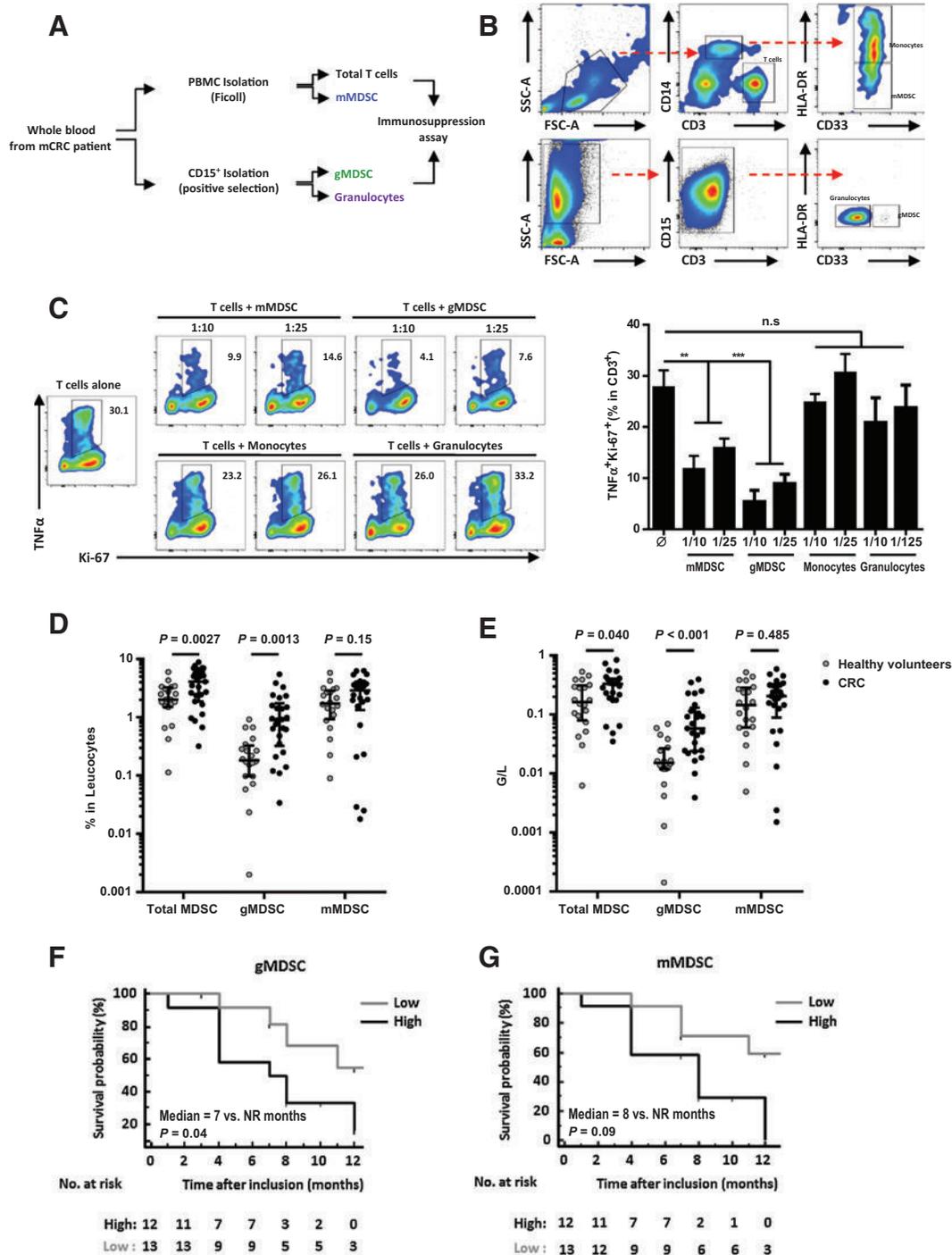


Figure 3.

Accumulation of MDSCs in mCRC patients. **A**, graphical representation of cell-sorting experiment performed for analysis of MDSC, monocyte, and granulocyte-suppressive capacities on autologous T cells. **B**, representative gating strategy used for T cells, mMDSC, granulocytes, and gMDSC sorting from an mCRC patient's whole blood. **C**, total CD3⁺ lymphocytes, granulocytes, and gMDSC subsets were sorted from a cancer patient's blood. Then, CD3⁺ T cells were activated with anti-CD3 and anti-CD28 as effector cells and cocultured (in the presence of ATP) with or without myeloid cells at different ratios (1:10 or 1:25, myeloid cells: T cells) during 5 days. We usually used around 20,000 T cells in our immunosuppression assay. TNFα and Ki67 expressions were assessed using intracellular staining and were analyzed in CD3⁺ T cells. One representative experiment is shown ($n = 3$ mCRC patients). n.s., not significant. **D** and **E**, whole blood of healthy volunteers or mCRC patients was stained with anti-CD33, anti-Lin (i.e., anti-CD3, -CD19, -CD20, -CD56), anti-HLA-DR, anti-CD14, and anti-CD15 antibodies and was analyzed by flow cytometry. The frequency (**D**) or the absolute count (**E**) of gMDSC (CD33⁺ Lin⁻ HLA-DR^{-/low} CD14⁻ CD15⁺) or mMDSC (CD33⁺ Lin⁻ HLA-DR^{-/low} CD14⁺ CD15⁻) is depicted. The data presented constitute the analysis performed on 20 healthy volunteers and 25 mCRC patients. **F**, Kaplan-Meier curve of PFS for patients with mCRC according to the presence of a high or low level of gMDSC cells in blood (using median frequency as a cutoff). **G**, Kaplan-Meier curve of PFS for patients with mCRC according to the presence of a high or low level of mMDSC cells in blood (using median frequency as a cutoff).

(Supplementary Fig. S2D). The proportion and absolute number of total MDSCs in peripheral blood from untreated mCRC patients was significantly increased compared with the proportion found in healthy donors ($P = 0.0027$; Fig. 3D). We also observed that both the frequency (Fig. 3D) and the absolute number (Fig. 3E) of gMDSC ($P = 0.0013$ and $P < 0.001$), but not mMDSC ($P = 0.15$ and $P = 0.485$), significantly accumulate in the blood of mCRC patients compared with healthy donors. We then studied the prognostic role of MDSCs. As described above, we separated patients into two groups using median MDSC frequency as a cutoff. We observed that high levels of gMDSC at baseline are significantly associated with poor PFS [7 months vs. median not reached (NR), $P = 0.04$] and overall survival (12 months vs. 23 months, $P = 0.04$; data not shown), while mMDSC level is not associated with prognosis (Fig. 3F and G). We also confirmed that decrease in the frequency of gMDSC is significantly associated with longer median PFS after a cycle of 5-FU–based chemotherapy plus bevacizumab in a series of 20 colorectal patients treated by this protocol in second or third line [median PFS 6 months vs. 4 months for patients with decreased vs. increased gMDSC frequency ($P = 0.05$; data not shown)]. Together, these data show that mCRC patients have high levels of MDSCs, and initial high levels of gMDSCs are associated with poor prognosis.

Effect of FOLFOX–bevacizumab regimen on MDSC frequency

We previously observed that 5-FU induced MDSC cell death in humans, so we tested the effect of the first cycle of FOLFOX–bevacizumab chemotherapy on the frequency of MDSCs. We tested the evolution of MDSC frequency during the first 2 months of treatment. We observed that FOLFOX–bevacizumab chemotherapy did not impact on total MDSC or mMDSC frequency. In contrast, we observed a significant decrease in the number of gMDSCs 2 months after the beginning of the treatment ($P = 0.008$; Fig. 4A). As a control, we could not detect significant modification of MDSC frequency in untreated patients (data not shown). However, when we studied gMDSC, we found that 15 of 25 patients have a decreased frequency of gMDSC after the first cycle of chemotherapy compared with baseline (Fig. 4B). Analysis of gMDSC frequency at days 30 and 60 after initiation of the treatment confirmed that decreased frequency of gMDSC is maintained during the whole follow-up. For the other 10 patients, we did not observe a decrease in gMDSC frequency. Importantly, we observed that decrease in the gMDSC frequency is significantly associated with better prognosis and longer PFS ($P = 0.006$; Fig. 4C). In contrast for mMDSC, we observed that patients with a decreased frequency of mMDSC at day 15 did not maintain this evolution during the whole follow-up (D30, $P = 0.57$; D60, $P = 0.99$). Patients with an increased frequency of mMDSC at day 15 maintained this evolution during the whole follow-up (D30, $P = 0.0013$; D60, $P = 0.006$; Fig. 4D). The increase of mMDSC frequency did not change PFS ($P = 0.09$; Fig. 4E). We also confirmed that decrease in the frequency of gMDSC is significantly associated with longer median PFS after a cycle of 5-FU–based chemotherapy plus bevacizumab in a series of 20 metastatic colorectal cancer patients treated by this protocol in second or third line [median PFS 6 months vs. 4 months for patients with decreased vs. increased gMDSC frequency ($P = 0.05$; data not shown)]. Together, these data show that FOLFOX–bevacizumab induces a decrease of gMDSC, and this decrease is associated with better PFS.

MDSCs in mCRC patients express high levels of CD73, CD39, and PD-L1

Previous reports suggested that MDSCs in human cancers could suppress immunity using PD-L1 and CD39 (14, 21). PD-L1 interacts with PD-1, which is located on the surface membrane of effector memory T cells, and transmits an inhibitory signal reducing the proliferation and activity of these cells. CD39 is an ectonucleotidase that converts extracellular ATP or ADP into AMP. CD39 works together with CD73, another ectonucleotidase that converts AMP into adenosine, which is the final immunosuppressive molecule (22). Thus, both enzymes are required to convert ATP into the immunosuppressive molecule adenosine. We first tested the expression of PD-L1, CD73, and CD39 in the peripheral different myeloid cells (gMDSC and mMDSC, granulocytes, and monocytes) of mCRC patients and healthy volunteers. We observed that gMDSC is the myeloid population that expressed the highest levels of PD-L1, CD73, and CD39 (Fig. 5A–C). Interestingly, a higher expression of PD-L1, CD39, and CD73 is observed in gMDSCs of mCRC patients compared with healthy volunteers, thus suggesting a more important immunosuppressive activity in mCRC patients (Fig. 5A–C). We also confirmed that gMDSC of mCRC patients expressed more *Pdl1*, *Entpd1*, and *Nt5e* (coding for CD39 and CD73, respectively) mRNA than mMDSC (Supplementary Fig. S6).

To exert its immunosuppressive effect, PD-L1 must encounter PD-1 on a T cell. We checked the level of expression of PD-1 in CD4 and CD8 T-cell subsets of mCRC patients and observed a high expression of PD-1 on memory CD8 T cells in both healthy volunteers and mCRC patients. In CD4 T cells, PD-1 is only found on Th1 cells and a higher level is found in mCRC patients compared with healthy volunteers (Fig. 5D–F).

Then, we tested the expression of CD39 and CD73 in effector CD4 and CD8 T-cell subsets and observed that while CD8 and CD4 T cells expressed reduced level of CD73 in mCRC patients, a similar level of CD39 was observed in mCRC patients compared with healthy volunteers (Fig. 5D–F).

Together, these data demonstrate that in mCRC patients, gMDSC expressed high levels of PD-L1, CD73, and CD39, while Th1 and CD8 memory cells expressed PD-1, thus suggesting that gMDSC could blunt T-cell response using both ectonucleotidases and PD-L1.

gMDSC blunts T-cell function in a PD-L1– and ectonucleotidase-dependent manner

To test the immunosuppressive function of MDSC from mCRC patients, we sorted CD3⁺ T cells and gMDSC and mMDSC from 5 mCRC patients. In an autologous model, we stimulated T cells with CD3 plus CD28 mAb and added in the culture either gMDSC or mMDSC in the presence of ATP molecule. As a control, we used granulocytes in this experiment. We observed that both gMDSC and mMDSC subsets have an immunosuppressive effect on T cells, demonstrated by reduced TNF α and Ki67 proliferation marker expression, however, gMDSC exert a more important immunosuppressive effect (Fig. 6A and B). Similar results were obtained using TNF α ELISA assay (Fig. 6C). Importantly, the addition of nivolumab, a clinically available anti PD-1 mAb, and/or the antagonistic anti-CD39 mAb BY40 blunted the immunosuppressive effect of gMDSC on CD3⁺ T cells, while it did not affect the immunosuppressive effect of mMDSC (Fig. 6A–C).

Together, these data show that gMDSCs that accumulate in mCRC patients have a high immunosuppressive function that could be targeted with anti-PD-1 or anti-CD39 antibodies.

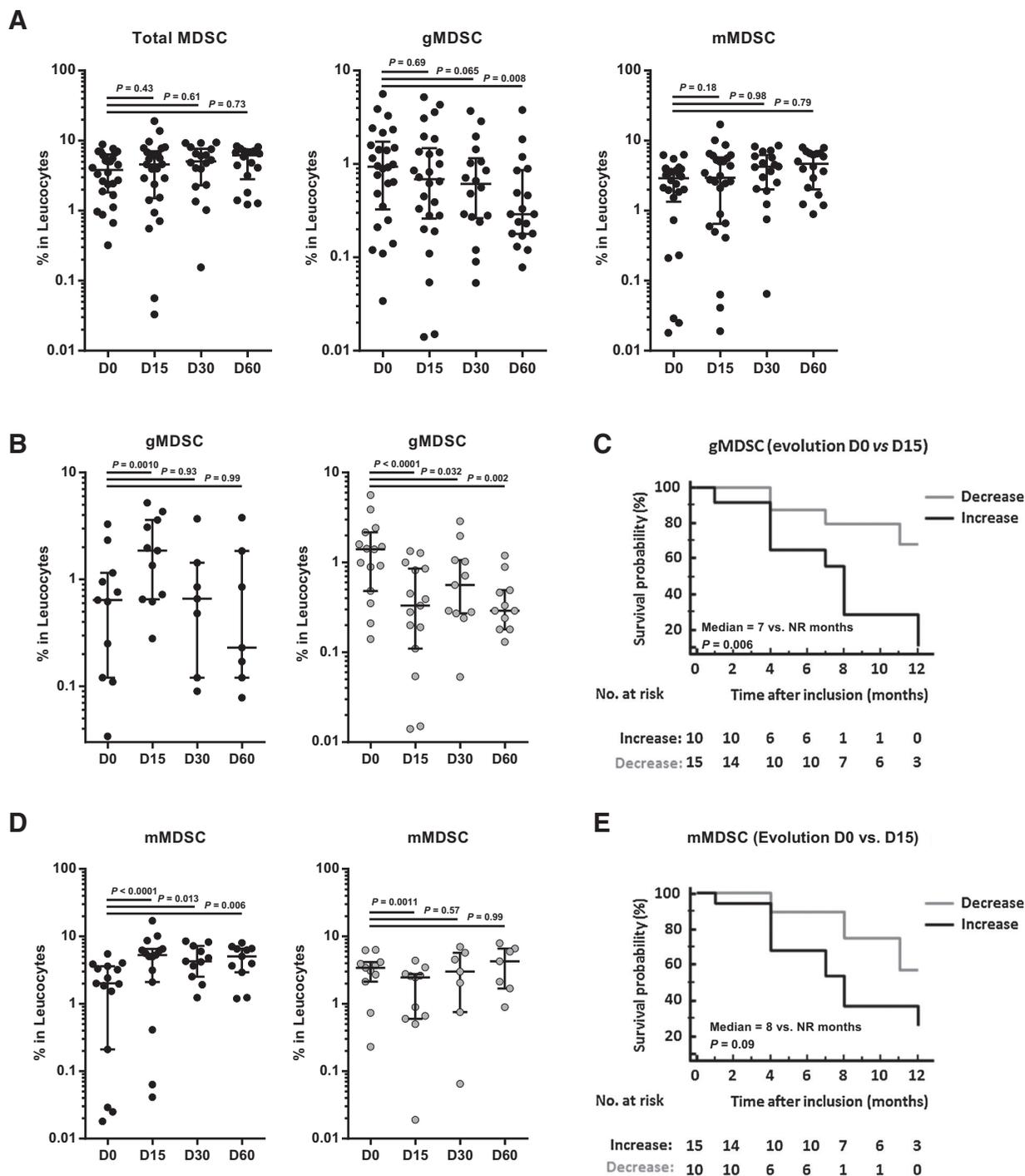


Figure 4. Effect of FOLFOX-bevacizumab regimen on MDSCs. **A**, whole blood of mCRC patients was stained with anti-CD33, anti-Lin (i.e., anti-CD3, -CD19, -CD20, -CD56), anti-HLA-DR, anti-CD14, and anti-CD15 antibodies and was analyzed by flow cytometry before (D0) and after (D15, D30, and D60) first-line chemotherapy. The frequency of total, gMDSC or mMDSC is depicted as described in Fig. 3D and E. The data presented constitute the analysis performed on 25 mCRC patients. **B**, evolution (D0, D15, D30, and D60) of gMDSC cell frequency in the blood of a patient with an induction or a decrease of gMDSC after chemotherapy (D0 vs. D15). **C**, Kaplan-Meier curve of PFS for patients with mCRC according to the evolution (increase vs. decrease) of gMDSC cells in blood before (D0) and after (D15) chemotherapy. **D**, evolution (D0, D15, D30, and D60) of mMDSC cell frequency in the blood of a patient with an induction or a decrease of mMDSC after chemotherapy (D0 vs. D15). **E**, Kaplan-Meier curve of PFS for patients with mCRC according to the ratio (increase vs. decrease) of mMDSC cells in blood before (D0) and after (D15) chemotherapy.

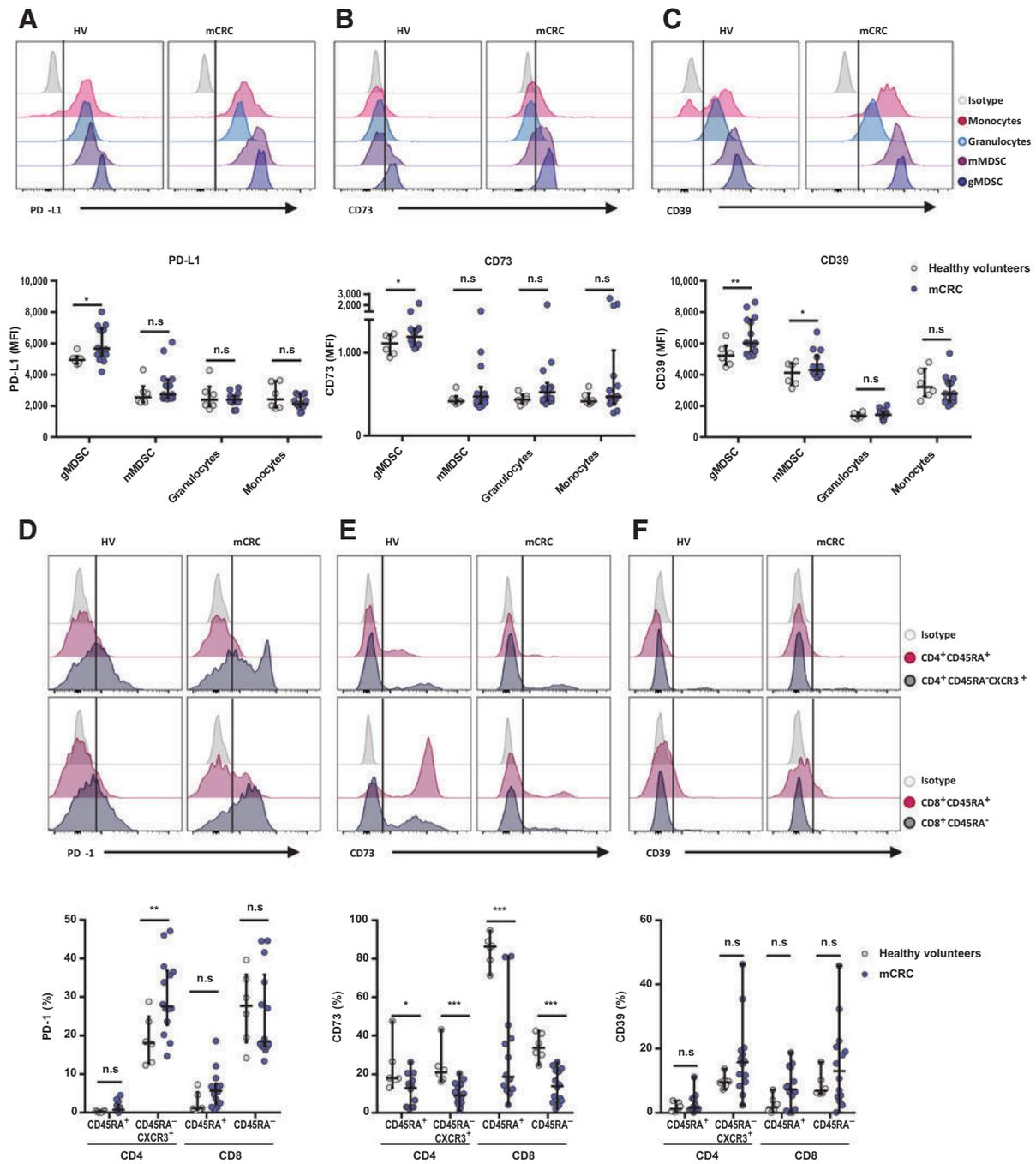


Figure 5. MDSCs in mCRC patients express high levels of CD73, CD39, and PD-L1. **A-C**, expressions of PD-L1 (**A**), CD73 (**B**), and CD39 (**C**) on gMDSC, mMDC, granulocytes, and monocytes are depicted. Top, representative histogram; bottom, individual data for healthy volunteers (HV; $n = 6$; gray circle) and mCRC ($n = 14$, blue circle). MFI, mean fluorescence intensity. **D-F**, expressions of PD-1 (**D**), CD73 (**E**), and CD39 (**F**) on naive CD4 T cells, memory CXCR3⁺ CD4 T cells, naive CD8 T cells, and memory CD8 T cells are depicted. Top, representative histogram; bottom, individual data for healthy volunteers ($n = 6$, gray circle) and mCRC ($n = 14$, blue circle). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ (Mann-Whitney test). n.s., not significant.

Discussion

Previous reports have shown that a high number of MDSC is associated with a poor prognosis in different solid cancers and in hematologic malignancies like chronic lymphocytic leukemia or

myeloma (23–25). However, the prognostic role of MDSCs has not been yet addressed in mCRC. We observed here that accumulation of gMDSC in mCRC is associated with a poor outcome. However, due to the low number of patients, further studies are required to confirm this observation and determine whether

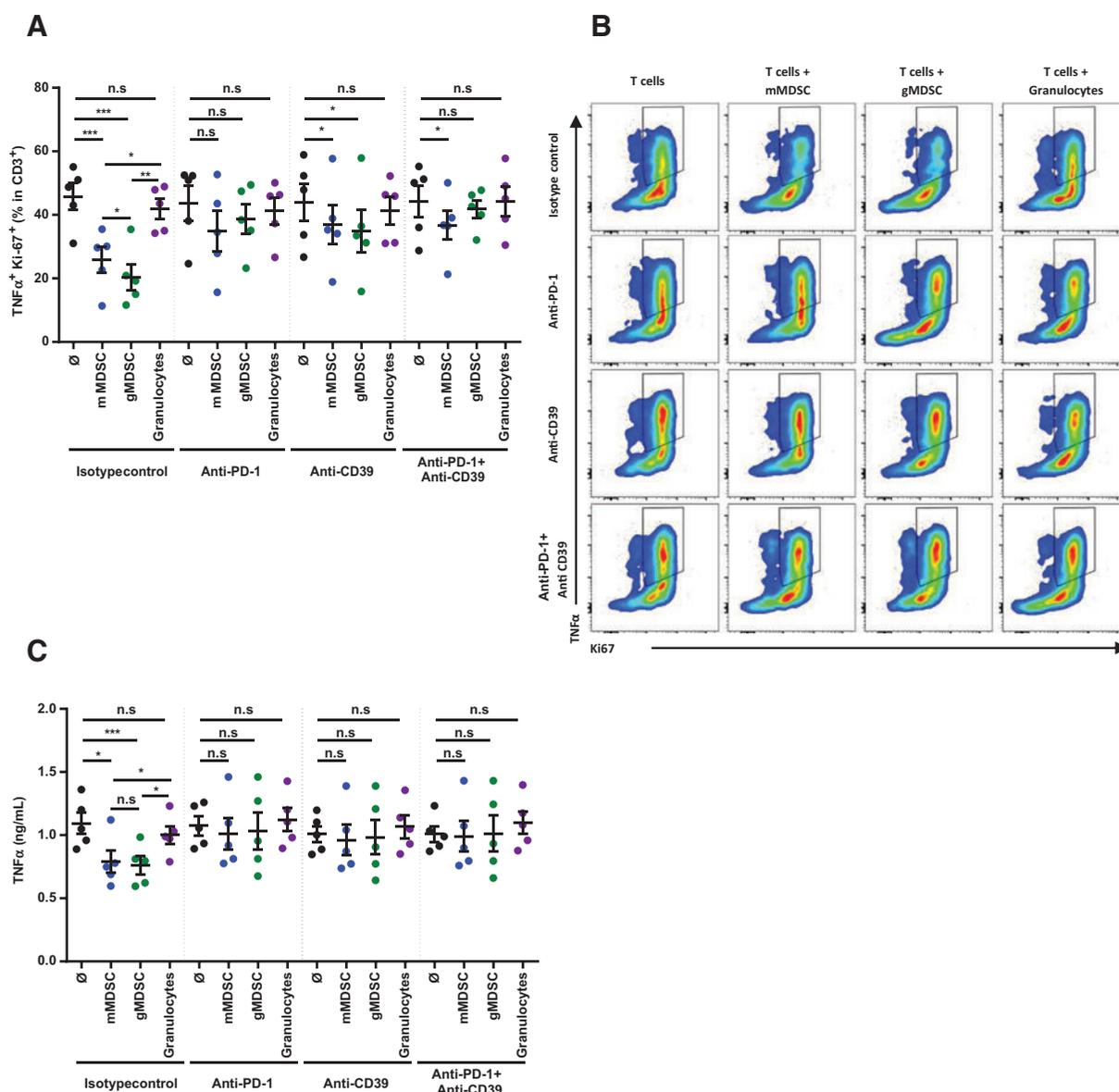


Figure 6. gMDSC blunts T-cell function in a PD-L1- and ectonucleotidase-dependent manner. **A** and **B**, total CD3, granulocytes, mMDSC, and gMDSC subsets were sorted from a cancer patient's blood. Then, CD3 cells were activated with anti-CD3 and anti-CD28 as effector cells and cocultured with or without myeloid cells at different ratios (in the presence of ATP) for 5 days. TNF α and Ki67 expression was assessed using intracellular staining and was analyzed in CD3⁺ T cells. One representative experiment is shown for **B** and for **A**, results are for 5 independent patients. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. **C**, TNF α secretion was assessed using ELISA on the supernatants of cocultures after 5 days. Experiment was performed as in **A**. Data are mean \pm SD of three independent experiments. *, $P < 0.05$. n.s., not significant.

gMDSC accumulation is an independent prognostic factor in mCRC.

We observed that mMDSCs are the most frequent MDSC population in patient blood. Such data contrast with previous reports on MDSC in colorectal cancer, in which the authors did not observe expression of CD15 or CD14 on MDSC or only detected CD15⁺ gMDSC (14, 21). Definition of human MDSC phenotype is still controversial. Although CD14⁺ Lin⁻ HLA-DR⁻ cells were commonly admitted to be mMDSC, the definition of gMDSC is not consensual. Most reports define gMDSCs

as low-density granulocytes copurified with PBMC during Ficoll gradient. Here, we observed that blood CD15⁺ CD33^{high} Lin⁻ HLA-DR⁻ cells are immunosuppressive cells and could be called MDSC, while CD15⁺ CD33^{low} Lin⁻ HLA-DR⁻ cells are not immunosuppressive and are granulocytes. Moreover, we could compare the functions of both gMDSC and mMDSC. We observed that gMDSC have a higher immunosuppressive function than mMDSC on a per cell basis. Previous data suggested that MDSC from mCRC patients have a more important immunosuppressive function compared with MDSC from

healthy donors, but the comparison of the function of gMDSC and mMDSC was not addressed (21). We found that gMDSCs have higher levels of PD-L1, CD39, and CD73 expression and exerted a stronger immunosuppressive activity than mMDSCs. Together, such data suggest that gMDSC is the major subset of MDSC involved in immunosuppression in mCRC and strengthen the rationale to combine PD-1/PD-L1 or ectonucleotidase-neutralizing antibodies with chemotherapy to blunt immunosuppression induced by gMDSC in mCRC.

In a previous report, we observed that 5-FU mediated MDSC depletion via an induction of cell death (15). In humans, a recent study on a few colorectal cancer patients treated with FOLFOX (6 patients) or FOLFIRI (4 patients) showed that while FOLFOX treatment of patients with colorectal cancer led to a decrease in MDSC levels, FOLFIRI had the opposite effect (26). In this report, we also observed that FOLFOX–bevacizumab induces a decrease of MDSC but only of the gMDSC subset. This reduction of gMDSC frequency is preferentially observed in patients with initial high level of gMDSC ($\geq 1\%$ in leucocytes), thus raising the hypothesis that accumulating gMDSC from mCRC patients may have a specific biology that renders them more sensitive to chemotherapy-induced cell death.

We had previously reported that MDSC cell death mediated by 5-FU induced the activation of NLRP3 inflammasome and was associated with IL1 β secretion. This IL1 β secretion promoted induction of Th17 response. We demonstrated that Th17 induction was associated with the accumulation of proangiogenic molecules in the tumor. Such phenomenon is deleterious, and depletion of IL17A or IL1 β is associated with enhanced efficacy of 5-FU treatment in mice (16). In this report, we observed that FOLFOX–bevacizumab induced Th17 accumulation after one cycle. Concomitantly, we also noted a decrease of gMDSC in patients with high initial levels. Such data strongly support that this combination of chemotherapy also affects antitumor immune response through similar mechanisms to those observed with 5-FU monotherapy in mouse and human models. Importantly, increase in Th17 cells and absence of reduction of gMDSC frequency are both associated with a poor prognosis, thus suggesting, in a similar way to mouse observations, that FOLFOX–bevacizumab induced a deleterious effect on immune response via induction of Th17 polarization.

In conclusion, our study shows that FOLFOX–bevacizumab chemotherapy induced accumulation of Th17 cells in patients, and this parameter is associated with poor prognosis, while gMDSC depletion is associated with better outcome. However, the most important point in this study is that gMDSC is an MDSC

subset that could be targeted in mCRC using molecules that target the PD-1/PD-L1 or CD39/CD73 ectonucleotidase pathways. Thus, our data give rationale to use ectonucleotidase inhibitors or anti-PD-1/PD-L1 in association with FOLFOX–bevacizumab regimen in further clinical development of chemoimmunotherapy in human colorectal cancer.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

N. Bonnefoy is a consultant/advisory board member for OREGA Biotech. L. Apetoh is a consultant/advisory board member for Bristol-Myers Squibb. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: E. Limagne, S. Ladoire, L. Apetoh, F. Ghiringhelli
Development of methodology: E. Limagne, V. Derangère, F. Végran, S. Ladoire
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): E. Limagne, R. Euvrard, M. Thibaudin, N. Bonnefoy, J. Vincent, L. Bengrine-Lefevre
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): E. Limagne, R. Euvrard, M. Thibaudin, V. Derangère, R. Boidot, L. Apetoh, F. Ghiringhelli
Writing, review, and/or revision of the manuscript: E. Limagne, R. Euvrard, M. Thibaudin, C. Rébé, V. Derangère, F. Végran, N. Bonnefoy, D. Delmas, L. Apetoh, F. Ghiringhelli
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): C. Rébé, A. Chevriaux, R. Boidot, S. Ladoire
Study supervision: E. Limagne, L. Apetoh, F. Ghiringhelli

Acknowledgments

We thank Aurelie Bertaut (statistician) for calculation of the required number of patients.

Grant Support

This work was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer, the Institut National du Cancer, the Association pour la recherche sur le cancer, the Conseil Régional Bourgogne/INSERM, Fondation pour la Recherche Médicale (F. Ghiringhelli) the Fondation de France, the Fondation Lilliane Betancourt, the French National Research Agency (ANR-13-JSV3-0001 and ANR-11-LABX-0021), the Ligue Régionale contre le Cancer Comité Grand-Est, the Canceropôle Grand-Est, and the European Community (Marie Curie Fellowship PCIG10-GA-2011-303719 to L. Apetoh). This work was also supported by institutional grants from INSERM and Université de Montpellier 1 and from the LabEx MablImprove (N. Bonnefoy).

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

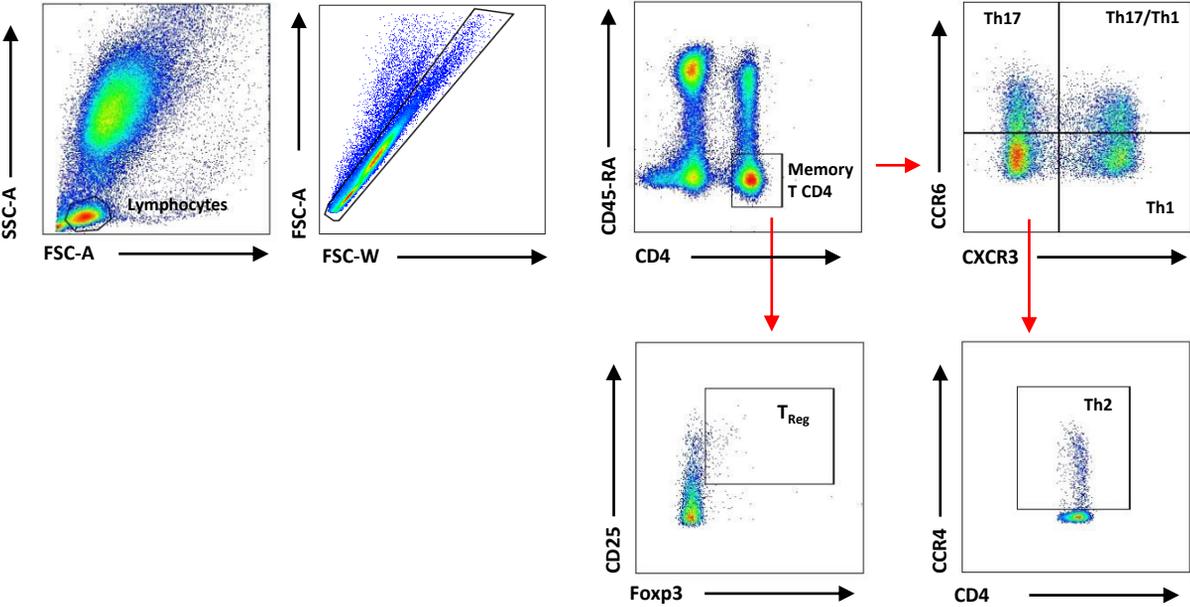
Received November 17, 2015; revised June 2, 2016; accepted July 5, 2016; published OnlineFirst August 5, 2016.

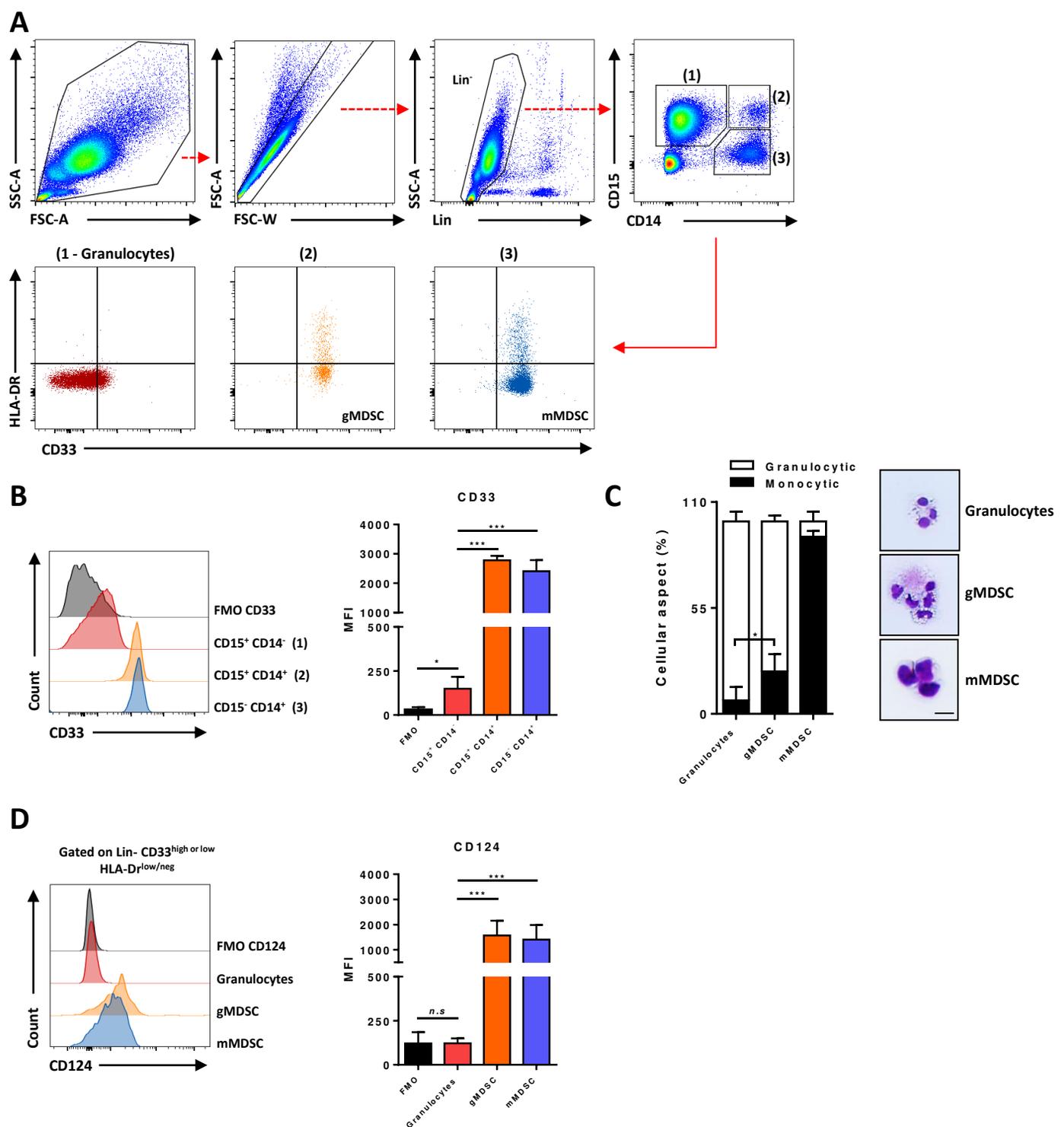
References

- Principi M, Barone M, Pricci M, De Tullio N, Losurdo G, Ierardi E, et al. Ulcerative colitis: from inflammation to cancer. Do estrogen receptors have a role? *World J Gastroenterol* 2014;20:11496–04.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960–64.
- Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *The N Engl J Med* 2005;353:2654–66.
- Salama P, Stewart C, Forrest C, Platell C, Iacopetta B. FOXP3+ cell density in lymphoid follicles from histologically normal mucosa is a strong prognostic factor in early stage colon cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61:1183–90.
- Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* 2013;39:782–95.
- Mei Z, Liu Y, Liu C, Cui A, Liang Z, Wang G, et al. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer* 2014;110:1595–605.
- Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:186–92.
- Liu J, Duan Y, Cheng X, Chen X, Xie W, Long H, et al. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;407:348–54.

9. Chung AS, Wu X, Zhuang G, Ngu H, Kasman I, Zhang J, et al. An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Med* 2013;19:1114–23.
10. Apetoh L, Vegran F, Ladoire S, Ghiringhelli F. Restoration of antitumor immunity through selective inhibition of myeloid derived suppressor cells by anticancer therapies. *Curr Mol Med* 2011;11:365–72.
11. Marvel D, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J Clin Invest* 2015;125:3356–64.
12. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 2012;12:253–68.
13. Solito S, Marigo I, Pinton L, Damuzzo V, Mandruzzato S, et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. *Ann NY Acad Sci* 2014;1319:47–65.
14. OuYang LY, Wu XJ, Ye SB, Zhang RX, Li ZL, Liao W, et al. et al. Tumor-induced myeloid-derived suppressor cells promote tumor progression through oxidative metabolism in human colorectal cancer. *J Transl Med* 2015;13:47.
15. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, et al. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res* 2010;70:3052–61.
16. Bruchard M, Mignot G, Derangère V, Chalmin F, Chevriaux A, Végran F, et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat Med* 2013;19:57–64.
17. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45:228–47.
18. McCleary NJ, Meyerhardt JA, Green E, Yothers G, de Gramont A, Van Cutsem E, et al. Impact of age on the efficacy of newer adjuvant therapies in patients with stage II/III colon cancer: findings from the ACCENT database. *J Clin Oncol* 2013;31:2600–6.
19. Mahnke YD, Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin Lab Med* 2007;27:469–85.
20. Tesniere A, Apetoh L, Ghiringhelli F, Joza N, Panaretakis T, Kepp O, et al. Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr Opin Immunol* 2008;20:504–11.
21. Zhang B, Wang Z, Wu L, Zhang M, Li W, Ding J, et al. Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in patients with colorectal carcinoma. *PLoS One* 2013;8:e57114.
22. Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene* 2013;32:1743–51.
23. Chen MF, Kuan FC, Yen TC, Lu MS, Lin PY, Chung YH, et al. et al. IL-6-stimulated CD11b+ CD14+ HLA-DR- myeloid-derived suppressor cells, are associated with progression and poor prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncotarget* 2014;5:8716–28.
24. Idorn M, Kollgaard T, Kongsted P, Sengelov L, Thor Straten P. Correlation between frequencies of blood monocytic myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and negative prognostic markers in patients with castration-resistant metastatic prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2014;63:1177–87.
25. Romano A, Parrinello NL, Vetro C, Forte S, Chiarenza A, Figuera A, et al. Circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical outcome in Hodgkin lymphoma patients treated up-front with a risk-adapted strategy. *Br J Haematol* 2015;168:689–700.
26. Kanterman J, Sade-Feldman M, Biton M, Ish-Shalom E, Lasry A, Goldshtein A, et al. et al. Adverse immunoregulatory effects of 5FU and CPT11 chemotherapy on myeloid-derived suppressor cells and colorectal cancer outcomes. *Cancer Res* 2014;74:6022–35.

Supplementary Figure 1: T_{Helper} gating strategy

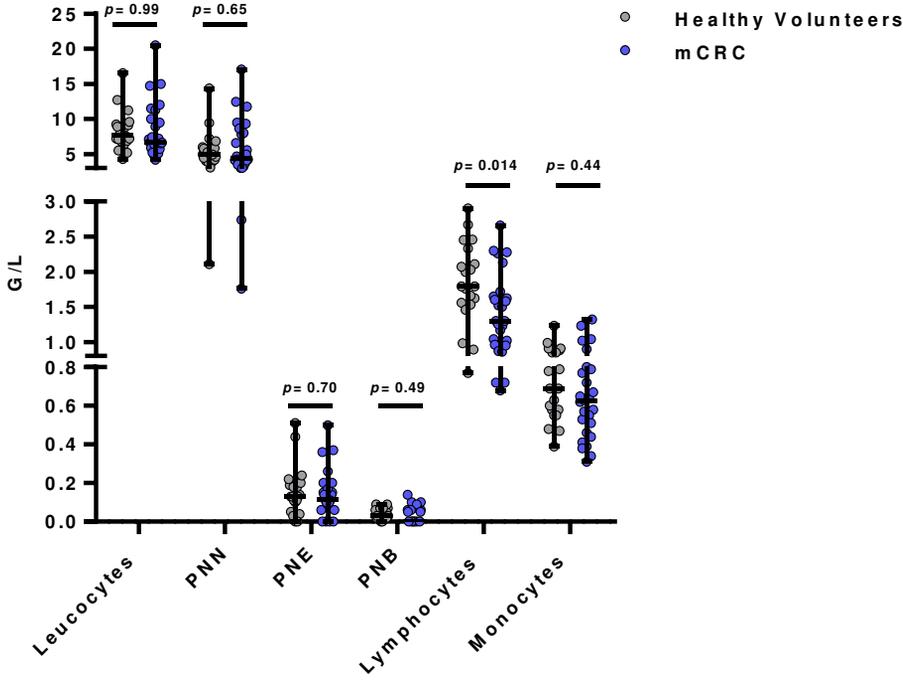




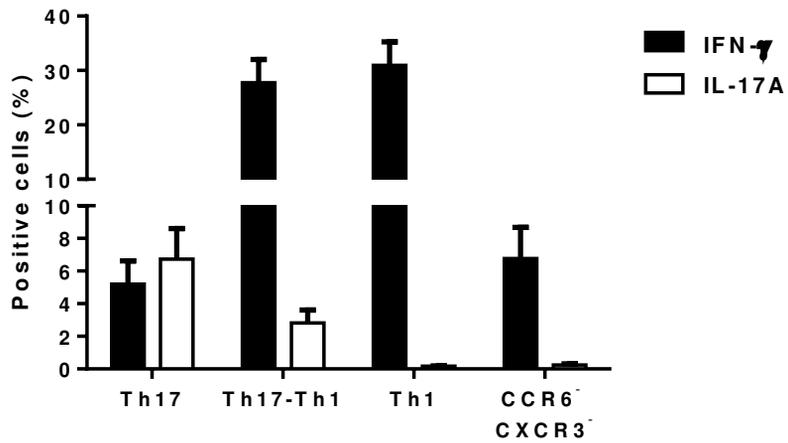
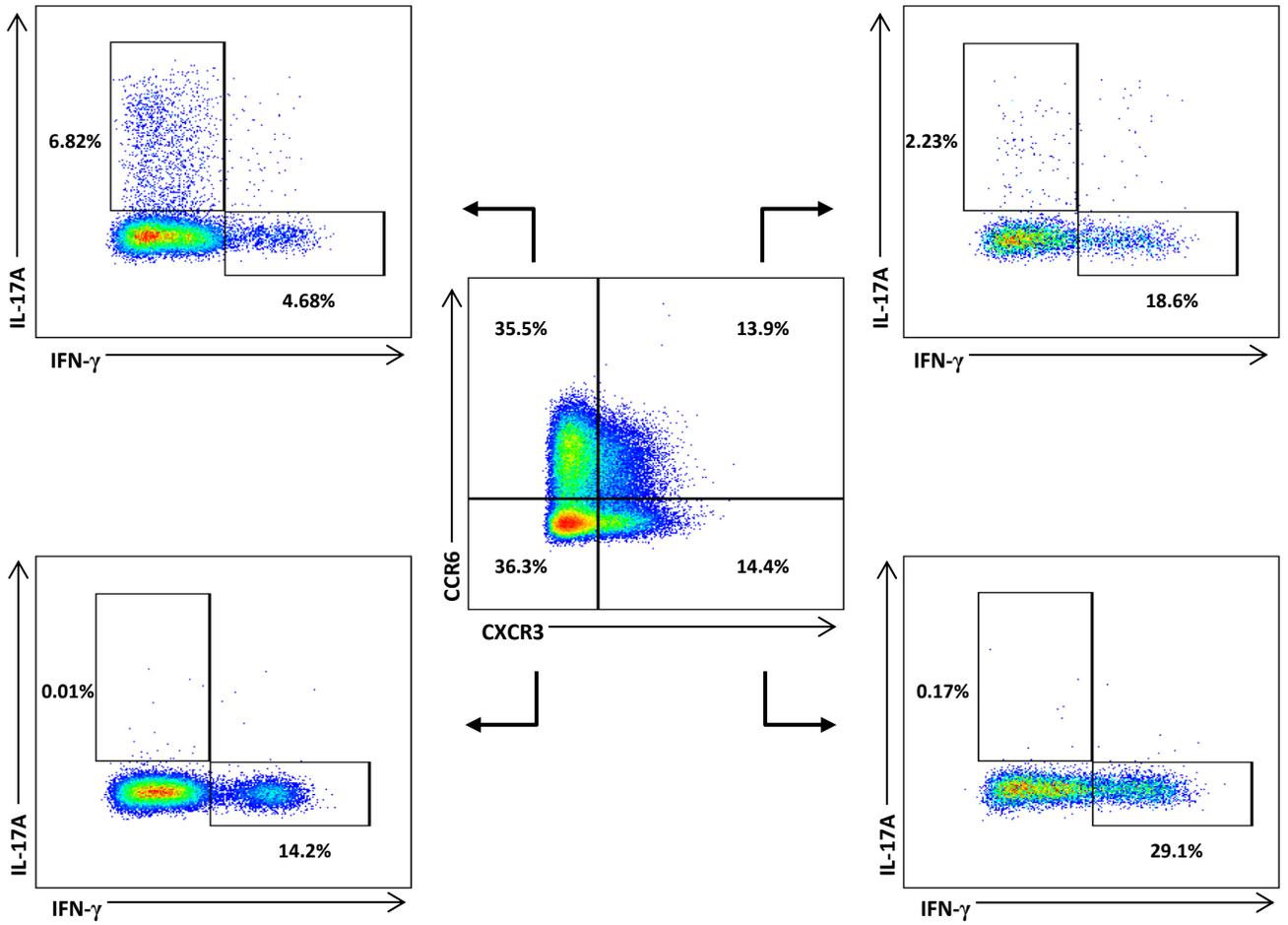
Supplementary Figure 2: MDSC gating strategy and IL-4R α expression analysis.

- Flow cytometry gating strategy to identify MDSC subpopulations and granulocytes (1) through SSC-A, Lin⁻ (=CD3, CD20, CD19 and CD56) CD14, CD15, CD33 and HLA-DR labeling (upper panel). For each selected population with CD14 and CD15 labelling, mMDSC (2) and gMDSC (3) were identified as HLA-DR^{low/-} and CD33^{high} (lower panel).
- CD33 labeling for each population gated on CD14 and CD15 expression (1, 2 and 3). Representative histogram (left panel) and MFI for 3 patients (right panel)
- Pictures correspond to May-Grünwald Giemsa (MGG) staining of granulocytes, mMDSC and gMDSC isolated after cell sorting (upper panel). Quantification of cellular aspect (granulocytic or monocyteic) after MGG staining (lower panel)
- Expression of IL-4R α (CD124) in MDSC subpopulations and granulocytes. Representative histogram of CD124 expression (left panel) and MFI for 3 patients are shown (right panel).

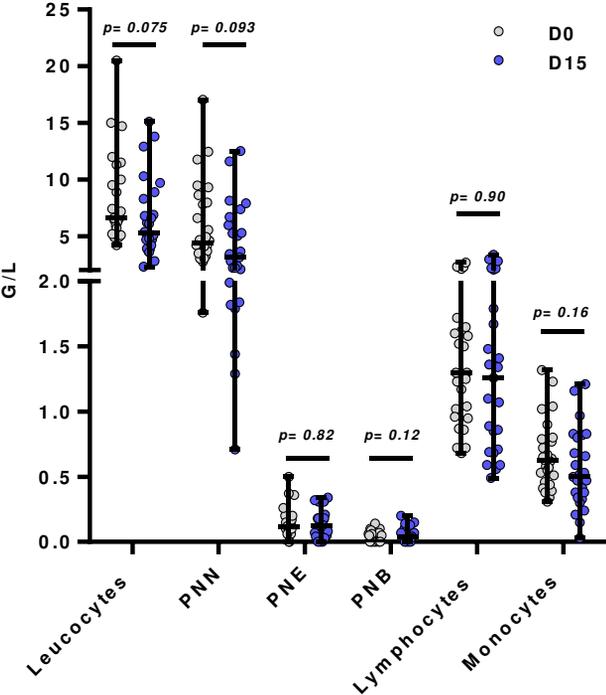
Supplementary Figure 3: Blood parameters in Healthy volunteers versus mCRC patients



Supplementary Figure 4: IFN- γ and IL-17A secretion by CCR6 and CXCR3 expressing CD4 T cells



Supplementary Figure 5: Blood parameters in mCRC patients, D0 versus D15



Supplementary Figure 6: mRNA relative expression of genes involved in immunosuppression

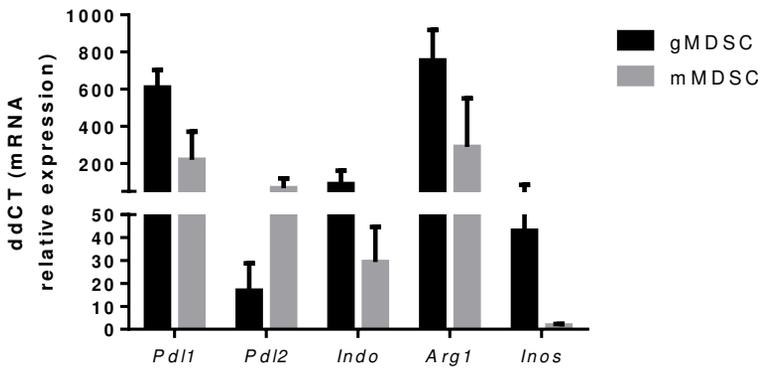
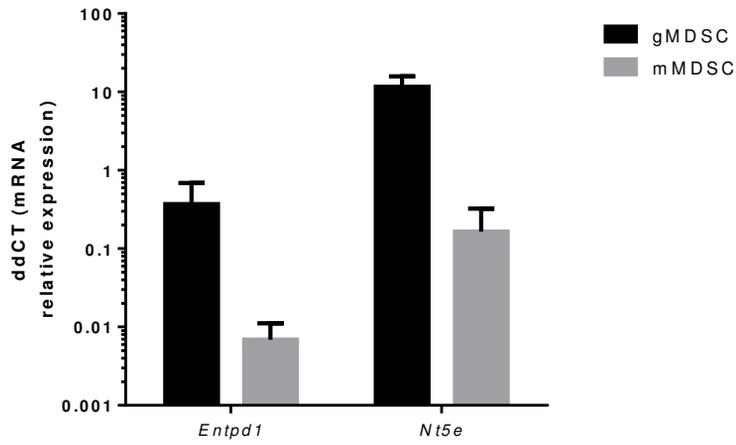


Table 1 : Patients (N = 25) and healthy volunteers (N = 20) characteristics

Patients Characteristics

Age (years)

< 50 years (%)	2 (8%)
> = 50 years (%)	23 (92%)
median (SEM)	69 (10.6)
mean (SD)	66.5 (13.7)

Sexe

M (%)	14 (56%)
F (%)	11 (44%)

Primary tumor origin

Colon (%)	20 (80%)
Rectum (%)	5 (20%)

Mutations

Ras (Yes/No)	42.3/57.7%
Raf (Yes/No)	11.5/88.5%

Metastatic sites (number)

median (SEM)	1 (0,47)
mean (SD)	1.1 (0.79)

LDH (U/L)

median (SEM)	6.60 (2.52)
mean (SD)	7.64 (3.41)

Phosphatase Alcaline (U/L)

median (SEM)	107.0 (104.7)
mean (SD)	178.7 (184.1)

ACE (µg/L)

median (SEM)	15.5 (2308.8)
mean (SD)	(5059.5)

Healthy Volunteers Characteristics

Age (years)

< 50 years (%)	3 (15%)
> = 50 years (%)	17 (85%)
median (SEM)	65 (6.76)
mean (SD)	63.2 (9.79)

Sexe

M (%)	10 (50%)
F (%)	10 (50%)

Table 2 -Human primer sequences used for RT-qPCR analysis

	Forward	Reverse
<i>ACTB</i>	5'-GTTGTCGACGACGAGCG-3'	5'-GCACAGAGCCTCGCCTT-3'
<i>Entpd1</i>	5'-AAATGAGCTGCTGGACTCCTC-3'	5'-CCCAGGTAAACGGGTGTCTC-3'
<i>Nt5e</i>	5'-CTCCTCTCAATCATGCCGCT-3'	5'-CAAATGTGCCTCCAAAGGGC-3'
<i>Arg1</i>	5'-ACGGAAGAATCAGCCTGGTG-3'	5'-GTCCACGTCTCTCAAGCCAA-3'
<i>Nos2</i>	5'-GCCATAGAGATGGCCTGTCC-3'	5'-TGCATCCAGCTTGACCAGAG-3'
<i>Indo</i>	5'-GATGAAGAAGTGGGCTTGC-3'	5'-CAGGCAGATGTTAGCAATGA-3'
<i>PDL1</i>	5'-ACAGCTGAATTGGTCATCCC-3'	5'-TGTCAGTGCTACACCAAGGC-3'
<i>PDL2</i>	5'-TAATCATCTATGGGGTCGCC-3'	5'-CCTCATCTGTTTCTGGAACCT-3'

Supplementary Material

Supplementary Figure 1: T_{Helper} gating strategy

Flow cytometry gating strategy to identify memory CD4 T cell subpopulations through chemokine receptor expression.

Supplementary Figure 2: MDSC gating strategy and IL-4R α expression analysis.

- A.** Flow cytometry gating strategy to identify MDSC subpopulations through CD33, Lin (=CD3, CD20, CD19 and CD56), HLA-DR, CD14 and CD15 marker expression. Pictures correspond to May-Grünwald Giemsa staining mMDSC and gMDSC isolated after cell sorting.
- B.** As in A, we identify MDSC subpopulations, granulocytes and monocytes and we have analyzed IL-4R α (CD124) expression in 3 mCRC patients.

Supplementary Figure 3: Blood parameters in Healthy Volunteers *versus* mCRC patients

Whole blood of Healthy volunteers and metastatic colorectal cancer patient (mCRC) was sample on EDTA-K2 tubes (BD Bioscience) and a complete blood count (CBC) was performed in Clinical Biology Unit (Centre George François Leclerc).

Supplementary Figure 4: IFN- γ and IL-17A secretion by CCR6 and CXCR3 expressing CD4 T cells

PBMCs of mCRC patients were stained after PMA/ionomycin/Brefeldin/Monensin stimulation (4 hrs) with anti-CD4, anti-CD45RA, anti-CCR6, anti-CXCR3, anti-IFN- γ and anti-IL-17A antibodies and analyzed by flow cytometry. The expression of IFN- γ and/or IL-17A on memory CD4 (CD45RA⁻ CD4⁺) Th1 (CCR6⁻ CXCR3⁺), Th17 (CCR6⁺ CXCR3⁻), Th17/Th1 (CCR6⁺ CXCR3⁺) and CCR6⁻ CXCR3⁻ cells is depicted.

Supplementary Figure 5: Blood parameters in mCRC patients, D0 versus D15

Whole blood of metastatic colorectal cancer patient (mCRC) was sample before (D0) and after chemotherapy (D15) on EDAT-K2 tubes (BD Bioscience) and a complete blood count (CBC) was performed in Clinical Biology Unit (Centre George François Leclerc).

Supplementary Figure 6: mRNA relative expression of genes involved in immunosuppression

gMDSC and mMDSC were cell sorted from four mCRC patient blood. mRNA were extracted and the expression of *Entpd1*, *Nt5e*, *Pdl1*, *Pdl2*, *Indo*, *Arg1* and *Inos* was determined using RT-qPCR.

Supplementary Table 1: Patient and Healthy volunteer's characteristics

Baseline characteristics (Age, Sex, Tumor origin, K-Ras and B-Raf status, number of metastatic sites, LDH, PA and CEA) of metastatic colorectal cancer patients (mCRC) and healthy volunteers.

Supplementary Table 2: Human primer sequences used for RT-qPCR analysis

Ce projet nous a permis de mettre en évidence plusieurs points :

1. Le profil immunologique périphérique est associé à la réponse au FOLFOX-bevacizumab :

- ✓ Les patients atteints de mCCR ont une augmentation des taux de gMDSC, de lymphocytes Th17 et T_{Reg}. La proportion initiale en cellules Th1 est plus faible.
- ✓ Le taux initial de gMDSC est associé à un moins bon pronostic
- ✓ Le traitement par FOFLOX- bevacizumab peut permettre une diminution des gMDSC dès la première cure de chimiothérapie (C1/C2). Cette chute est associée à une meilleure réponse au traitement
- ✓ Le traitement par FOFLOX-bevacizumab peut permettre une augmentation des Th17 dès la première cure de chimiothérapie (C1/C2). Cette augmentation est associée à une plus mauvaise réponse thérapeutique.

2. Caractérisation plus fine des MDSC humaines :

- ✓ L'analyse des cellules granuleuses nous a permis de mettre en évidence que l'expression du CD33 permettait de différencier les granulocytes matures non immunosuppresseurs (Lin⁻ CD15⁺ CD14⁻ CD33^{low} HLA-DR⁻) des granulocytes immatures et immunosuppresseurs (Lin⁻ CD15⁺ CD14⁺ CD33^{high} HLA-DR⁻), appelés gMDSC.
- ✓ L'analyse de PD-L1, CD39 et CD73 a montré que parmi les cellules myéloïdes, ce sont les gMDSC qui exprime le plus ces marqueurs.
- ✓ L'étude des sous-populations myéloïdes nous a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de PD-L1, CD39 et CD73 à la surface des gMDSC chez les patients porteurs d'un mCCR comparativement à des volontaires sains.
- ✓ L'activité immunosuppressive de ces cellules peut être inhibée par l'utilisation d'anticorps capables de neutraliser l'activité biologique des axes PD-L1/PD-1 et CD39/CD73.

Perspectives thérapeutiques pour la prise en charge du mCCR :

A l'heure actuelle, 50% des patients porteurs d'un mCCR recevant un traitement de première ligne par FOLFOX-bevacizumab progresse à nouveau de leur maladie dans les 8 à 10 mois suivant la première cure de chimiothérapie (Saltz *et al*, 2008). Notre travail montre que le taux initial des cellules gMDSC influence grandement la réponse au traitement et que son évolution au cours des deux premières cures de chimiothérapie est également associée au pronostic. La caractérisation des ces cellules, riches en PD-L1, CD39 et CD73, permet d'envisager l'association du FOLFOX-bevacizumab à une immunothérapie ciblant la voie PD-L1/PD-1 et/ou CD39/CD73. Cette association pourrait être proposé en particulier aux patients présentant un taux initial en gMDSC élevé et/ou une mauvaise évolution (augmentation) de ces cellules entre C1 et C2. Nous verrons également dans la

discussion qu'il pourrait être intéressant de repenser la stratégie thérapeutique des cancers coliques en se basant d'avantage sur l'état d'immunosuppression périphérique.

Concernant les cellules Th17, nous avons pu montrer que le taux initial de ces cellules n'est pas associé au pronostic, mais que c'est leur évolution entre C1 et C2 qui permet d'identifier les patients au pronostic plus sombre. Cette observation avait déjà pu être fait dans les modèles précliniques que nous utilisons au sein de notre laboratoire. Cet effet néfaste des Th17 avait été associé à une augmentation du processus angiogénique, ce qui dans le cas du cancer colorectal peut conduire à une inefficacité du bevacizumab. Nous pourrions donc imaginer d'associer le FOLFOX-bevacizumab à un agent thérapeutique capable d'inhiber les fonctions effectrices des cellules Th17 chez les patients qui présentent une élévation du taux de cette population entre C1 et C2. Nous pouvons penser notamment à l'utilisation d'un anticorps anti-IL-17A (Sécukinumab) ou encore aux inhibiteurs de JAK2 (Tofacitinib). Ces différentes combinaisons devraient être testées dans les modèles précliniques que nous avons à disposition afin de prouver *in vivo* leur efficacité.

Nous devrions également envisager de mettre en place un nouveau suivi immunologique des patients porteurs d'un mCCR afin de valider clairement le rôle pronostique des cellules gMDSC et Th17. Par ailleurs, la mise en place début 2017 d'un essai thérapeutique multicentrique piloté par le Centre-George François Leclerc (CGFL) nous permettra de répondre en partie à cette question. Cet essai a pour but d'évaluer l'association du FOLFOX avec un inhibiteur de PD-L1 et de CTLA4. Ces malades seront monitorés sur notre plateforme de transfert en biologie cancérologique du CGFL, où un profil immunologique périphérique global sera réalisé (cellules dendritiques, cellules myéloïdes immunosuppressives, monocytes, sous-types lymphocytaires Thelper, T-CD8 et Natural Killer, lymphocytes T_{Reg}). Une analyse de l'expression des récepteurs ciblés par les deux immunothérapies sera réalisée. Nous étudierons également l'expression d'autres récepteurs, qui pourrait avoir un rôle compensatoire et être à l'origine d'une résistance thérapeutique. Ces analyses seront effectuées avant et pendant le traitement ainsi qu'au moment de la progression. Une analyse du profil génétique (EXOME), du profil d'expression (RNAseq) et de l'infiltrat immunologique de la tumeur avant et pendant traitement sera réalisée. Ces différentes approches nous permettront d'identifier des marqueurs de réponse ou de non réponse à ces combinaisons thérapeutiques et d'identifier des mécanismes de résistances inné et/ou acquis. Nous pourrions également confirmer ou infirmer le rôle des cellules gMDSC circulantes dans la réussite thérapeutique du FOLFOX + immunothérapie.

PROJET 2

Sirtuin-1 (SIRT1) activation controls tumor growth by impeding Th17 differentiation *via* STAT3 deacetylation

Avant le début de ma thèse dans l'équipe du Pr. Ghiringhelli en février 2013, j'ai travaillé pendant trois ans sur les effets anti-cancéreux du resvératrol et de ces métabolites dans des modèles de cancer colique au sein de l'équipe du Pr. Delmas. Lors de mon diplôme EPHE, j'ai entre autre pu travailler autour des voies de signalisation précocement induites au sein de la cellule tumorale au moment de l'endocytose du resvératrol. Nous avons pu montrer que cette endocytose est dépendante des radeaux lipidiques et que *via* la fixation de l'intégrine $\alpha\beta3$, les voie ERK et JNK étaient activées, permettant ainsi d'induire l'apoptose des cellules tumorales (Colin and Limagne *et al*, 2011). Suite à ce projet, nous avons entrepris de mettre en évidence le rôle biologique des métabolites sulfatés et glucuronidés du resvératrol sur des lignées de cancer coliques et leur capacité à synergiser avec des agent thérapeutiques tel que le 5-FU, l'oxaliplatine ou encore l'irinotécan. Nous avons pu montrer que c'est le resvératrol-3'-sulfate qui possède la plus forte activité pro-apoptotique et que le combiner à la chimiothérapie permettait d'augmenter la mort des cellules tumorales (Aires and Limagne *et al*, 2013). A la suite de mon EPHE, en 2012, j'ai pu continuer d'explorer les propriétés du resvératrol, cette fois dans un contexte pathologique différent, celui de l'inflammation articulaire. Durant cette année, j'ai eu l'occasion de mettre en place un modèle primaire de co-culture chondrocytes/macrophages, induit par l'IL-1 β , une cytokine impliquée dans le processus de dégénérescence articulaire. Nous avons pu mettre en évidence que cette cytokine pouvait provoquer la mise en place d'un dialogue inflammatoire entre les chondrocytes et les macrophages dépendant des voies NF κ B et IL-6/STAT3. L'utilisation du resvératrol en tant qu'agent anti-inflammatoire, provoque une inhibition de cette boucle et retarde le processus de dégénérescence (Limagne *et al*, 2016b). C'est grâce à l'expérience acquise pendant ces quatre années et à l'intérêt que je portais aux travaux menés par l'équipe du Pr. François Ghiringhelli que le projet d'étudier l'impact du resvératrol et des agonistes de SIRT1 en générale sur la polarisation T-CD4⁺ a émergé. De nombreuses publications avaient déjà pu montrer que le resvératrol pouvait avoir un rôle anti-inflammatoire en modulant la voie STAT3. Il était donc logique de penser que ce polyphénol puisse inhiber la polarisation des Th17, qui est STAT3 dépendante. Lors des recherches bibliographiques réalisées afin d'identifier un lien entre le resvératrol, STAT3 et les Th17, l'article de Nie Y a particulièrement attiré mon attention. Cette étude montrait que le jeûne et les agonistes de SIRT1, permettaient d'activer la néoglucogenèse par la désacétylation de STAT3 (Nie *et al*, 2009). Le lien était donc trouvé : le resvératrol pourrait bloquer la polarisation des Th17 en activant SIRT1, ce qui empêcherait la polarisation Th17 *via* la désacétylation de STAT3. Pour être davantage relevant d'un point de vu thérapeutique et translationnel, nous avons aussi entrepris de tester différents agonistes de SIRT1, en particulier la metformine, un antidiabétique largement utilisé et qui a montré un rôle préventif dans l'apparition de plusieurs cancers digestifs, dont le cancer colorectal (Zhang *et*

al, 2011). L'intérêt de l'équipe du Pr. Ghiringhelli était déjà porté sur l'identification de stratégie permettant d'inhiber la polarisation des Th17 par des agents pharmacologiques (Berger *et al*, 2013; Chalmin *et al*, 2012).

Nous étions donc très curieux d'étudier le rôle des activateurs de SIRT1 sur les Th17 et l'impact biologique qui en résulte dans un contexte de cancer. L'article qui suit, à l'heure actuelle soumis pour publication, est donc le fruit de ces recherches.

Ce projet a été réalisé dans le cadre d'un programme régional d'excellence intitulé VSOP (« *Vitis Stilben Oligomers bioProduction* ») pour lequel j'ai reçu un financement d'ingénieur d'étude de 3 ans qui m'a permis de réaliser cette thèse à l'EPHE.

Sirtuin-1 (SIRT1) activation controls tumor growth by impeding Th17 differentiation *via* STAT3 deacetylation

**Emeric Limagne^{1,2,3*}, Marion Thibaudin^{1,2*}, Romain Euvrard^{1,2}, Hélène Berger^{1,2}, Pauline Chalons^{1,2},
Frédérique V  gan^{1,2,3}, Etienne Humblin^{1,2}, Romain Boidot^{1,2,3}, Cédric R  b  ^{1,2,3}, Valentin Derang  re^{1,2,3},
Sylvain Ladoire^{1,2,3,4}, Lionel Apetoh^{1,2,4**}, Dominique Delmas^{1,2**}, François Ghiringhelli^{1,2,3,4**}**

1 Univ. Bourgogne Franche-Comté, LNC UMR866, F-21000 Dijon, France

2 INSERM, LNC UMR866, F-21000 Dijon, France

3 Platform of transfer in Oncology Univ. Bourgogne Franche-Comté, Centre Georges François Leclerc, F-21000 Dijon, France

4 Centre Georges François Leclerc, Department of medical Oncology, F-21000 Dijon, France

*EL and MT share co authorship

**LA, DD and FG share co-senior authorship

*Authors declare that there is no conflict of interest

Corresponding authors, Requests for reprints:

Emeric Limagne : Centre de Recherche, INSERM U866, Facult  s de M  decine et de Pharmacie, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21079 Dijon, France. Phone: (33) 3-80-39-33-83; Fax: 33-3-80-39-34-34. E-mail : elimagne@cgfl.fr

Pr. François Ghiringhelli : Centre de Recherche, INSERM U866, Facult  s de M  decine et de Pharmacie, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21079 Dijon, France. Phone: (33) 3-80-39-33-53; Fax: (33) 3-80-39-34-34; E-mail: fgiringhelli@cgfl.fr

Running Title: SIRT1 blunts Th17 cell polarization and subsequent tumor growth

Abstract:

Sirtuin-1 deacetylates proteins and has emerged as a critical regulator of different cellular processes particularly inflammation. Using Sirt1 deficient mice, basal SIRT1 activity was found to limit Th9 and enhance Th17 differentiation, however, effect of pharmacological SIRT1 activation on T cell differentiation and antitumor response was never addressed. Here we show that SIRT1 pharmacological agonists selectively impede mouse and human Th17 cell differentiation. SIRT1 activation induces STAT3 deacetylation, thus reducing its ability to translocate into the nucleus, bind to *Rorc* promoter and induce its transcription. *In vivo*, SIRT1 agonists reduce tumor growth in mice by blocking Th17 cell differentiation. In cancer patients, the SIRT1 agonist metformin reduced the frequency of Th17 cells and their STAT3 acetylation level. Altogether, these data underscore that SIRT1 activation impedes Th17 cell differentiation and thereby limits tumor growth. Such data raise the rationale to use SIRT1 activators like metformin to directly target IL-17A protumor functions.

Keywords: SIRT1, Th17, STAT3, ROR γ t, cancer

Introduction:

Th17 cells develop from naïve CD4⁺ T cells in the presence of TGF-β and IL-6 and are maintained long-term in the presence of IL-21 and IL-23¹. Th17 cells are characterized by their capacity to secrete IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, and CCL20^{2,3}. The initiation of their transcriptional program is dependent on STAT3, IRF4, BATF and also is controlled by the master transcription factors retinoic acid-related orphan receptors *RORγt* and *RORα*^{4,5}. The role of Th17 cells in cancer is controversial with positive and negative effects described in both mouse and human cancers. Th17 cells can be separated into two different subsets with either regulatory or inflammatory properties depending on the stimuli they encounter. These divergent phenotypes may explain why Th17 cells have potent antitumor properties in some experimental settings while promote tumor growth in others⁶. In the context of human colorectal cancer, Th17 cells that infiltrate the tumor bed are often associated with a poor prognosis, suggesting that targeting such cells may have clinical relevance in this disease⁷. Two main mechanisms explain why Th17 cells can favor tumor outgrowth. IL-17A is known to promote tumor angiogenesis and stimulate VEGF-A production^{8,9}. In addition IL-17A induces STAT3 activation in cancer cells, thus enhancing their resistance to apoptosis and promoting their proliferation¹⁰. We and others have shown that targeting IL-17A or Th17 *in vivo* restrains tumor growth¹¹⁻¹³, thus supporting the development of pharmacological tools that could limit Th17 cell induction.

The transcription factor STAT3 is essential for Th17 cell differentiation. STAT3 is required for the initiation of the Th17 cell transcriptional program and regulates the expression of several essential genes for Th17 cell development⁴. STAT3 directly binds to the promoters of *Il17a* and *Il17f* and also controls chromatin accessibility at these loci. STAT3 activation, which is driven by the Th17-differentiating cytokines, requires STAT3 phosphorylation on Tyrosine 705 and Serine 727¹⁴. In addition to phosphorylation, it was observed in different cell types that the transcriptional activity of STAT3 can be regulated by acetylation on Lysine 685, mediated by the acetyltransferase p300 and inhibited by Sirtuin 1 (SIRT1). This modification is required for STAT3 dimerization, phosphorylation of Tyrosine 705

and transcriptional function^{15,16}. However, the role of STAT3 acetylation and its regulation in T cells is elusive. Here, we found that pharmacological SIRT1 activation selectively impedes Th17 development by limiting STAT3 acetylation in mouse and human, thus demonstrating the role of STAT3 acetylation for Th17 differentiation. Such observation has clinical relevance as illustrated by limitation of Th17-dependent tumor growth in mouse models upon SIRT1 activation.

Results:

SIRT1 activation selectively blunts Th17 differentiation.

To test the role of pharmacological SIRT1 activation on CD4⁺ T cell differentiation in mice, we generated *in vitro* Th1, Th2, Th17 and iTreg from naïve CD4 T cells with TCR triggering and the appropriate cytokine cocktail in the presence or not of SIRT1 activators. We used resveratrol (Rsv), low dose metformin and SRT1720 as classical activators of SIRT1¹⁷⁻²³. We validated that low dose metformin induced SIRT1 activation as demonstrated by a global deacetylation of protein without AKT/mTor inhibition (SD1A). As a control, high doses of metformin induced both inhibition of AKT/mTor pathway (demonstrated by dephosphorylation of p70-S6K) and activation of SIRT1 (demonstrated by global deacetylation of protein) (SD1A). We observed using qPCR that SRT1720, Rsv and low dose of metformin specifically reduced *il17a* and *Rorc* mRNA expression in CD4 T cells during Th17 differentiation (Figure 1A) but did not affect *Ifng* and *Tbx21* mRNA expression during Th1 differentiation nor *il4*, *il5*, *il13* and *Gata3* mRNA expression during Th2 differentiation nor *Ctla4*, *Gitr* and *Foxp3* mRNA expression during iTreg differentiation (SD1B). Using ELISA we confirmed that only IL-17A production is reduced by the 3 SIRT1 activators (Figure 1B) while they did not affect IFN γ production by Th1 (Figure 1C) nor IL-4 and IL-13 production by Th2 (Figure 1D). Intracellular staining also showed that SIRT1 activators did not affect Foxp3 expression at the protein level in iTreg cells (Figure 1E). As a control, we observed that high dose of metformin which affects both SIRT1 and AKT/mTor pathway partially impeded Th1, Th2, Th17 and iTreg CD4 T cell differentiation (SD1B and figure 1A-E). To confirm that the effect of SIRT1 activators is specifically driven by SIRT1 activation we used CD4 T cells from transgenic mice with conditional invalidation of SIRT1 in CD4 T cells by crossing CD4-Cre mice with SIRT1-Flox mice. Such CD4 T cells were named CD4^{SIRT1^{-/-}} in the manuscript. These cells did not express SIRT1 protein upon western blotting analysis (SD1C). Sirt1 deficiency completely blunt the ability of the 3 SIRT1 activators to blunt Th17 polarization as demonstrated by their inability to reduce *Rorc* and *il17a* mRNA expression (Figure 1F and G) and IL-17A protein expression using ELISA (Figure 1H) and intracellular staining by flow cytometry (Figure 1I). Such data are surprising facing the

previous report from Lim *et al.*²⁴ showing that SIRT1 deletion enhance Th17 differentiation. In our setting we also observed that genetic or pharmacological inactivation of SIRT1 modestly but significantly enhance Th17 differentiation (Figure 1F-I), thus suggesting a biphasic role of Sirt1 on Th17 differentiation.

Together these data show that SIRT1 agonists selectively blunt murine Th17 polarization *in vitro*.

SIRT1 regulates IL-17A and ROR γ t expression by desacetylation of STAT3.

To determine the effect of SIRT1 agonists on Th17 transcriptional profile we performed kinetic analysis of Th17 related gene mRNA expression by qPCR in Th17 cells differentiated in the presence or not of SIRT1 agonist. We observed that expression of all Th17 related cytokines are impeded by addition of SIRT1 agonist (Figure 2A). Interestingly, in addition to cytokines, the gene the most rapidly affected by SIRT1 agonist is *Rorc*, with a significant downregulation after 2 hours of differentiation (Figure 2A). We confirmed that the rapid decrease in *Rorc* mRNA expression is mirrored by a decrease ROR γ t protein expression by western blotting performed 24 hours after induction of Th17 differentiation (Figure 2B). STAT3 is a transcription factor required for initiation of Th17 program and induction of *Rorc* mRNA expression²⁵. As STAT3 requires acetylation to exert its transcriptional function, we hypothesized that SIRT1 activation may affect STAT3 activation. We observed by western blotting that the 3 SIRT1 agonists reduced both STAT3 acetylation (K685) and STAT3 phosphorylation (Y705) (SD2A). STAT3 deacetylation by SIRT1 activator occurred after 6h of treatment and maintained at 24h (Figure 2B). In contrast STAT3 acetylation and phosphorylation were not affected in CD4^{SIRT1-/-} cells by SIRT1 activators (SD2B). Inhibition of SIRT1 using EX-527 did not affect STAT3 acetylation (Figure 2B). When we fostered on ROR γ t expression, we observed that ROR γ t expression is only detectable after 24h of differentiation (Figure 2B). While SIRT1 activator inhibited ROR γ t expression, inhibitor of SIRT1 modestly enhance ROR γ t expression (Figure 2B).

SIRT1 in addition to its capacity to deacetylate STAT3 is also known to be able to deacetylate ROR γ t, PPAR γ and p65^{24,26,27} some molecules involved in Th17 differentiation^{13,24,28}. To test if STAT3

deacetylation is involved in the effect of SIRT1 activator on Th17 differentiation we treated naïve CD4 T cells with either ROR γ t, PPAR γ , p65 or STAT3 inhibitor in presence or absence of SIRT1 activator and performed Th17 differentiation. We observed that SIRT1 activator enhanced the capacity of ROR γ t, PPAR γ and p65 inhibitor to blunt Th17 polarization while SIRT1 activator was unable to enhance the inhibitory effect of STAT3 inhibitor thus demonstrating that SIRT1 activator and STAT3 activator target the similar pathway. Together such data strongly suggested that the main effect of SIRT1 activator rely on its capacity to target STAT3 (SD2C).

STAT3 acetylation was previously shown to affect its ability to translocate into the nucleus²⁹. Using immunofluorescence we observed that Th17 differentiation induced STAT3 translocation from the cytoplasm into the nucleus. SIRT1 agonists blunted this nuclear translocation and maintained STAT3 in the cytoplasm (Figure 2C). Accordingly, STAT3 CHIP assay on 3 putative binding sites on *Rorc* promoter gene using nuclear extract of Th17 cells treated or not with SIRT1 agonists showed that STAT3 binding on *Rorc* promoter (Binding Site 3 (B.S3)) is dramatically impeded by the SIRT1 agonist treatment (no enrichment was observed on B.S1 and B.S2) (Figure 2D). STAT3 can heterodimerize with either the histone deacetylase SIRT1 or the histone acetylase p300 to regulate its acetylation. These interactions dictate the acetylation status of STAT3 and its ability to migrate into the nucleus to drive its transcriptional effect²⁹. In contrast, previous report shown that basal SIRT1 activity deacetylate ROR γ t²⁴. To determine if SIRT1 activation modifies such interactions in Th17 cells we performed proximity ligation assay using anti-STAT3, anti ROR γ t antibody and anti-SIRT1 or p300 antibodies. This experiment revealed that in absence of activator SIRT1 did not interact with STAT3 but with ROR γ t in Th17 (SD2D). p300 and STAT3 strongly interacted in Th17 nuclei compared to naïve CD4 T cells, thus corroborating the role of this complex in the induction of the Th17 program (Figure 2E). SIRT1 agonists strongly reduced p300-STAT3 interacting dots and enhanced the number of SIRT1 STAT3 interacting dots (Figure 2E). Importantly, most of these dots were found outside the nucleus (Figure 2E), thus supporting the hypothesis that SIRT1 is involved in STAT3 exclusion of the nucleus of CD4 T cells *via* its

deacetylase activity and a competition with p300 interaction. In presence of SIRT1 activator, SIRT1 do not interact with ROR γ t, thus confirming that in activating condition SIRT1 mostly act on STAT3 (SD2D).

Overall, our results support the hypothesis that SIRT1 interacts with STAT3 to deacetylate and maintain it outside the nucleus of Th17 cells, thus preventing its association with p300 and the initiation of the Th17 program.

SIRT1 inhibition blunts *in vivo* Th17 polarization.

We previously demonstrated during B16F10 melanoma tumor growth that Th17 accumulate in both tumor bed and draining lymph nodes^{30,31}. Using metformin to activate SIRT1 *in vivo*, we observed a reduction of IL-17A expressing CD4 T cell frequency in tumor bed and draining lymph nodes of B16F10 tumor-bearing mice (Figure 3A and B). In contrast metformin did not affect IL-17A expressing CD4 T cell frequency in transgenic CD4^{SIRT1^{-/-}} mice in this setting of subcutaneous transplanted B16F10 tumors (Figure 3A and B). As a control, we observed that metformin did not affect Th1, Th2 and iTreg frequency (SD3). Similarly, to *in vitro* data we observed a reduction of STAT3 acetylation in Th17 infiltrating cells in mice after metformin treatment and this reduction was not observed in Th17 from CD4^{SIRT1^{-/-}} mice (Figure 3C).

Together these data underscore that *in vivo* pharmacological SIRT1 activation in CD4 T cells reduces Th17 polarization and STAT3 acetylation without affecting other T helper differentiation in the context of cancer.

The anticancer therapeutic effects of SIRT1 agonists rely on their ability to target IL-17A.

IL-17A was shown to contribute to tumor growth by different mechanisms notably by its ability to promote tumor angiogenesis (9). In B16F10 and CT26 models, two models of subcutaneous transplantable tumors in C57BL/6 and Balb/C mice respectively, we observed that metformin and Rsv delayed tumor growth (Figure 4A and B). This effect was blunted by the SIRT1 antagonist EX-527 (Figure 4A and B). Similar results were observed in the B16F10 metastasis lung tumor model (Figure 4C). The effect of SIRT1 agonist was completely dependent on T cells because in the two tumor models the

treatment efficacy was completely blunted in athymic nude mice (Figure 4D and E). As SIRT1 agonist reduced Th17 cell polarization and IL-17A production without affecting other T helper polarization, we searched for a role of IL-17A in the therapeutic effect of SIRT1 agonist. B16F10 tumor progression is reduced in IL-17A deficient mice (Figure 4F). Importantly, while metformin and Rsv reduced tumor growth in WT mice, these drugs had no effect in *IL17a*^{-/-} mice thus demonstrating that IL-17A was required for the antitumor effect of SIRT1 agonists (Figure 4F). Similar results were observed in the CT26 model using IL-17A neutralizing antibody (Figure 4G). In the setting of B16F10 tumor, IL-17A production was observed in the tumor bed. This IL-17A production is reduced by metformin or Rsv and restored by EX-527 (SD4A). Finally, to validate that the effect of SIRT1 agonist is related to its specific effect on CD4 T cells we treated CD4^{SIRT1}^{-/-} mice bearing B16F10 tumor with metformin. We observed that this treatment did not affect tumor growth in these mice (Figure 4H). Interestingly IL-17A deficiency and SIRT1 activation by metformin both reduced VEGF-A production by B16F10 tumor thus suggesting that IL-17A inhibition impacts on tumor growth *via* a reduction of proangiogenic factors (SD4A and B).

Together these data show that SIRT1 agonist antitumor effect in mice is dependent on T cells, IL-17A and on SIRT1 expression in CD4 T cells, thus suggesting that it relies on the downregulation of IL-17A secretion by Th17 cells.

SIRT1 agonists are also effective on human Th17 cells

We tested the ability of SIRT1 agonists to impede *in vitro* differentiation of naïve human T cells from blood healthy donors, into Th17 cells. We cell sorted CD4⁺ CD45RA⁺ cells from blood and differentiated them with IL-6 plus IL-23 and TGFβ with TCR triggering as previously described³²⁻³⁵. We observed that adding Rsv, SRT1720 or low dose metformin reduced STAT3 acetylation (Figure 5A). As for our mouse study, we selected a dose of metformin that did not affect the AKT/mTor pathway as demonstrated by persistence of AKT phosphorylation and absence of the inhibitory phosphorylation of Serine 792 of Raptor (Figure SD5A). SIRT1 agonists reduced *il17a* and *Rorc* mRNA expression during

Th17 differentiation (Figure 5B). At the protein level we confirmed that SIRT1 inhibitors reduced IL-17A protein production using ELISA (Figure 5C) and ROR γ t expression using western blotting (Figure 5D). Importantly the SIRT1 antagonist EX-527 restored IL-17A production and ROR γ t expression in Th17 differentiated from CD4 T cells treated by SIRT1 activators (Figure 5E and 5F). Using intracellular staining, we validated that SIRT1 agonists reduced IL-17A expression in human Th17 cells (Figure 5G). The SIRT1 antagonist EX-527 restored IL-17A expression (Figure 5G). Like in mouse settings, we also observed that SIRT1 activators did not affect *Ifng* and *Tbx21* mRNA expression in Th1, *Gata3*, *il4*, and *il13* mRNA expression in Th2 and *Ctla4*, *Gitr* and *Foxp3* mRNA expression in iTreg cells generated *in vitro* (SD5B).

Using PBMC from blood healthy donors, we isolated by flow cytometry memory CD4 T cell subpopulations using chemokine receptor labelling as previously described^{36,37}. Th1 (CXCR3⁺ CCR6⁻), Th2 (CXCR3⁻ CCR6⁻ CCR4⁺), iTreg (CD25⁺ Foxp3⁺) and Th17 cells (CXCR3⁻ CCR6⁺) were characterized (SD6A). We validated the purity of each subset by ELISA and qPCR as we previously reported³⁷. Th17 cells were treated *ex vivo* with SIRT1 agonists during 24 hours with TCR stimulation in presence of Th17 polarizing cytokines. Using qPCR we observed that such treatment reduced *Rorc* and *il17a* mRNA expression in Th17 cells (Figure 5H). We validated that SIRT1 agonists reduced IL-17A production in Th17 by ELISA (SD6B) and by intracellular staining (SD6C). This effect is blunted by the SIRT1 antagonist EX-527 (SD6D and 6F).

Together these data demonstrate that SIRT1 agonists blunt selectively *in vitro* differentiation of human naïve T cells into Th17 cells but also Th17 program of memory Th17 cells.

Administration of the SIRT1 agonist Metformin to metastatic colon cancer patients blunts IL-17A production by blood Th17 cells.

To test the clinical relevance of our observations, we determined the effect of the SIRT1 agonist metformin in patients bearing metastatic colorectal cancer. We focused on metastatic colorectal cancer because previous reports have shown an accumulation of Th17 cells in PBMCs and that IL-17A

in tumors is associated with poor prognosis³⁸. We selected metastatic colorectal cancer patients still untreated by chemotherapy and diagnosed with a non insulin-dependent diabetes and for whom a treatment by metformin (500mg per day bid) was proposed by the oncologist. We could include 10 patients (7 Men and 3 Women; mean age of 65 years, clinical and biological characteristics of the patients are presented in SD7 and Supplementary Table 1). Blood samples were obtained before and after one month metformin treatment initiation. Using CXCR3 and CCR6 labelling, we tested STAT3 acetylation in Th17 cells (Figure 7A). We observed that the treatment induced a down regulation of STAT3 acetylation in Th17 lymphocytes (Figure 7B). The frequency of each T helper subset is not affected by this treatment (Figure 7C). However, the frequency of IL-17A producing Th17 cells determined by intracellular staining is significantly reduced by metformin treatment (Figure 7D). In contrast, the frequency of IFN γ production by Th1 cells and Foxp3 expression by Treg cells is not affected by the treatment (Figure 7D).

Together these data corroborate that *in vivo* metformin deacetylates STAT3 and reduces the production of IL-17A by Th17 cells in metastatic colorectal cancer patients.

Discussion:

This manuscript shows the important role of SIRT1 in Th17 differentiation in both mice and humans. In particular, we observed that SIRT1 pharmacological activation induces STAT3 deacetylation. This deacetylation limits STAT3 ability to migrate into the nucleus of Th17 cells, and as a consequence refrains the initiation of the Th17 transcriptional program. Interestingly, we observed that SIRT1 activation could blunt Th17 differentiation program in both mice and humans. In the context of human memory Th17 cells, *ex vivo* treatment of memory cells also impede the Th17 program thus demonstrating that SIRT1 activation could affect both the initiation and the maintaining of the Th17 cell program. In the context of growing tumors, mouse treatment with SIRT1 activators reduce Th17 infiltration and limit IL-17A dependent tumor growth. Metformin treatment used as SIRT1 agonist therapy in patients with a colorectal cancer reduces Th17 cell activation and STAT3 acetylation thus suggesting that metformin could be used in cancer patients as a Th17 cell immunomodulator.

SIRT1 is a member of the family of class III deacetylases (NAD⁺-dependent). This enzyme is involved in the control of many cellular pathways, including metabolism, stress and genome stability. In the context of T cell biology, SIRT1-deficient mice show increased T cell activation and a breakdown of CD4⁺ T cell tolerance. SIRT1 interacted with and deacetylated c-Jun, thus resulting in an inactive AP-1 factor. SIRT1-deficient mice were unable to maintain T cell tolerance and developed severe experimental allergic encephalomyelitis, a Th17 dependent disease as well as spontaneous autoimmunity³⁹. Similar results were also obtained by another team using resveratrol as a SIRT1 activator and observed that such treatment could globally reduce T cell activation⁴⁰. This led to the hypothesis that SIRT1 may have a general role in the control of excessive autoimmune responses. In contrast, in reports using CD4^{SIRT1^{-/-}} mice to investigate the role of SIRT1 deletion specifically in the CD4 T cell compartment, authors observed that SIRT1 invalidation does not affect function of effector cells in contrast to the previous report generated using SIRT1 knock-out mice. This difference may be explained by the effect of SIRT1 in other cells such as myeloid cells. In CD4^{SIRT1^{-/-}} mice, Treg numbers

and their suppressive function are increased. It was reported that Foxp3 is deacetylated by SIRT1, and SIRT1 inhibition leads to increased Foxp3 acetylation, which makes Foxp3 more resistant to proteasomal degradation, and thus stabilizes it post-translationally^{41,42}. Such SIRT1 inactivation promotes prolonged allograft survival and limits development of experimental colitis and thus suggesting that SIRT1 inhibition could be deleterious in cancer. Together these data suggest that SIRT1 activity in CD4 T cells is proinflammatory by limiting the Treg transcriptional program. In the context of Th9 differentiation, SIRT1 controls mTOR-HIF1 α signaling, inhibited Th9 cell differentiation and limit Th9 dependent antitumor immunity⁴³. Recently, Lim *et al.*²⁴ tested the role of basal SIRT1 function in a transgenic model using mice generated by crossing Flox-SIRT1 mice with RORc-Cre mice, leading to the specific deletion of SIRT1 in ROR γ t-expressing cells. In this model, they observed that SIRT1 deletion enhances ROR γ t transcriptional activity and enhances Th17 cell generation and function. The mechanism relies on the ability of SIRT1 to induce deacetylation of ROR γ t thus enhancing its transcriptional activity. Similar results were also observed in our experiments. Importantly this report and all other reports which addressed SIRT1 function in T cells only focuses on the basal effect of SIRT1 without activation and not its pharmacological activation. Our study unravels a biphasic role of SIRT1 on Th17 polarization with a capacity to induce Th17 differentiation on basal status and a capacity to impede Th17 differentiation after pharmacological activation. Previous reports suggested that some endogenous proteins like AROS could modestly activate SIRT1 function in comparison to ligand such as resveratrol⁴⁴. We therefore could speculate that endogenous activation of SIRT1 enhances Th17 function by deacetylation of ROR γ t while high activation of SIRT1 *via* pharmacological activators in therapeutic setting induces inhibition of Th17 differentiation *via* STAT3 deacetylation.

SIRT1 regulates a wide variety of cellular functions. SIRT1 was shown to deacetylate histone like H3K9 thus leading to the induction of repressive transcriptional complex⁴⁵. SIRT1 can act on many non-histone proteins, including transcription factors, transcriptional coregulatory proteins and on histones. These functions mediate stress resistance, apoptosis, hypoxia, inflammatory signaling, and autophagy as physiological responses to environmental toxicity. While SIRT1 was previously shown to

deacetylate STAT3 in gastric cancer cells⁴⁶, keratinocyte⁴⁷, liver cells¹⁶, the effect of SIRT1 on STAT3 acetylation and the role of STAT3 acetylation in CD4 T cells has not been explored. Our work shows that SIRT1 activation induces competition between p300 and SIRT1 in Th17 cells thus leading to deacetylation of STAT3, its absence of migration into the nucleus and reduction of its transcriptional function on the Th17 program. However, we cannot exclude that SIRT1 could also act on epigenetic modifications of histones or other transcription factors that could affect Th17 cell differentiation.

Many studies describe some anticancer properties of SIRT1 agonist like SRT1720¹⁷ or resveratrol⁴⁸. In addition, the commonly used antidiabetic drug metformin could induce SIRT1 expression and activation in an AMPK dependent manner⁴⁹. The anticancer effect of metformin is currently well known clinical and experimental but the mechanism of action of metformin remains obscure. Metformin was shown to exert both chemopreventive and chemotherapeutic activities. Notably it has been shown that cancer rates in diabetics using metformin are lower than in patients using other insulin sensitizing agents or insulin⁵⁰⁻⁵². In addition metformin is known to affect tumor growth and cancer prognosis in different mouse and human cancers⁵³⁻⁵⁵. The typically used concentrations in such studies are 5–30 mM, which are much higher than the plasma and tissue concentrations measured in individuals who have received recommended therapeutic doses, and less than 1 mM of metformin has little effect on cancer cell proliferation. So we decide to use in vitro dosage of 0.5mM that do not affect mTor. In addition, the relevance of in vitro dosage is experimentally validated by the in vivo results in mice and human which give similar results. In the context of inflammatory disease or hepatocellular carcinoma high dosage of metformin reduces Th17 cells but this effect is dependent on mTor pathway inhibition^{56,57}. The respective role of SIRT1 activation *versus* mTor inhibition was neither tested and the link between metformin effect on SIRT1 and Th17 polarization was not tested. Our model highlights a new function of SIRT1 activators as defined by the selective targeting of SIRT1 and not mTor pathway *in vitro* and *in vivo* in mice and humans. Using this strategy, we observed that SIRT1 activators blunt only Th17 polarization and affect tumor growth only

in immunocompetent mice. Moreover, metformin antitumor effect is aborted in CD4^{SIRT1^{-/-}} mice in our settings. Together, such data suggest that only low dose of metformin can selectively modulate the SIRT1 pathway. Such treatment affects tumor growth mostly by targeting Th17 polarization in a SIRT1 dependent manner.

In conclusion, our study unravels the particular ability of pharmacological activation of SIRT1 to limit STAT3 acetylation in Th17 cells thus limiting the STAT3 dependent initiation of the Th17 program. We propose that pharmacological activation of SIRT1 using low dose of metformin could be a valuable tool to control deleterious Th17 expansion in cancer patients.

Materials and Methods:

Mouse strains

All animals were bred and maintained according to both the Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA) and the Animal Experimental Ethics Committee Guidelines (University of Burgundy, Dijon, France). Animals were used between 6 and 22 weeks of age. Female C57BL/6, BALB/c and Nude mice were purchased from Centre d'élevage Janvier and from Charles River Laboratories. *IL17a^{-/-}* and fl-CD4/SIRT1-Cre mice were provided by the CDTA (Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal) and distributed by EMMA (European Mouse Mutant Archive, a service funded by the EC FP7 Capacities Specific Programme).

Tumor growth experiments

B16F10 melanoma and CT26 colon cancer cells were cultured at 37°C under 5% CO₂ in DMEM high glucose and RPMI-1640 respectively with GlutaMax-1 (Lonza) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (Lonza), 1% penicillin, streptomycin, amphotericin B (Gibco), 4 mmol/L HEPES (Gibco), and 1 mmol/L sodium pyruvate (Gibco). B16F10 and CT26 cells were obtained from American Type Culture Collection. All cells were routinely tested for Mycoplasma contamination using Mycoalert Mycoplasma Detection Kit (Lonza) and were found to be negative. To induce tumor formation, 2×10⁵ B16F10 or 4×10⁵ CT26 cancer cells were injected subcutaneously into mice. Alternatively, 2×10⁵ B16F10 cells were injected intravenously into mice. Lung tumor foci were counted after 13 days by researchers 'blinded' to sample identity. *In vivo* IL-17A neutralization was respectively achieved by injecting 200 µg intraperitoneally (i.p.) of an anti-IL-17A antibody (clone 17F3; BioXCell) on day 0, 1, 2, 3, 4, and 6 following tumor implantation. Alternatively, intraperitoneally injections of metformin (150 mg/kg/day) or resveratrol (35 mg/kg/day) were achieved on day 7 following tumor implantation. *In vivo* SIRT1 inhibition was achieved by injecting 1mg/kg/day of EX-527 (Cayman). All treatment is not performed

the weekend. All tumor growth experiments were carried out in accordance with guidelines prescribed by the Ethics Committee at the University of Burgundy.

In vitro T cell differentiation

Naïve CD4⁺ T cells (CD4⁺ CD62L^{hi}) were obtained from spleens and lymph nodes of C57BL/6 wild-type (WT) or fl-CD4/Sirt-1-Cre mice. CD4⁺ T cells were purified from spleen and lymph nodes with anti-CD4 microbeads (Miltenyi Biotec), then were further sorted as naïve CD4⁺CD62L^{hi} T cells. Isolated naïve T cells were routinely 98% pure. Isolated naïve CD4⁺ T cells were stimulated with plate-bound antibodies against CD3 (145-2C11, 2 µg/mL; BioXCell) and CD28 (PV-1, 2 µg/mL; BioXCell) and polarized into effector CD4⁺ T lymphocyte subsets with cytokines. Mouse IL-4 (20 ng/mL), IL-6 (25 ng/mL), IL-12 (10 ng/mL) and TGF-β (2 ng/mL) were all purchased from MiltenyiBiotec. Anti-IL-4 (clone 11B11; 10 µg/mL) and anti-IFNγ (clone XMG1.2; 10 µg/mL) antibodies were obtained from Bio-XCell. In experiments, metformin, resveratrol and SRT1720 which are classical activators of SIRT1 have been added at the final concentration of 0.5 and 5 mM (Sigma Aldrich), 10 µM (Sigma Aldrich) and 1 µM (Cayman), respectively. In some experiments, EX-527, a classical inhibitor of SIRT1, has been added at the final concentration of 250 nM (Cayman). In one experiment, four different inhibitors were used in a three dose effect respectively chosen according to IC50 of each one. Digoxin (Tocris), a RORγt inhibitor and ACHP (Tocris), a p65 inhibitor, have been added at the final concentration of 5, 50 and 500 nM. GW9662 (Tocris), a PPARγ inhibitor, has been added at the final concentration of 0.12, 0.6 and 3 nM and Cucurbitacin I (Cayman Chemical), a STAT3 inhibitor has been added at the final concentration of 20, 100 and 500 nM. Cells were classically harvested on day 3 (unless otherwise specified) for detection of cytokines by ELISA and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis.

Human sample

Experiments on human CD4⁺ T cells were carried out using peripheral blood from healthy volunteers (provided by the “Etablissement Français du Sang” Besançon, France). Written informed consent was obtained from all healthy blood donors. Anti-CD45RA-APC-Vio770 (T6D11) and anti-CD4-VioGreen

(VIT4) were purchased from Miltenyi Biotech and were used to sort out naïve CD4 T (CD4⁺ CD45RA⁺) cells.

Naïve CD4 T cells or memory Th17 cells were sorted from blood of healthy volunteers, followed by activation with plate-bound antibodies against CD3 (OKT3; 2 µg/ml; Bio-Xcell) and CD28 (CD28.2; 2 µg/ml; Bio-Xcell). Naïve CD4 T cells were differentiated for 3 days into effector CD4 T lymphocyte subsets with cytokines and memory CD4 T cells were restimulated in the presence of the same cytokines (IL-6, IL-23 and TGF-β). Human IL-4 (10 ng/mL), IL-6 (10 ng/mL), IL-12 (10 ng/mL), IL-23 (10 ng/mL) and TGF-β (5 ng/mL) were all purchased from Miltenyi Biotech. Anti-IL-4 (clone MP4; 7 µg/mL; BioLegend) and anti-IFNγ (clone NIB42; 7 µg/mL; BioLegend) antibodies were obtained from Bio-XCell. In some experiments, metformin, resveratrol, SRT1720 or EX-527 have been added as previously described.

Patients

Between January 2014 and December 2015, we collected whole blood from metastatic colorectal cancer (mCRC) patients ($n=10$) in the anticancer center G.F Leclerc. mCRC patients were diagnosed in our center. Because of concomitant diagnosis of diabetes and cancer, a metformin treatment (500mg twice a day) was introduced. A blood sample was harvested before initial treatment with metformin and 1 month later. All patients gave informed consent approved by the local Ethics Committee. The collection of blood sample is authorized by the French authorization N° (AC2014-2460). No additional blood than blood required for routine testing was taken.

Flow cytometry

Antibodies and cytometry procedure

Anti-CXCR3-PE-Vio700 (REA232), anti-CCR6-PE (REA190), anti-CD25-APC (4E3), anti-CD45RA-APC-Vio770 (T6D11), anti-CD4-VioGreen (VIT4), anti-IFNγ-APC (45-15), anti-RORγt-APC (REA278) and anti-Foxp3-PE (3G3) were purchased from Miltenyi Biotech. Anti-CCR4-BrilliantViolet421 (1G1) was

purchased from BD Biosciences. Anti-Tbet-PacificBlue (4B10) and anti-IL17A-PacificBlue (BL168) were purchased from BioLegend. Anti-acetyl-STAT3-K685 was purchased from Cell Signaling Technology and was conjugated with a goat anti-rabbit-Alexa405 (Life Technologies). All events were acquired by a BD LSR-II cytometer equipped with BD FACSDiva software (BD Biosciences) and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, Oregon).

Leucocyte population identification

Written informed consent was obtained from all metastatic colorectal cancer patients. For leucocyte identification by flow cytometry, whole blood removed to heparinized tube, 100 μ L of whole blood were stained with different antibody cocktail during 45 minutes. For Treg (CD4⁺ CD45RA⁻ CD25⁺ Foxp3⁺) analysis we used CD4, CD45RA, CD25 and Foxp3 antibodies and for others T_{Helper} subsets (Th1: CD4⁺ CD45RA⁻ CCR6⁻ CXCR3⁺, Th2: CD4⁺ CD45RA⁻ CCR6⁻ CXCR3⁻ CCR4⁺, Th17: CD4⁺ CD45RA⁻ CCR6⁺ CXCR3⁻) we used CD4, CD45RA, CD25, CCR6, CXCR3, CCR4. After surface staining, 2 mL of red blood cells lysis solution (BD Biosciences) were added during 10 minutes, centrifuged (400 g, 5 minutes) and then resuspended in flow cytometry buffer (eBiosciences). Foxp3 or Acetyl-STAT3 staining was carried out according to the manufacturer's protocol using the fixation/permeabilization solution (eBiosciences). The gating strategy is described in Supplementary Figure 6.

Measurement of cytokines

After a 72-hour polarization, cell culture supernatants were assayed by ELISA for mouse IL-4 (BD Biosciences), IL-13 (eBiosciences), IL-17A (Biolegend), IFN γ (BD Biosciences), VEGF-A (eBiosciences) or human IL-17A (Biolegend) according to the manufacturer's protocol.

For intracellular cytokine staining, cells were cultured for 3 days and then stimulated for 4 hours at 37°C in culture medium containing phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 50 ng/mL; Sigma-Aldrich), ionomycin (1 μ g/mL; Sigma-Aldrich) and monensin (GolgiStop; 1 μ L/mL; BD Biosciences). After staining for surface markers, cells were fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions (Fixation/Permeabilisation kit, eBiosciences), then stained for intracellular products. Monoclonal

antibody (mAb) used for mouse surface marker staining was FITC-conjugated anti-mouse CD4 (GK1.5; Miltenyi). Monoclonal antibodies used for intracellular staining were as follows: eFluor[®]450-conjugated anti-mouse IL-17A (eBio 17B7; eBiosciences), Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-mouse Foxp3 (FJK-16s; eBiosciences), PacificBlue-conjugated anti-human IL-17A (BL168; BioLegend), Allophycocyanin (APC)-conjugated anti-human IFN γ (45-15; Miltenyi), APC-conjugated anti-human ROR γ t (REA278; Miltenyi), Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human Foxp3 (3G3; Miltenyi), PacificBlue-conjugated anti-human Tbet (4B10; BioLegend).

Western Blotting analysis

Purified naïve T cells were differentiated for 6 or 24 hours into Th17 cells with or without metformin, resveratrol, SRT720 or EX-527, then collected and pelleted by centrifugation (5 minutes, 450g, 4°C). Cells were lysed in boiling buffer [1% SDS, 1 mM sodium orthovanadate, and 10 mM Tris (pH 7.4)] containing protease inhibitor cocktail for 20 minutes at 4°C. Cell lysates were subjected to sonication (10 seconds at 10%) and protein concentration was assessed using the Bio-Rad DC Protein Assay Kit. Proteins were then denatured, loaded, and separated on SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell). After blocking with 5% nonfat milk in Phosphate-Buffered Saline containing 0.1% Tween 20 (PBST), membranes were incubated overnight with primary antibody diluted in PBST containing 5% BSA, washed and incubated for 1 hour with secondary antibody diluted in PBST–5% nonfat milk. After additional washes, membranes were incubated with luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology) and exposed to X-ray films. The following mouse monoclonal antibody was used: anti- β -actin (Sigma-Aldrich). The following rabbit monoclonal antibodies were used: anti-STAT3, anti-acetyl-STAT3-K685, anti-phospho-STAT3-Tyr705, anti-Raptor, anti-phospho-Raptor-S2448, anti-phospho-Raptor-S792, anti-p70s6kinase, anti-phospho-p70s6kinase-Thr389, anti-AKT and anti-phospho-AKT-Thr308 (Cell Signaling Technology). The following rat monoclonal antibody was used: anti-ROR γ t (eBiosciences). Secondary antibodies HRP-conjugated polyclonal goat anti-mouse (Jackson

ImmunoResearch), polyclonal goat anti-rabbit (Cell Signaling Technology) and polyclonal goat anti-rat (Santa Cruz Biotechnology) were also used.

Chromatin immunoprecipitation assay

Purified naïve T cells were differentiated for 6 hours into murine Th0 or Th17 cells with or without metformin, resveratrol or SRT720. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was conducted according to the manufacturer's instructions (ChIP-IT Express Enzymatic; Active Motif). Briefly, cells were fixed in a solution containing 37% formaldehyde for 10 minutes and quenched with 0.125 mol/L glycine. Chromatin was isolated and sheared to an average length of 300 to 500 bp by Enzymatic Cocktail. Twenty-five micrograms of DNA were immunoprecipitated with a STAT3-specific antibody (Cell Signaling Technology). After chromatin elution, cross-links were reversed by a Reverse Cross-linking Buffer and qRT-PCR was conducted. Data were normalized to *Actin-b* Ct values and expressed in fold enrichment according to immunoglobulin (Ig) values. Primers designed to assess ChIP assay are as follows: *Actb* 5'-actctttgcagccacattcc-3' and 3'-agcgtctggttccaataact-5'; *Rorc* 2293-2275 5'-tgagttggaggtcacctagg-3' and 3'-gtttattgtgcaccattgtgtg-5'; *Rorc* 592-574 5'-gtccagtgagtgctctcttct-3' and 3'-tatacttcctgcagcttgggc-5' and *Rorc* 392-374 5'-cagaggctgtctttctcttctcactc-3' and 3'-tttggatcccacatgataacc-5'.

Quantitative real-time PCR

Total RNA from T cells was extracted with TriReagent (Ambion), reverse transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), and was analyzed by RT-qPCR with the SYBR Green method according to the manufacturer's instructions using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Expression was normalized to the expression of mouse or human *Actb*. Primers designed to assess gene expression are as follows: *Actb mus musculus* 5'-atggaggggaatacagccc-3' and 5'-ttctttgcagctccttctg-3'; *Tbx21 mus musculus* 5'-atcctgtaatggcttgg-3' and 5'-tcaaccagcaccagacagag-3'; *Ifng mus musculus* 5'-tgagctcattgaatgcttgg-3' and 3'-acagcaaggcgaaaaaggat-5'; *Gata3 mus musculus* 5'-aggatgtccctgctctcctt-3' and 3'-gcctgcggactctaccataa-5'; *il4 mus musculus* 5'-

cgagctcactctctgtggtg-3' and 3'-tgaacgaggtcacaggagaa-5'; *il5 mus musculus* 5'-catttccacagtacccccac-3'
 and 3'-gcaatgagacgatgaggctt-5'; *il13 mus musculus* 5'-atgttggtcaggaatccag-3' and 3'-
 tgtgtctctccctctgacct-5'; *Foxp3 mus musculus* 5'-ctcgtctgaaggcagagtca-3' and 5'-tggcagagaggtattgaggg-
 3'; *Gitr mus musculus* 5'-ggctcttgcacatagtggt-3' and 3'-actcgatggcagttgcttg-5'; *Ctla4 mus musculus* 5'-
 tctctgaagccatacagtgac-3' and 3'-agaatccgggcatggttctg-5'; *Rorc mus musculus* 5'-
 ggtgataaccccgtagtga-3' and 5'-ctgcaaagaagaccacacc-3'; *il17a mus musculus* 5'-tgagcttccagatcacaga-
 3' and 3'-tccagaaggcctcagacta-5'; *Rora mus musculus* 5'-cccctactgttcttcacca-3' and 5'-
 tgccacatcacctctctctg-3'; *il17f mus musculus* 5'-ttgatgcagcctgagtgct-3' and 3'-aattccagaaccgctccagt-5';
il21 mus musculus 5'-aaaacaggcaaaagtgcat-3' and 3'-tgacattgtgaacagctgaaa-5'; *il22 mus musculus* 5'-
 tcgcttgatctctccactc-3' and 3'-gctcagctcctgtcacatca-5'; *il23r mus musculus* 5'-ctgaggttcgtgggatgatt-3'
 and 3'-aaaagaaactggcagccttg-5'; *il6 mus musculus* 5'-accagaggaaatttcaataggc-3' and 3'-
 tgatgcacttgagaaaaca-5'; *Irf4 mus musculus* 5'-caaagcacagagtcacctgg-3' and 3'-tgcaagctctttgacacaca-
 5'; *Batf mus musculus* 5'-cctggcaaacaggactcatct-3' and 3'-ggatcacgggagtagcatcg-5'; *cMaf mus musculus*
 5'-ggccatggaatatgtaagtactc-3' and 3'-ccgactggctgatgatg-5'; *Actb homo sapiens* 5'-ggtgtcgacgacgagcg-
 3' and 3'-gcacagagcctcgctt-5'; *Rorc homo sapiens* 5'-aagcaggagcaatggaagt-3' and 3'-
 gcaatctcatcctcgaaaa-5'; *il17a homo sapiens* 5'-cactttgctcccagatcac-3' and 3'-accaatccaaaaggctctc-
 5'; *Tbx21 homo sapiens* 5'-ccactgttggtccaagt-3' and 3'-accacgtccacaaacatcct-5'; *ifng homo sapiens*
 5'-gtattgctttgcgttgaca-3' and 3'-gagtggtgagagaccatcaagga-5'; *Gata3 homo sapiens* 5'-
 ttctctccagagtgtggt-3' and 3'-aaaatgaacggacagaaccg-5'; *il4 homo sapiens* 5'-gcaccgagttgaccgtaaca-3'
 and 3'-gcgagtgctcttctcatggt-5'; *il5 homo sapiens* 5'-ctcttgagctgcctacgtg-3' and 3'-ttccacagtacccccttg-
 5'; *il13 homo sapiens* 5'-gagctggtcaacatcaccca-3' and 3'-agctgtcaggttgatgctcc-5'; *foxp3 homo sapiens*
 5'-ttcctgaacccatgccac-3' and 3'-tgaatgtggcctgtcctggc-5'.

Immunofluorescence and in situ proximity ligation assay

0.5x10⁶ purified naïve T cells were differentiated or not for 6 hours into murine Th17 cells with or
 without metformin, resveratrol or SRT720. Cells were washed, then were fixed for 10 min at 4 °C with

4% PFA and were permeabilized for glacial methanol on ice. Non-specific binding in slides was blocked by incubation for 20 min at room temperature with a buffer of 0.5% BSA in PBS. Samples were then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies (identified below). For immunofluorescence experiments, cells were washed three times with PBS and were incubated for 30 min at room temperature with the secondary antibody Alexa Fluor 594–coupled anti-rabbit (identified below), then were washed three times with PBS. For proximity ligation assay experiments, after primary antibodies were washed out, cells were incubated for 1 h at 37 °C with the appropriate probes (identified below) and were washed two times with PBS. Probes were then ligated for 30 min at 37 °C and washed two times in Buffer A and were amplified for 100 min at 37 °C in the dark with polymerase (Sigma-Aldrich). For both experiments, cells were then mounted for 2 h in the dark on a drop of Mounting Medium containing DAPI (P36931; Molecular Probes) on a microscopy slide (045796; Dutscher). Slides were imaged with a charge-coupled device-equipped upright microscope (Zeiss) and 40× or 63× objectives with a numerical aperture of 1.4. Images were analyzed by ImageJ software.

The following antibodies were used for immunofluorescence and proximity ligation assays: anti-mouse STAT3 (124H6; Cell Signaling Technology), anti-rabbit p300 (sc-585, Santa Cruz Biotechnology), anti-rabbit SIRT1 (D60E1; Cell Signaling Technology), anti-rat ROR γ t (B2D, eBiosciences), anti-rabbit PLUS probe (1:5 dilution; Duo92002; Sigma-Aldrich) anti-mouse MINUS probe (1:5 dilution; Duo92004; Sigma-Aldrich), and Alexa Fluor 594–conjugated goat anti-rabbit (1:2000 dilution; A-11012; Invitrogen). The primary antibodies were used as recommended by the supplier.

Statistical analyses

Statistical analysis was conducted using Prism software (Graph Pad software). For the analysis of experimental data, comparison of continuous data was achieved by the Mann–Whitney U test and comparison of patient monitoring by the paired Mann-Whitney U test, as appropriate. All P values are two-tailed. P values less than 0.05 were considered significant (*P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001). Data are represented as median \pm s.e.m.

Acknowledgements:

The authors are supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (F.Gh.), the Fondation de France (L.A.), the Institut National du Cancer (F.Gh.), the Association pour la recherche sur le cancer [PJA20131200160] (S.L.), the Conseil Régional Bourgogne, the FEDER, INSERM (E.L., D.D., M.T.), the Fondation Lilliane Betancourt (R.E.), the French National Research Agency [ANR-13-JSV3-0001] (L.A.) and [ANR-11-LABX-0021], the Ligue Régionale contre le cancer Comité Grand-Est (L.A., S.L., R.B., F.V., E.L., D.D.), the Cancéropôle Grand-Est (L.A) and the European Community (Marie Curie Fellowship PCIG10-GA-2011-303719) (L.A.).

References

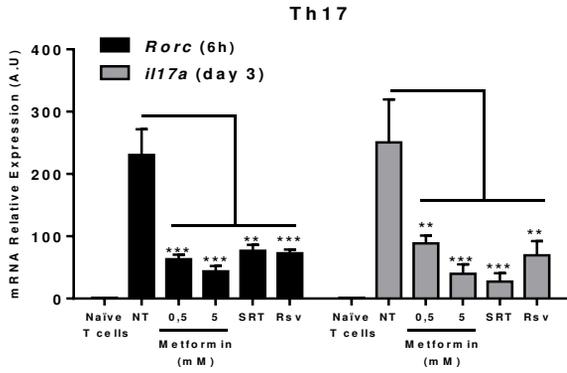
1. Stritesky, G.L., Yeh, N. & Kaplan, M.H. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *Journal of immunology* **181**, 5948-5955 (2008).
2. Dong, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nature reviews. Immunology* **8**, 337-348 (2008).
3. Liang, S.C., *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of experimental medicine* **203**, 2271-2279 (2006).
4. Ciofani, M., *et al.* A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* **151**, 289-303 (2012).
5. Ivanov, I., *et al.* The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121-1133 (2006).
6. Martin, F., Apetoh, L. & Ghiringhelli, F. Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF-beta-dependent immunosuppressive activity? *Trends in molecular medicine* **18**, 742-749 (2012).
7. Liu, J., *et al.* IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications* **407**, 348-354 (2011).
8. Martin-Orozco, N., *et al.* T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* **31**, 787-798 (2009).
9. Numasaki, M., *et al.* Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* **101**, 2620-2627 (2003).
10. Loncle, C., *et al.* IL17 Functions through the Novel REG3beta-JAK2-STAT3 Inflammatory Pathway to Promote the Transition from Chronic Pancreatitis to Pancreatic Cancer. *Cancer research* **75**, 4852-4862 (2015).
11. He, D., *et al.* IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology* **184**, 2281-2288 (2010).
12. Wang, L., *et al.* IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *The Journal of experimental medicine* **206**, 1457-1464 (2009).
13. Berger, H., *et al.* SOCS3 transactivation by PPAR γ prevents IL-17-driven cancer growth. *Cancer research* **73**, 3578-3590 (2013).
14. Wen, Z., Zhong, Z. & Darnell, J.E., Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* **82**, 241-250 (1995).
15. Yuan, Z.L., Guan, Y.J., Chatterjee, D. & Chin, Y.E. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* **307**, 269-273 (2005).
16. Nie, Y., *et al.* STAT3 inhibition of gluconeogenesis is downregulated by SirT1. *Nature cell biology* **11**, 492-500 (2009).
17. Chauhan, D., *et al.* Preclinical evaluation of a novel SIRT1 modulator SRT1720 in multiple myeloma cells. *British journal of haematology* **155**, 588-598 (2011).
18. Harikumar, K.B., *et al.* Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **127**, 257-268 (2010).
19. Harper, C.E., *et al.* Resveratrol suppresses prostate cancer progression in transgenic mice. *Carcinogenesis* **28**, 1946-1953 (2007).
20. Chini, C.C., *et al.* SIRT1-Activating Compounds (STAC) Negatively Regulate Pancreatic Cancer Cell Growth and Viability Through a SIRT1 Lysosomal-Dependent Pathway. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* (2015).
21. Hung, C.H., Chan, S.H., Chu, P.M., Lin, H.C. & Tsai, K.L. Metformin regulates oxLDL-facilitated endothelial dysfunction by modulation of SIRT1 through repressing LOX-1-modulated oxidative signaling. *Oncotarget* (2016).

22. Tyack, P.L., Calambokidis, J., Friedlaender, A., Goldbogen, J. & Southall, B. Formal Comment on Schorr GS, Falcone EA, Moretti DJ, Andrews RD (2014) First Long-Term Behavioral Records from Cuvier's Beaked Whales (*Ziphius cavirostris*) Reveal Record-Breaking Dives. *PLoS ONE* 9(3): e92633. doi:10.1371/journal.pone.0092633. *PloS one* **10**, e0142287 (2015).
23. Zhang, E., *et al.* Metformin and Resveratrol Inhibited High Glucose-Induced Metabolic Memory of Endothelial Senescence through SIRT1/p300/p53/p21 Pathway. *PloS one* **10**, e0143814 (2015).
24. Lim, H.W., *et al.* SIRT1 deacetylates ROR γ and enhances Th17 cell generation. *The Journal of experimental medicine* **212**, 607-617 (2015).
25. Durant, L., *et al.* Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity* **32**, 605-615 (2010).
26. Ghisays, F., *et al.* The N-Terminal Domain of SIRT1 Is a Positive Regulator of Endogenous SIRT1-Dependent Deacetylation and Transcriptional Outputs. *Cell reports* (2015).
27. Han, L., *et al.* SIRT1 is regulated by a PPAR γ -SIRT1 negative feedback loop associated with senescence. *Nucleic acids research* **38**, 7458-7471 (2010).
28. Ruan, Q. & Chen, Y.H. Nuclear factor-kappaB in immunity and inflammation: the Treg and Th17 connection. *Advances in experimental medicine and biology* **946**, 207-221 (2012).
29. Zhuang, S. Regulation of STAT signaling by acetylation. *Cellular signalling* **25**, 1924-1931 (2013).
30. Chalmin, F., *et al.* Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* **36**, 362-373 (2012).
31. Bruchard, M., *et al.* Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nature medicine* **19**, 57-64 (2013).
32. Gaffen, S.L. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine* **43**, 402-407 (2008).
33. Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M. & Kuchroo, V.K. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* **453**, 1051-1057 (2008).
34. Laurence, A., *et al.* Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* **26**, 371-381 (2007).
35. Veldhoen, M., Hirota, K., Christensen, J., O'Garra, A. & Stockinger, B. Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *The Journal of experimental medicine* **206**, 43-49 (2009).
36. Mahnke, Y.D. & Roederer, M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clinics in laboratory medicine* **27**, 469-485, v (2007).
37. Thibaudin, M., *et al.* Human ectonucleotidase-expressing CD25 Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions. *Oncoimmunology* **5**, e1055444 (2016).
38. Tosolini, M., *et al.* Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer research* **71**, 1263-1271 (2011).
39. Zhang, J., *et al.* The type III histone deacetylase Sirt1 is essential for maintenance of T cell tolerance in mice. *The Journal of clinical investigation* **119**, 3048-3058 (2009).
40. Zou, T., *et al.* Resveratrol Inhibits CD4+ T cell activation by enhancing the expression and activity of Sirt1. *PloS one* **8**, e75139 (2013).
41. Akimova, T., *et al.* Targeting sirtuin-1 alleviates experimental autoimmune colitis by induction of Foxp3+ T-regulatory cells. *Mucosal immunology* **7**, 1209-1220 (2014).
42. Beier, U.H., *et al.* Sirtuin-1 targeting promotes Foxp3+ T-regulatory cell function and prolongs allograft survival. *Molecular and cellular biology* **31**, 1022-1029 (2011).
43. Wang, Y., *et al.* Histone Deacetylase SIRT1 Negatively Regulates the Differentiation of Interleukin-9-Producing CD4(+) T Cells. *Immunity* **44**, 1337-1349 (2016).
44. Kim, E.J., Kho, J.H., Kang, M.R. & Um, S.J. Active regulator of SIRT1 cooperates with SIRT1 and facilitates suppression of p53 activity. *Molecular cell* **28**, 277-290 (2007).
45. Chen, C.W., *et al.* DOT1L inhibits SIRT1-mediated epigenetic silencing to maintain leukemic gene expression in MLL-rearranged leukemia. *Nature medicine* **21**, 335-343 (2015).

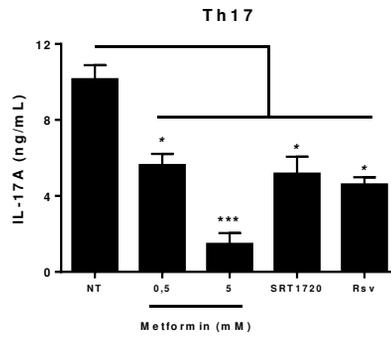
46. Lu, J., *et al.* SIRT1 counteracted the activation of STAT3 and NF-kappaB to repress the gastric cancer growth. *International journal of clinical and experimental medicine* **7**, 5050-5058 (2014).
47. Sestito, R., *et al.* STAT3-dependent effects of IL-22 in human keratinocytes are counterregulated by sirtuin 1 through a direct inhibition of STAT3 acetylation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**, 916-927 (2011).
48. Bishayee, A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. *Cancer prevention research* **2**, 409-418 (2009).
49. Song, Y.M., *et al.* Metformin alleviates hepatosteatosis by restoring SIRT1-mediated autophagy induction via an AMP-activated protein kinase-independent pathway. *Autophagy* **11**, 46-59 (2015).
50. Gong, Z., *et al.* Diabetes, metformin and incidence of and death from invasive cancer in postmenopausal women: Results from the women's health initiative. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **138**, 1915-1927 (2016).
51. Chlebowski, R.T., *et al.* Diabetes, metformin, and breast cancer in postmenopausal women. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**, 2844-2852 (2012).
52. He, X.K., Su, T.T., Si, J.M. & Sun, L.M. Metformin Is Associated With Slightly Reduced Risk of Colorectal Cancer and Moderate Survival Benefits in Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis. *Medicine* **95**, e2749 (2016).
53. Aldea, M., *et al.* Repositioning metformin in cancer: genetics, drug targets, and new ways of delivery. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **35**, 5101-5110 (2014).
54. Pernicova, I. & Korbonits, M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature reviews. Endocrinology* **10**, 143-156 (2014).
55. Yin, M., Zhou, J., Gorak, E.J. & Quddus, F. Metformin is associated with survival benefit in cancer patients with concurrent type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *The oncologist* **18**, 1248-1255 (2013).
56. Zhao, D., *et al.* Metformin decreases IL-22 secretion to suppress tumor growth in an orthotopic mouse model of hepatocellular carcinoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **136**, 2556-2565 (2015).
57. Sun, Y., *et al.* Metformin ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating T helper 17 and regulatory T cells in mice. *Journal of neuroimmunology* **292**, 58-67 (2016).

Figure 1

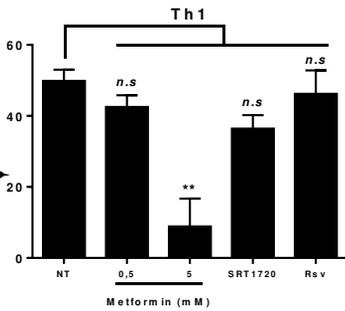
A



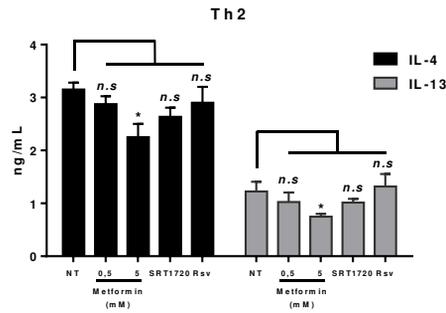
B



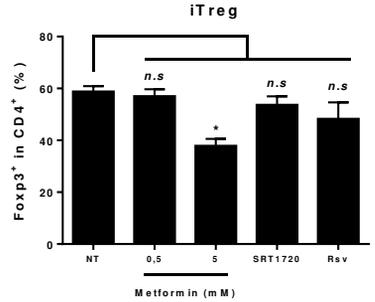
C



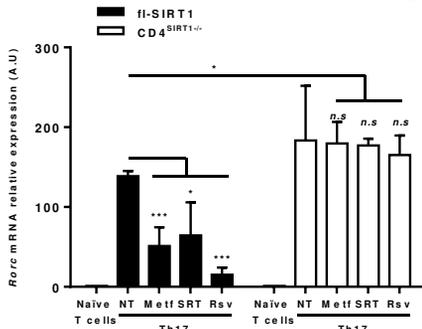
D



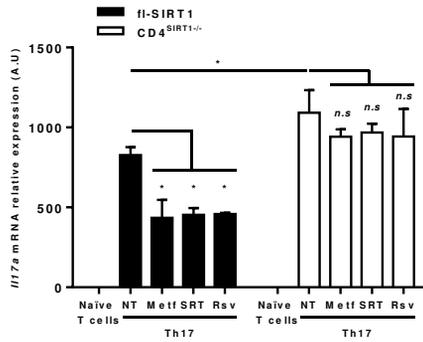
E



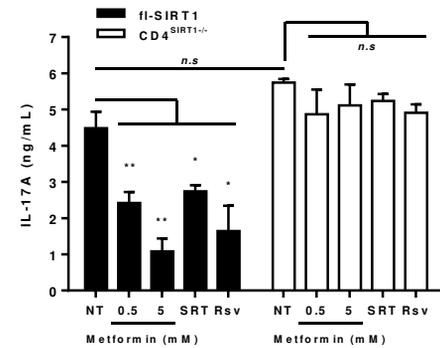
F



G



H



I

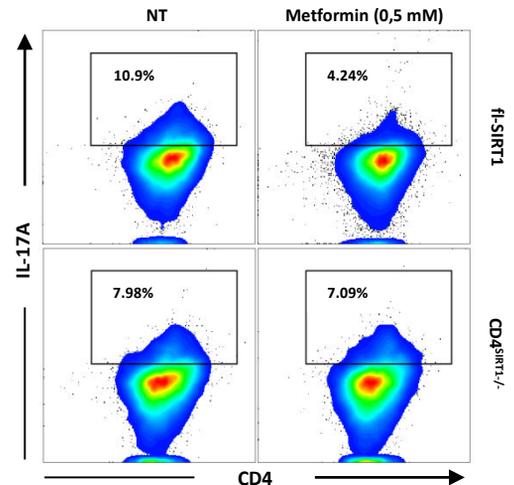
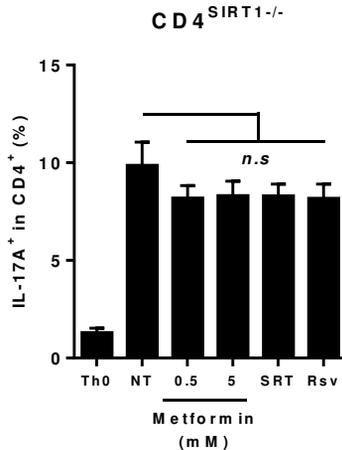
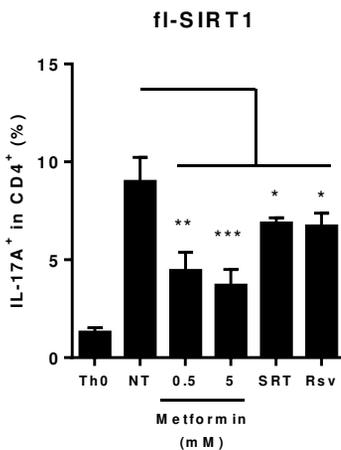


Figure Legends:

Figure 1: SIRT1 activation selectively blunts Th17 differentiation

Cell-sorted naïve CD4⁺ CD62L^{hi} T cells were isolated from naïve or fl-CD4/SIRT1-Cre C57BL/6 mice and differentiated into Th1, Th2, iTreg, or Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 6 or 72 hours and required cytokines in presence or not of 0.5 mM or 5 mM of metformin, 10 µM of resveratrol or 1 µM of SRT1720.

A. qRT-PCR analysis of *Rorc* and *il17a* mRNA expression was assessed after 6 hours (*Rorc*) or 3 days (*il17a*) of culture and expression is presented relative to *Actb* expression.

B, C and D. ELISA analysis of IL-17A (B), IFN γ (C), IL-4 and IL-13 (D) in supernatants of CD4⁺ T cells differentiated for 3 days.

E. Flow cytometry analysis of intracellular staining for Foxp3 in naïve CD4⁺ T cells polarized in iTreg in presence or not of metformin, resveratrol or SRT1720 assessed on day 3 of culture.

F and G. qRT-PCR analysis of *Rorc* (G) and *il17a* (H) mRNA expression of CD4⁺ T cells isolated from fl-SIRT1 or CD4^{SIRT1-/-} mice polarized in Th17 in presence or not of metformin low dose, resveratrol or SRT1720 assessed on day 3 of culture.

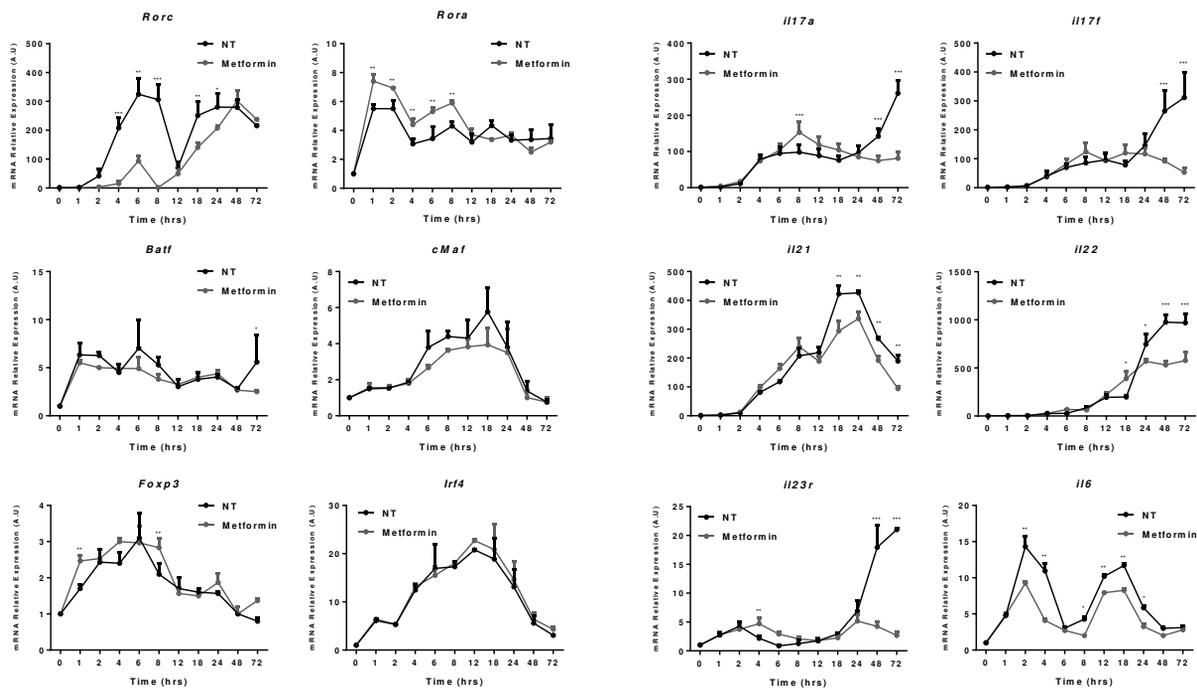
H. Same as in F and G, ELISA analysis of IL-17A in supernatants of CD4⁺ T cells differentiated for 3 days.

I. Flow cytometry analysis of intracellular staining for IL-17A in naïve CD4⁺ T cells isolated from fl-SIRT1 (left panel) or CD4^{SIRT1-/-} (middle panel) mice polarized or not in Th17 in presence or not of low or high doses of metformin, resveratrol or SRT1720 assessed on day 3 of culture. Numbers in outlined areas indicate percentage cells in gate. Representative data from 1 of 3 independent experiments are shown in right panel.

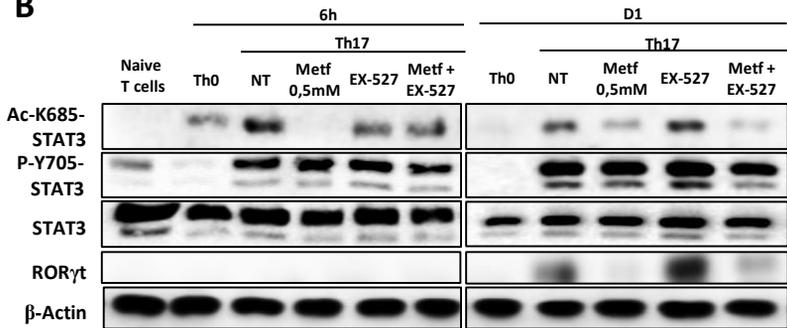
NS, not significant; *P < 0.05, **P < 0.01 and ***p<0.001 (Mann-Whitney test). Data are from three independent experiments (median and s.e.m.).

Figure 2

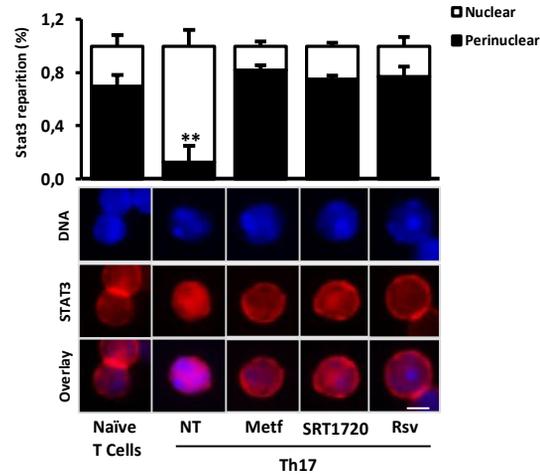
A



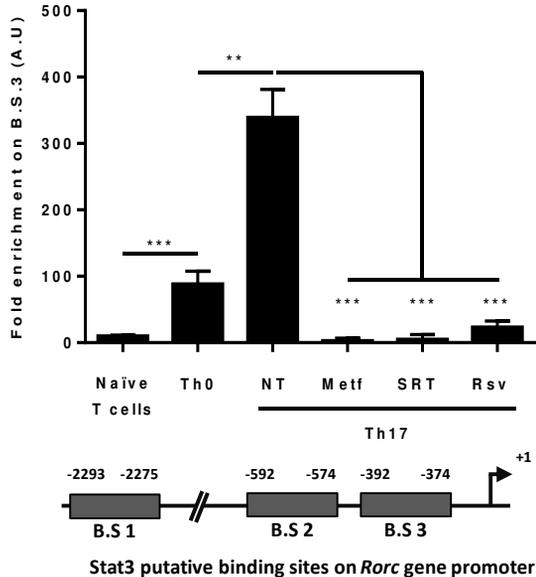
B



C



D



E

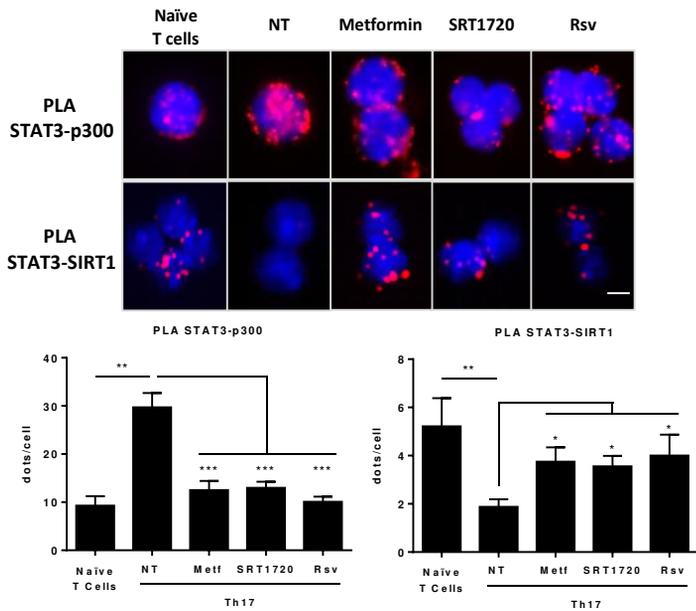


Figure 2: SIRT1 regulates IL-17A and ROR γ t expression by desacetylation of STAT3

A. Cell-sorted naïve CD4⁺CD62L^{hi} T cells were isolated from C57BL/6 and differentiated into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 48 and 72 hours in presence or not of SIRT1 agonist (low dose of metformin). qRT-PCR analysis of *Rorc*, *Rora*, *Foxp3*, *Batf*, *cMaf*, *Irf4*, *il6*, *il17a*, *il17f*, *il21*, *il22* and *il23r* expression. Expression is presented relative to *Actb* expression.

B. Expression of Ac-STAT3 (K685), p-STAT3 (Y705) or ROR γ t in naïve T cells, Th0 or Th17 differentiated cells for 6 and 24 hours treated or not with the SIRT1 agonist (low dose of metformin), or the SIRT1 inhibitor (EX-527) or both were determined by Western blotting.

C. Naïve T cells and Th17 differentiated cells for 6 hours treated or not with the SIRT1 agonists (low and high doses of metformin, resveratrol and SRT1720) were stained and analyzed for STAT3 expression and localization (nuclear or perinuclear) using immunofluorescence (upper panel is quantification on 100 cells; lower panel a representative cell).

D. ChIP analysis of the interaction between STAT3 and *Rorc* promoter in naïve T cells and *in vitro* differentiated Th17 cells differentiated and treated or not with the SIRT1 agonists (low and high doses of metformin, resveratrol and SRT1720). Analysis on the putative binding site 3 for STAT3 on *Rorc* promoter (-392 -374) is shown. For the putative binding sites 1 and 2, any amplification was obtained.

E. Proximity Ligation Assay (PLA) analysis of the interaction between STAT3 and p300 or STAT3 and SIRT1 in naïve T cells and *in vitro* differentiated Th17 cells treated or not with the SIRT1 agonists (low dose of metformin, resveratrol and SRT1720). (Lower panel is quantification of interacting dot on 100 cells; Upper panel a representative cell is shown).

NS, not significant; *P < 0.05, **P < 0.01 and ***p<0.001 (Mann-Whitney test). Data are from three (a,d) independent experiments (median and s.e.m.), (b, c, e) are one experiment representative of three independent experiments.

Figure 3

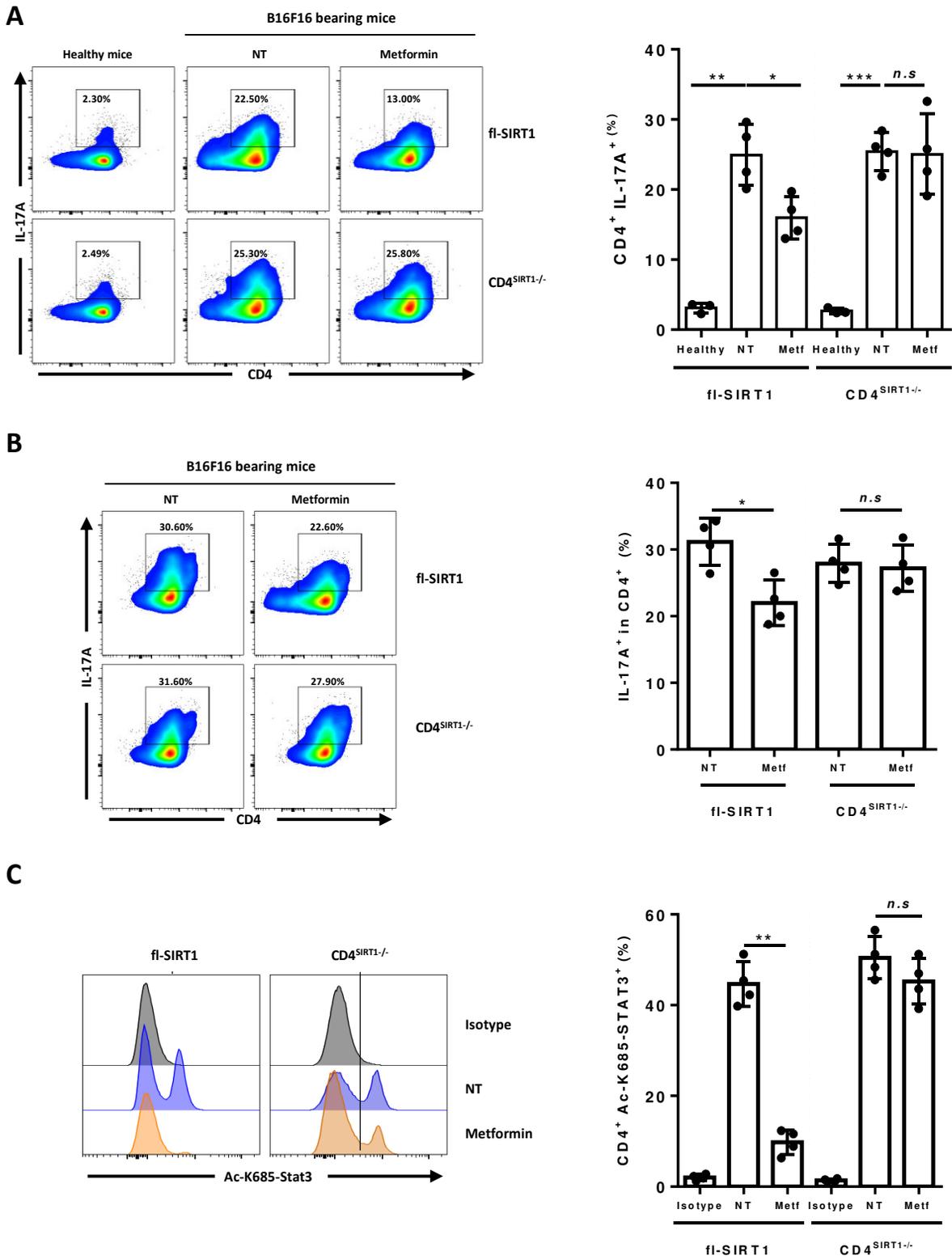


Figure 3: SIRT1 activation blunts *in vivo* Th17 polarization

CD4⁺ T cells isolated from draining lymph nodes or tumor infiltrating lymphocytes isolated from B16F10 tumor-bearing fl-SIRT1 control or CD4^{SIRT1-/-} mice under control or metformin (150mg/kg/day) treatment. Cells were activated 6 hours with PMA/Iono and monensin. Then, proportion of Th17 cells was determined by IL-17A intracellular cytokine staining.

A. IL-17A expression from Th17 cells was assessed by intracellular cytokine staining in draining lymph nodes of wild-type mice, B16F10 tumor-bearing fl-SIRT1 control or CD4^{SIRT1-/-} mice under control or metformin treatment. Left panel is a representative dot plot; right panel represents data from 4 independent mice.

B. IL-17A secretion in Th17 cells was assessed by intracellular cytokine staining in the tumor bed of B16F10 tumor-bearing fl-SIRT1 control or CD4^{SIRT1-/-} mice under control or metformin treatment. Left panel is a representative dot plot; right panel represents data from 4 independent mice.

C. Expression of Ac-STAT3 in CD4⁺ cells was assessed by intracellular cytokine staining in the tumor bed of B16F10 tumor-bearing fl-SIRT1 control or CD4^{SIRT1-/-} mice under control or metformin treatment. Left panel is a representative dot plot; right panel represents data from 4 independent mice.

NS, not significant; *P < 0.05 and **P < 0.01 (Mann-Whitney test). Data are from four (right panels) independent mice (median and s.e.m.) or are from one representative of four independent mice (left panels).

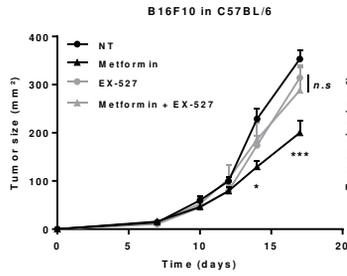
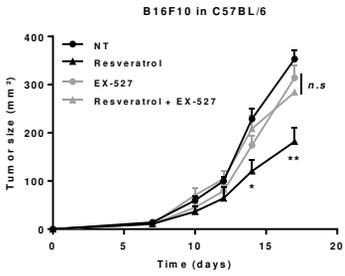
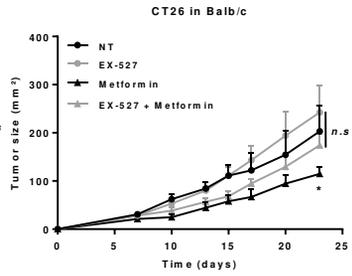
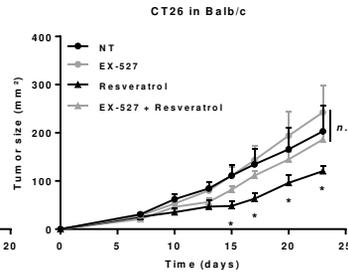
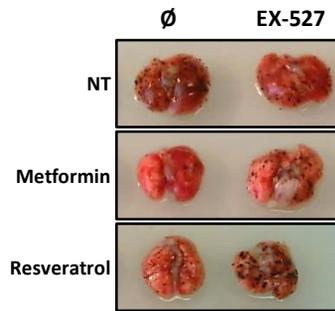
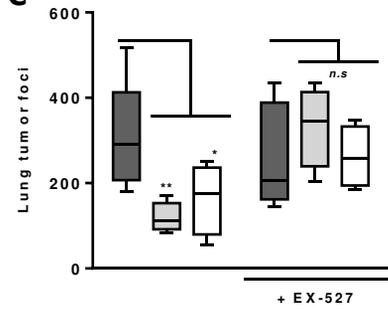
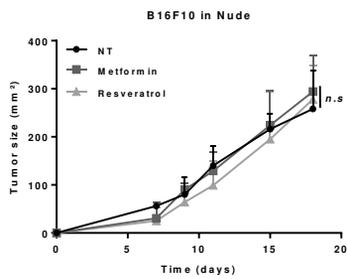
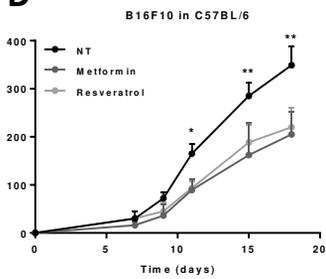
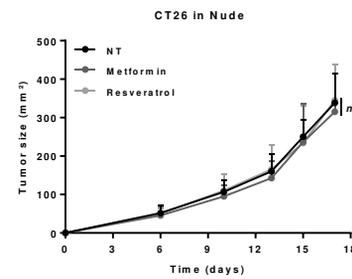
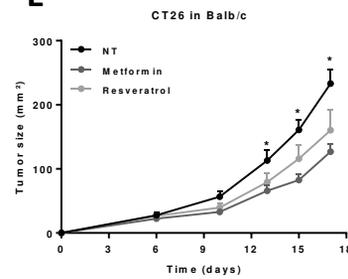
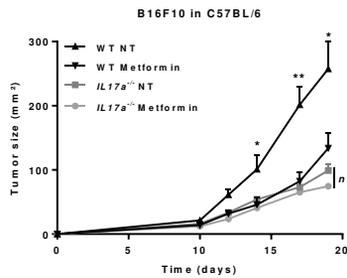
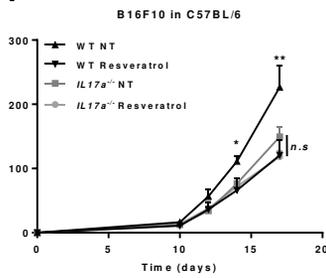
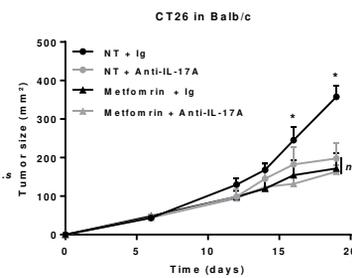
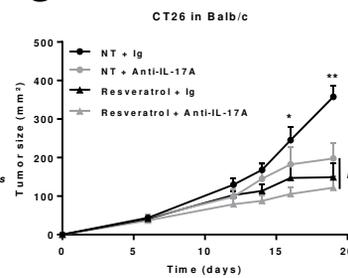
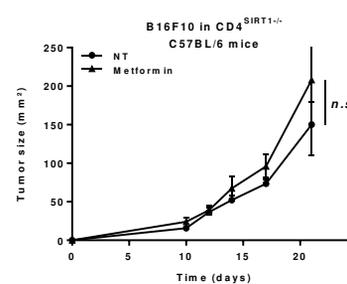
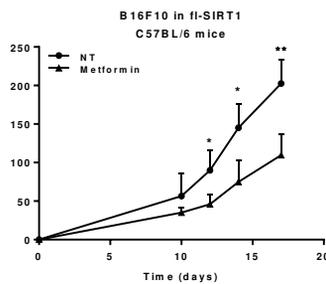
Figure 4**A****B****C****D****E****F****G****H**

Figure 4: The anticancer therapeutic effect of SIRT1 agonists relies on their ability to target IL-17A

A and B. C57BL/6 (A) and BALB/c mice (B) under control, resveratrol (35 mg/kg/day) (left) or metformin (150 mg/kg/day) (right) treatments with or without EX-527 (1mg/kg/day) treatment were respectively inoculated with B16F10 and CT26 cells and tumor growth was monitored over 2.5 weeks.

C. Lung tumor foci in wild-type mice 13 days after intravenous injection of B16F10 melanoma cells with or without metformin or resveratrol treatment and with or without EX-527 (1mg/kg/day) treatment in some cases.

D and E. Same as in A, but B16F10 (D) and CT26 (E) cells were injected subcutaneously in C57BL/6 or BALB/c mice (left) or in Nude mice (right) and tumor growth was monitored over 2.5 weeks.

F. Monitoring of tumor growth of B16F10 melanoma cells in C57BL/6 and *IL17 α ^{-/-}* mice. Mice were also treated with resveratrol (left) or metformin (right).

G. Monitoring of tumor growth of CT26 colon cancer cells in BALB/c mice injected with an anti-IL-17A antibody (200mg/day injected on day 0, 1, 2, 3, 4 and 6) or control rat immunoglobulin G (Ig). Mice were also treated with resveratrol (left) or metformin (right).

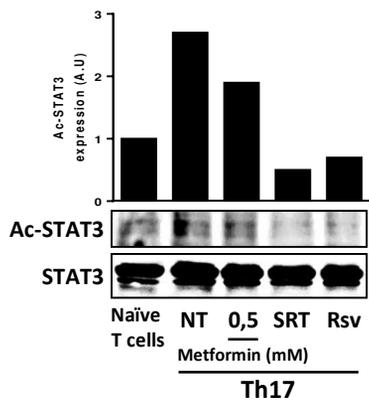
H. Monitoring of tumor growth of B16F10 melanoma cells in fl-SIRT1 control mice (left) or in CD4^{SIRT1^{-/-}} mice (right) treated or not with metformin and tumor growth was monitored over 3 weeks.

All experiments were done 2 times with 7 to 8 mice per group.

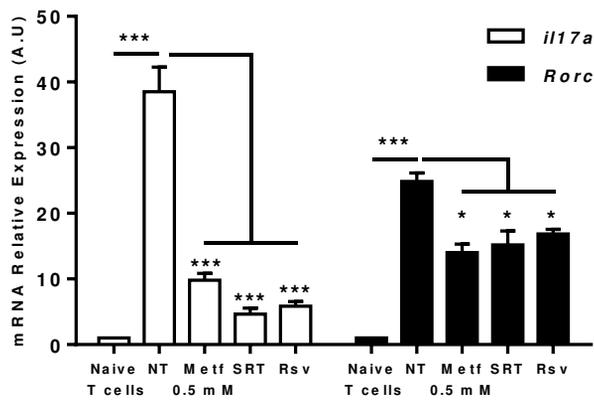
NS, not significant; *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001 (Mann-Whitney test). Data are from two (a, b, c, d, e, f, g, h) independent experiments with 7 to 8 mice per group (median and s.e.m.) or are from one representative of two independent experiments (c).

Figure 5

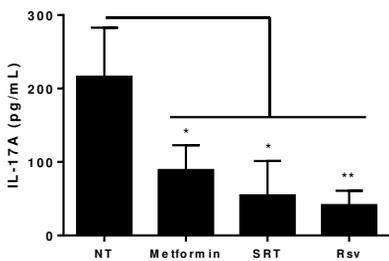
A



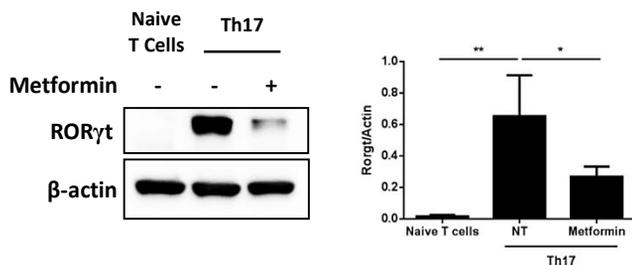
B



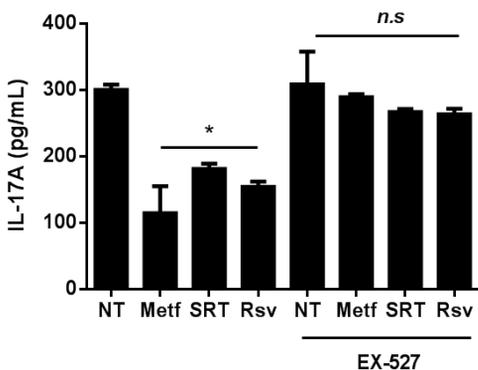
C



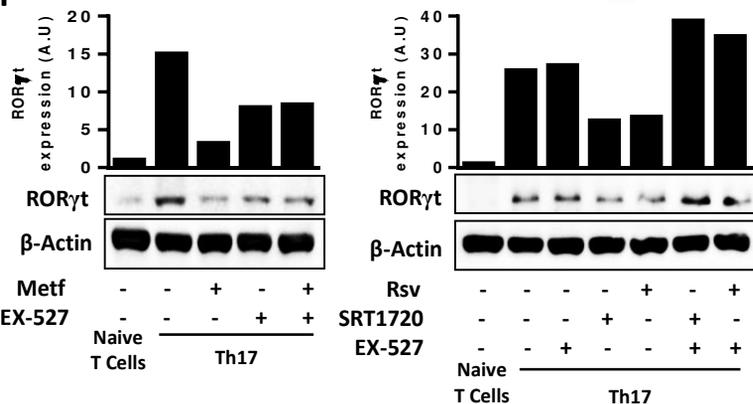
D



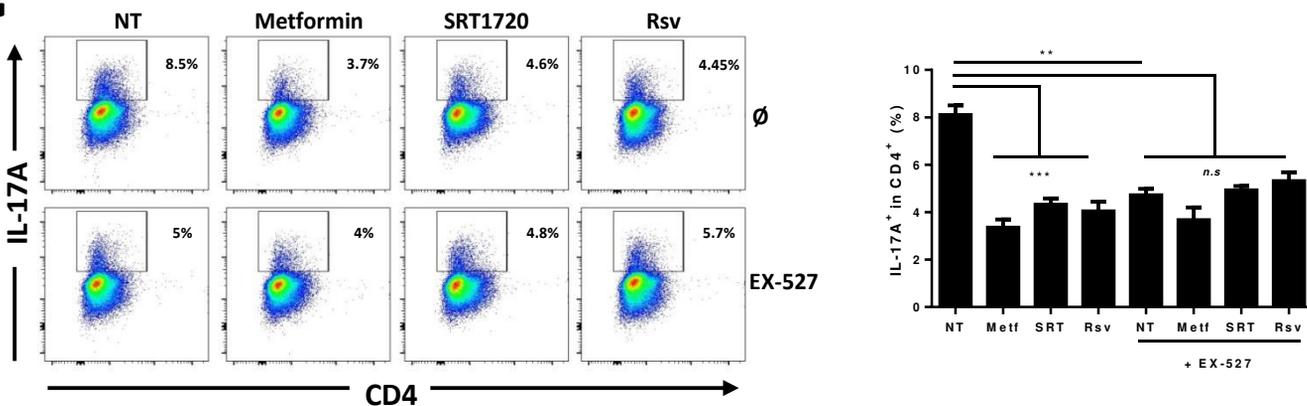
E



F



G



H

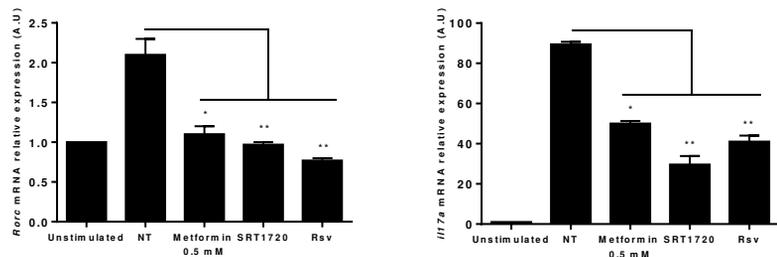


Figure 5: SIRT1 agonists are also effective on human Th17 cells

CD4 naïve T cells (CD4⁺ CD45RA⁺) were sorted from blood of healthy volunteers and then differentiated or not into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 6 or 72 hours treated or not with the SIRT1 agonists (0.5 mM of metformin, resveratrol and SRT1720).

A. Expression of Ac-STAT3 was assessed by Western Blotting in naïve T cells or differentiated Th17 cells after 6 hours of culture (lower panel). STAT3 was used as a reference for Ac-STAT3 quantification (a.u: arbitrary unit) (upper panel).

B. qRT-PCR analysis of *Rorc* and *il17a* mRNA expression was assessed on hour 6 (*Rorc*) and on day 3 (*il17a*) of culture. Expression is presented relative to *Actb* expression.

C. IL-17A secretion was assessed using ELISA on supernatants after 3 days of culture.

D. CD4 naïve T cells (CD4⁺ CD45RA⁺) were sorted from blood of three healthy volunteers and then differentiated or not into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 72 hours treated or not with low dose of metformin. Expression of ROR γ t was assessed using Western blotting experiment (left panel) and quantification using β -actin as reference is shown (right panel).

E. CD4 naïve T cells (CD4⁺ CD45RA⁺) were sorted from blood of healthy volunteers and then differentiated or not into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 72 hours treated or not with the SIRT1 agonists (low dose of metformin, resveratrol and SRT1720). A treatment with an inhibitor of SIRT1: EX-527 was also performed in some conditions. IL-17A secretion was assessed using ELISA on supernatants after 3 days of culture.

F. Same as in E, but expression of ROR γ t was assessed using western blotting experiment after 3 days of culture. β -actin was used as loading control and as a reference for ROR γ t quantification (a.u: arbitrary unit).

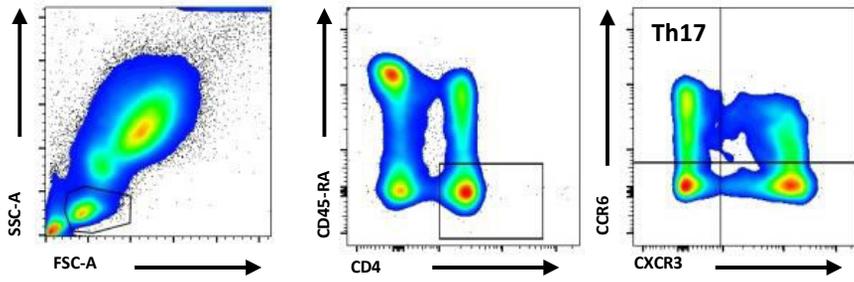
G. Same as in E, but IL-17A expression was assessed using intracellular cytokine staining after 3 days of culture. Numbers beside outlined areas indicate percentage cells in gate. Representative data from 1 of 3 independent experiments are shown.

H. Memory Th17 (CD4⁺ CD45RA⁻ CCR6⁺ CXCR3⁻) cells were sorted from blood of healthy volunteers and stimulated in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 72 hours treated or not with the SIRT1 agonists (low dose of metformin, resveratrol and SRT1720). qRT-PCR analysis of *Rorc* (left panel) and *il17a* (right panel) mRNA expression were assessed after 3 days of culture. Expression is presented relative to *Actb* expression.

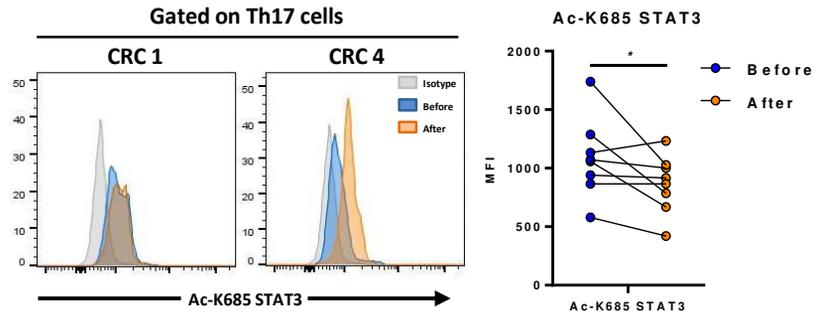
NS, not significant; *P < 0.05, **P < 0.01 and *** P<0.001 (Mann-Whitney test). Data are from three (b, c, e, g, h) independent experiments (median and s.e.m.). (a, d, f, g) are one representative of three independent experiments.

Figure 6

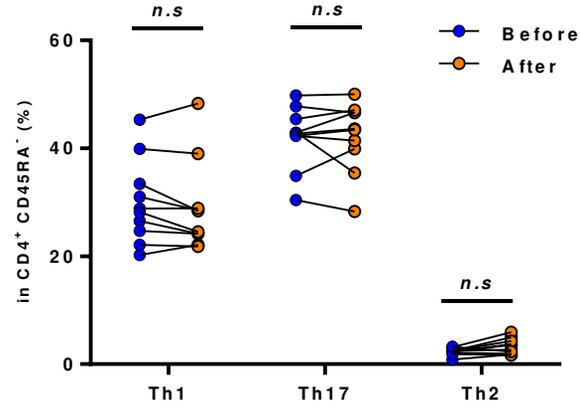
A



B



C



D

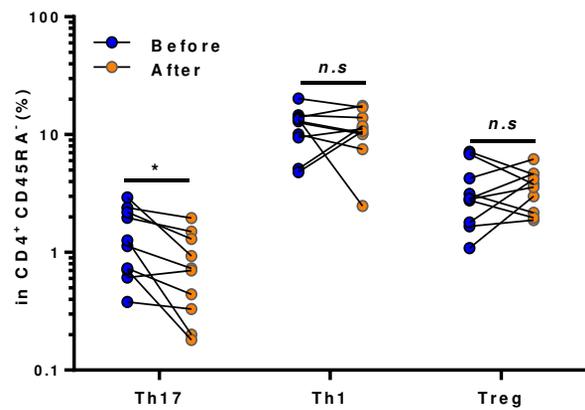
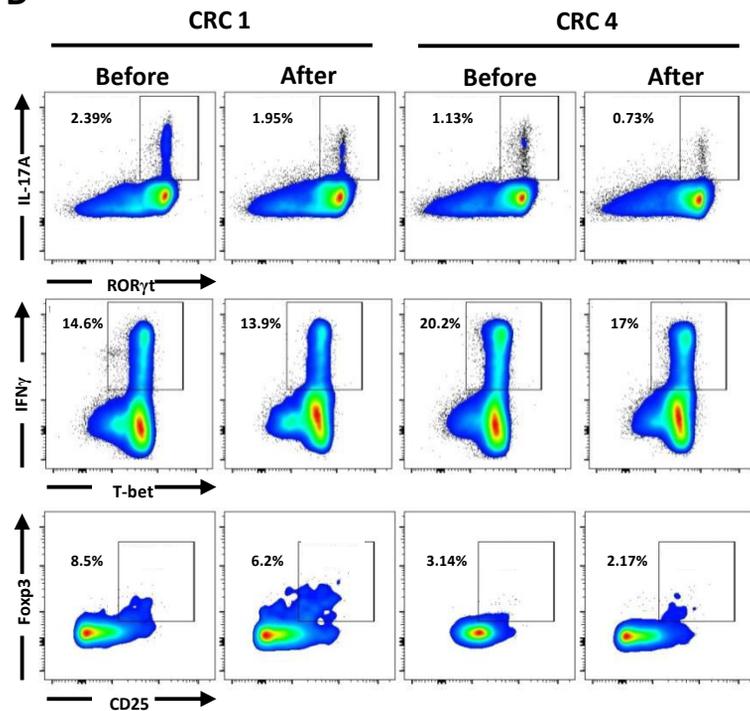


Figure 6: Administration of the SIRT1 agonist Metformin to metastatic colon cancer patients blunt IL-17A production by blood Th17 cells

10 metastatic colorectal cancer patients still untreated by chemotherapy and diagnosed with a non insulin-dependent diabetes were selected and treated by metformin (500mg per day bid). Blood samples were obtained before and after one month metformin treatment initiation.

A. Flow cytometry gating strategy to identify memory Th17 cells through chemokine receptor expression.

B. Expression of Ac-STAT3 was assessed by intracellular cytokine staining before and after metformin treatment (left panel), two representative histograms are shown, (right panel) MFI for 8 patients is shown.

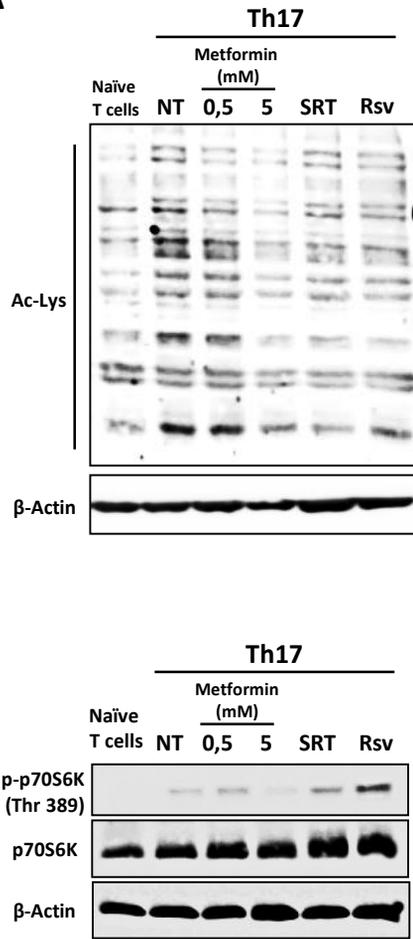
C. Proportion of memory Th1, Th2 and Th17 cells was assessed by flow cytometry before and after metformin treatment.

D. Expression of ROR γ t, IL-17A, T-bet, IFN γ and Foxp3 to identify Th17 (ROR γ t⁺ IL-17A⁺), Th1 (T-bet⁺ IFN γ ⁺) and Treg cells (CD25^{high} Foxp3⁺) was assessed by intracellular cytokine staining before and after metformin treatment. Numbers beside outlined areas indicate percentage cells in gate. Representative data from 2 of 10 patients are shown (left panel). Percentage of positive cells for each patient is shown (right panel).

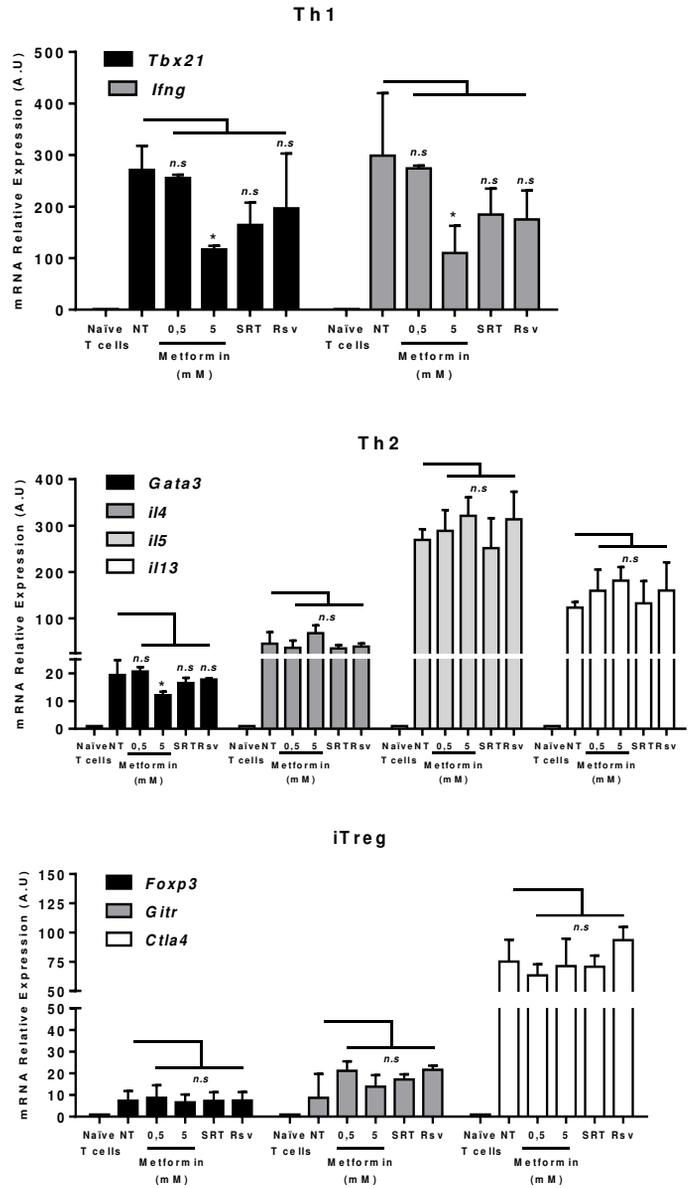
NS, not significant and *P < 0.05 (paired Mann-Whitney test). Data are from ten metastatic colorectal cancer patients.

Supplementary Figure 1

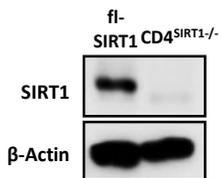
A



B



C



Supplementary Figure 1

Cell-sorted naïve CD4⁺ CD62L^{hi} T cells were isolated from C57BL/6 or CD4^{SIRT1^{-/-}} mice and differentiated into Th1, Th2, iTreg, or Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 6 or 72 hours in presence or not of 0.5 mM or 5 mM of metformin, 10 μM of resveratrol or 1 μM of SRT1720.

A. Expression of global acetylation (top) and p-STAT3 (bottom) were assessed by Western blotting after 6 hours of culture.

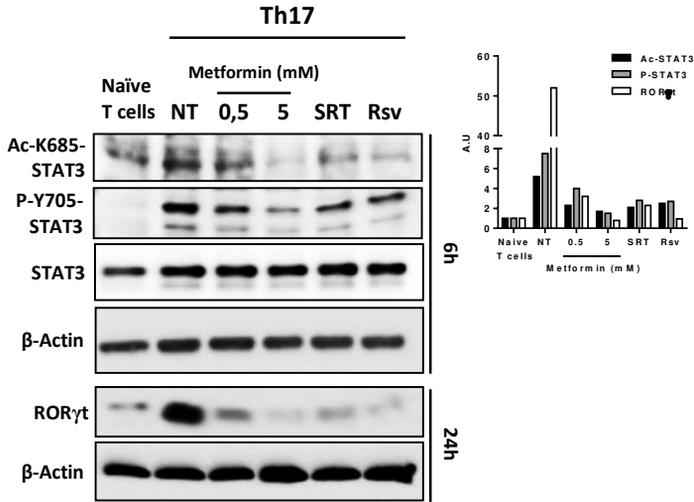
B. qRT-PCR analysis of *Tbx21*, *Ifng* (top), *Gata3*, *il4*, *il5*, *il13* (middle), *Foxp3*, *Gitr* and *Ctla4* (bottom) mRNA expression was assessed after 3 days of culture and expression is presented relative to *Actb* expression.

C. Expression of SIRT1 was assessed by Western blotting on CD4⁺ T cells isolated from spleen of fl-SIRT1 control or CD4^{SIRT1^{-/-}} mice.

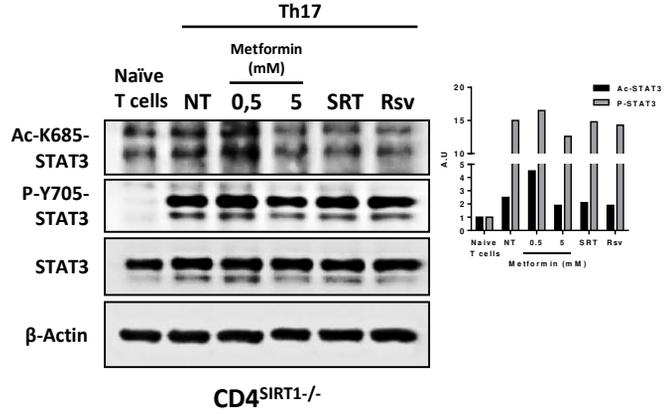
NS, not significant and *P < 0.05 (Mann-Whitney test). Data are from three (b) independent experiments (median and s.e.m.) or are from one representative of three independent experiments (a, c).

Supplementary Figure 2

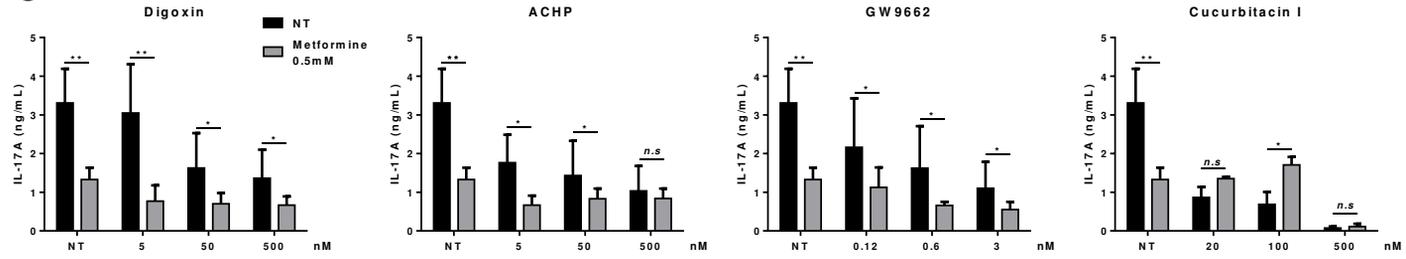
A



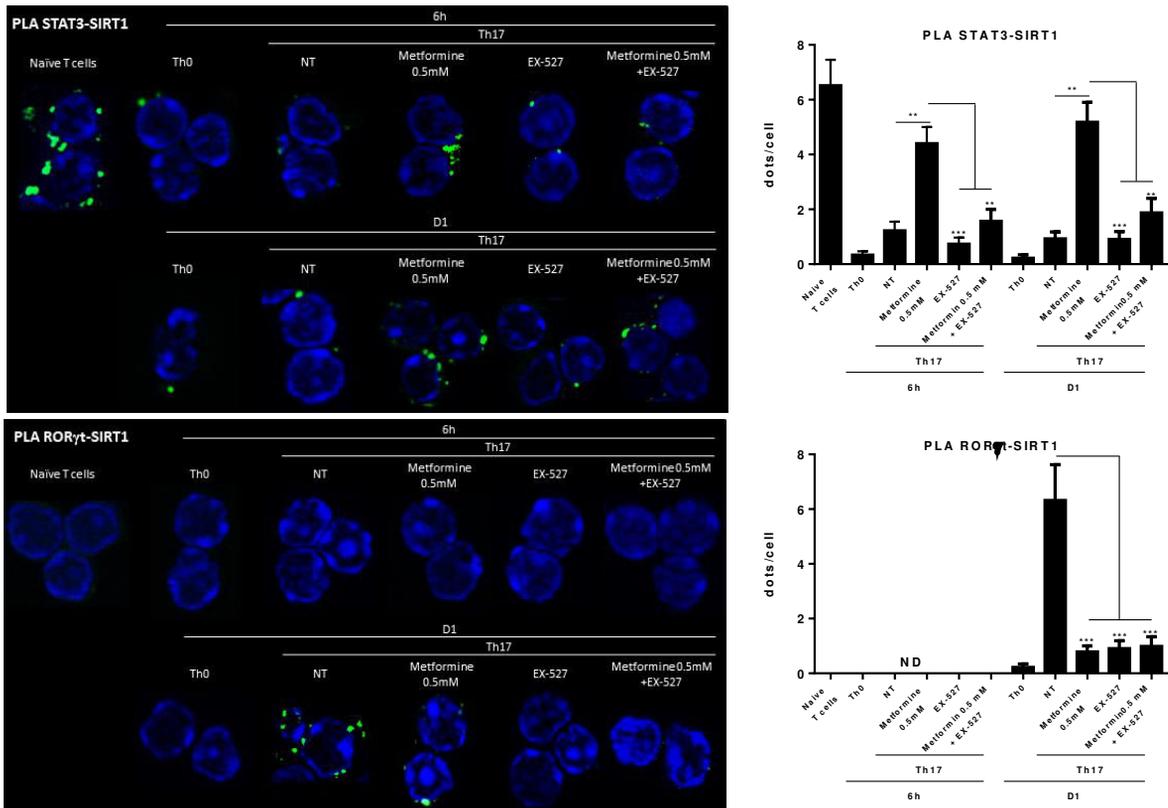
B



C



D



Supplementary Figure 2

A. Cell-sorted naïve CD4⁺ CD62L^{hi} CD44^{lo} T cells were isolated from C57BL/6 mice and differentiated into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 6 or 24 hours in presence or not of 0.5 mM or 5 mM of metformin, 10 µM of resveratrol or 1 µM of SRT1720. Expression of Ac-STAT3, p-STAT3 and RORγt in naïve T cells and differentiated Th17 cells for 6 or 24 hours were assessed by western blotting. β-actin was used as loading control and as a reference for RORγt and STAT3 was used as a reference for Ac-STAT3 and p-STAT3 quantification. Data are from one representative of three independent experiments.

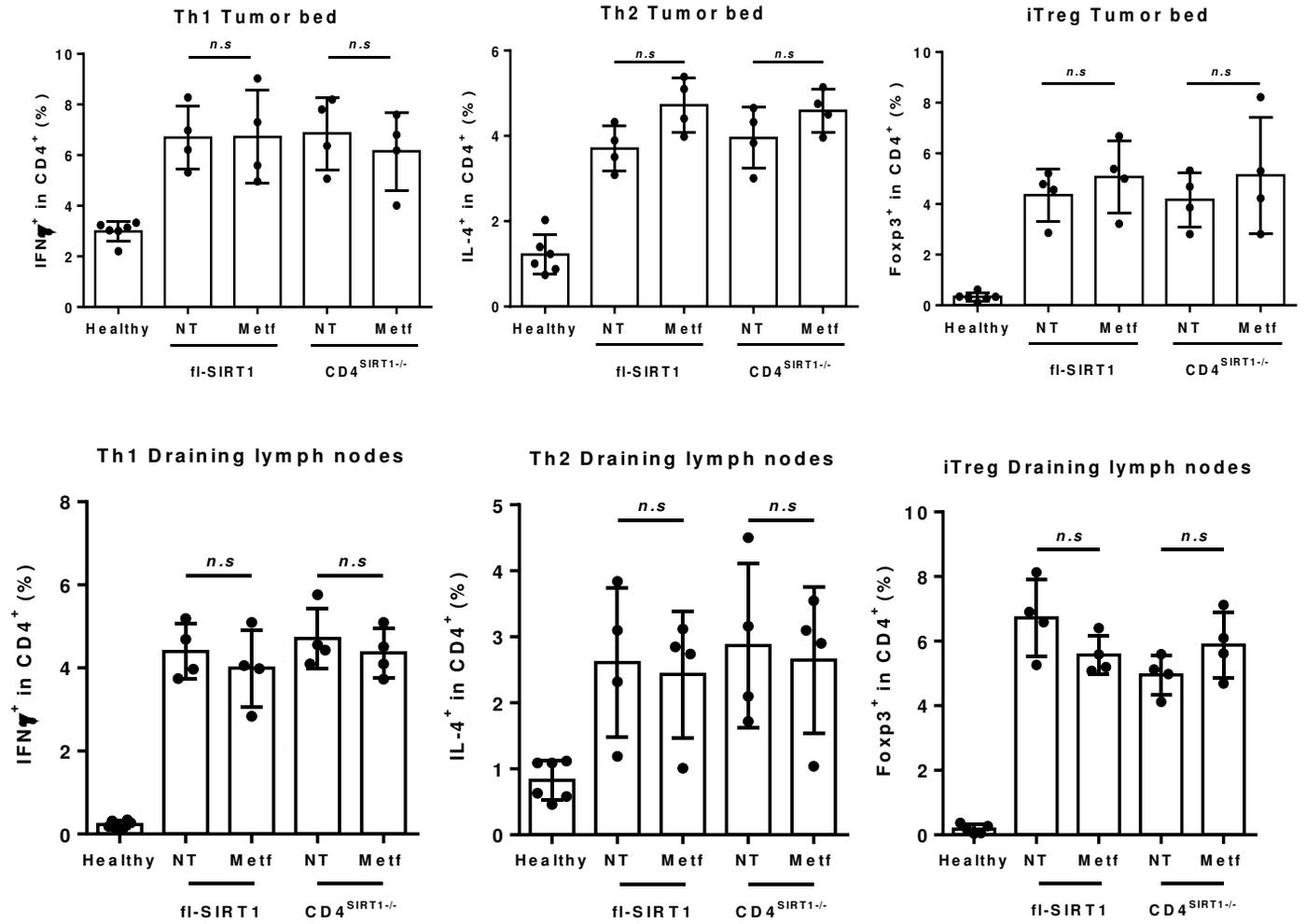
B. Cell-sorted naïve CD4⁺ CD62L^{hi} CD44^{lo} T cells were isolated from CD4^{SIRT1^{-/-}} mice and differentiated into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 6 hours in presence or not of 0.5 mM or 5 mM of metformin, 10 µM of resveratrol or 1 µM of SRT1720. Expression of Ac-STAT3 and p-STAT3 in naïve T cells and differentiated Th17 cells for 6 hours was assessed by western blotting. STAT3 was used as a reference for Ac-STAT3 and p-STAT3 quantification. Data are from one representative of three independent experiments.

C. Cell-sorted naïve CD4⁺ CD62L^{hi} CD44^{lo} T cells were isolated from C57BL/6 mice and differentiated into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 3 days in presence or not of 0.5 of metformin and either with an three dose effect of RORγt inhibitor (Digoxin), or p65 inhibitor (ACHP), or PPARγ inhibitor (GW9662) or STAT3 inhibitor (Cucurbitacin I). IL-17A secretion was assessed using ELISA on supernatants after 3 days of culture.

D. Proximity Ligation Assay (PLA) analysis of the interaction between STAT3 and SIRT1 or RORγt and SIRT1 in naïve T cells and *in vitro* differentiated Th0 or Th17 cells for 6 and 24 hours treated or not with the SIRT1 agonist (low dose of metformin), or the SIRT1 inhibitor (EX-527) or both. (Representative cells are shown in left panel and right panel is a quantification of interacting dot on 100 cells).

NS, not significant; *P < 0.05, **P < 0.01 and ***p<0.001 (Mann-Whitney test). Data are from three (a,d) independent experiments (median and s.e.m.), (b, c, e) are one experiment representative of three independent experiments.

Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3

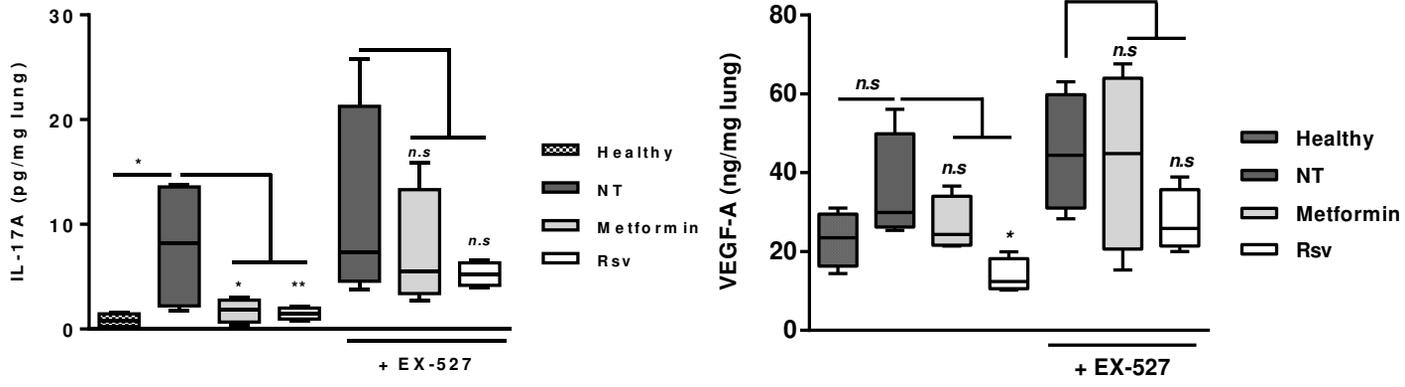
CD4⁺ T cells isolated from draining lymph nodes or tumor infiltrating lymphocytes isolated from tumor of B16F10 tumor-bearing fl-SIRT1 control or CD4^{SIRT1^{-/-}} mice under control or metformin (150 mg/kg/day) treatment after 2.5 weeks of tumor growth. Cells were activated 3 days with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Then, proportion of Th1, Th2 and iTreg cells was determined by intracellular cytokine staining.

IFN γ or IL-4 secretion and Foxp3 expression in CD4⁺ T cells were assessed by intracellular cytokine staining in tumor bed (top) and draining lymph nodes (bottom) of B16F10 tumor-bearing fl-SIRT1 control or CD4^{SIRT1^{-/-}} mice under control or metformin treatment.

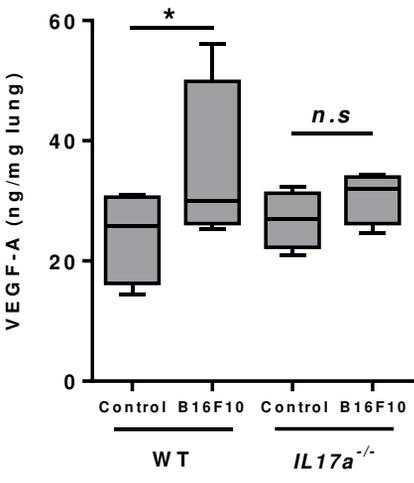
NS, not significant (Mann-Whitney test). Data are from two (a, b, c, d, e, f, g, h) independent experiments with 7 to 8 mice per group (median and s.e.m.). (c) are from one representative of two independent experiments.

Supplementary Figure 4

A



B



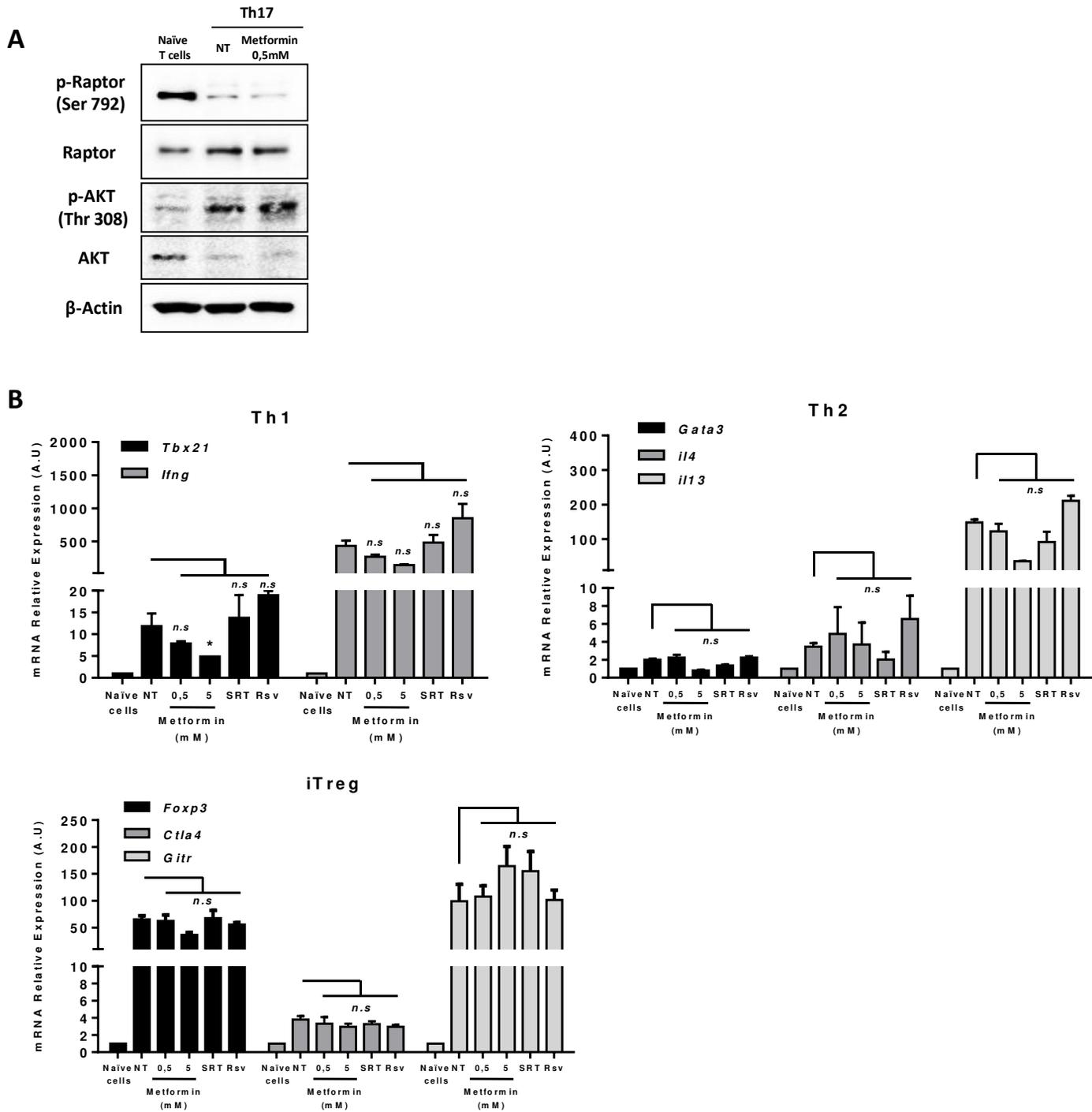
Supplementary Figure 4

A. C57BL/6 mice under control, resveratrol (35 mg/kg/day) or metformin (150 mg/kg/day) treatments with or without EX-527 (14 mg/kg/day) treatment were inoculated or not with intravenous injection of B16F10 melanoma cells. IL-17A (left) and VEGF-A (right) release from healthy lung or lung tumor foci was controlled by ELISA after 13 days of tumor growth.

B. C57BL/6 or *IL17a*^{-/-} mice were inoculated or not with intravenous injection of B16F10 cells and VEGF-A release from healthy lung or lung tumor foci was controlled by ELISA after 13 days of tumor growth.

NS, not significant; *P < 0.05 and **P < 0.01 (Mann-Whitney test). Data are from two (a, b) independent experiments with 7 to 8 mice per group (median and s.e.m.).

Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5

A. CD4 naïve T cells (CD4⁺ CD45RA⁺) were sorted from blood of healthy volunteers and then differentiated or not into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 72 hours treated or not with 0.5 mM of metformin. Expression of p-Raptor and AKT was assessed using western blotting experiment.

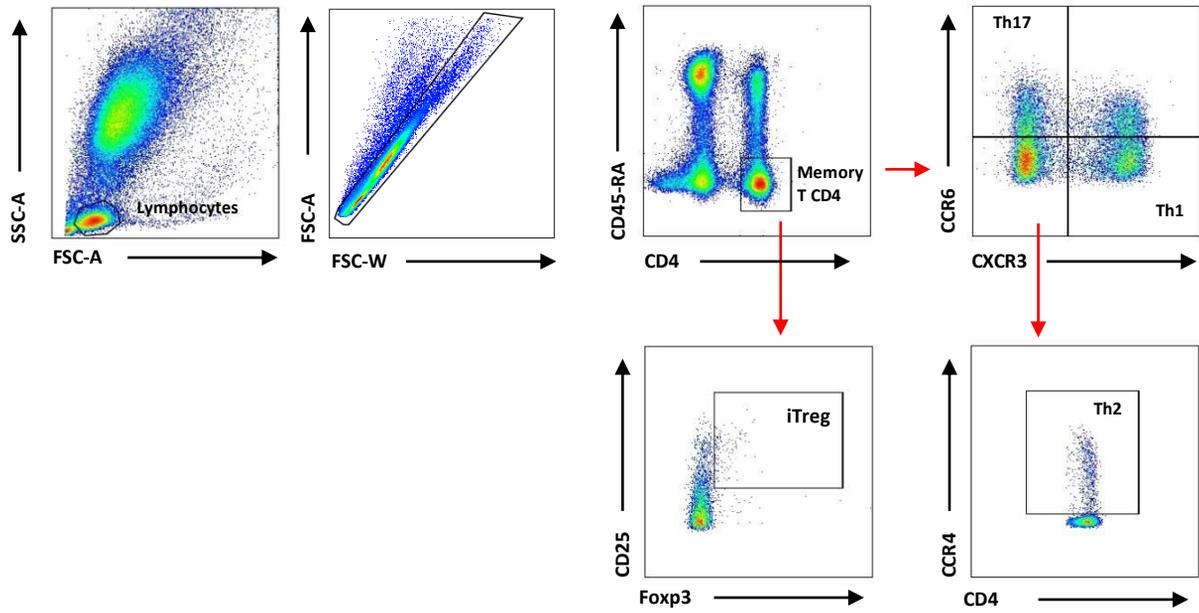
B. CD4 naïve T cells (CD4⁺ CD45RA⁺) were sorted from blood of healthy volunteers and then differentiated or not into Th1, Th2 and Treg cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 72 hours treated or not with the SIRT1 agonists (0.5 mM of metformin, resveratrol and SRT1720).

qRT-PCR analysis of *Tbx21* and *Ifng* (left top), *Gata3*, *il4* and *il5* (right top) and *Foxp3*, *Ctla4* and *Gitr* (bottom) mRNA expression was assessed on day 3 of culture. Expression is presented relative to *Actb* expression.

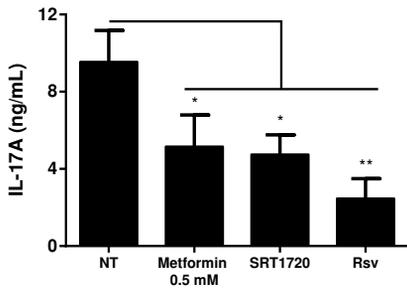
NS, not significant and *P < 0.05 (Mann-Whitney test). Data are from three (b) independent experiments (median and s.e.m.). (a) is a representative of three independent experiments.

Supplementary Figure 6

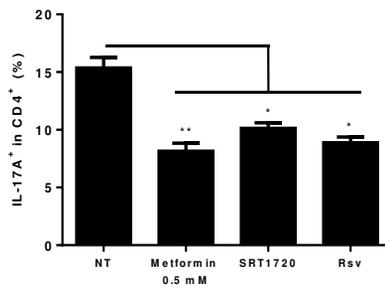
A



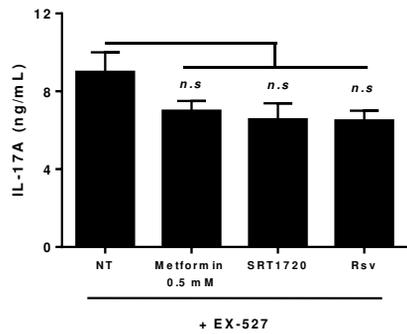
B



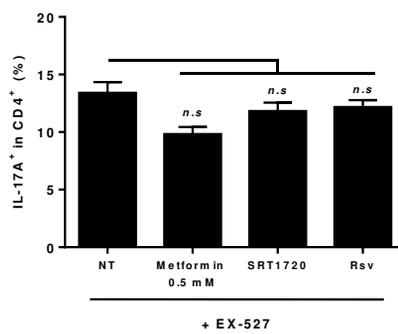
C



D



E



Supplementary Figure 6

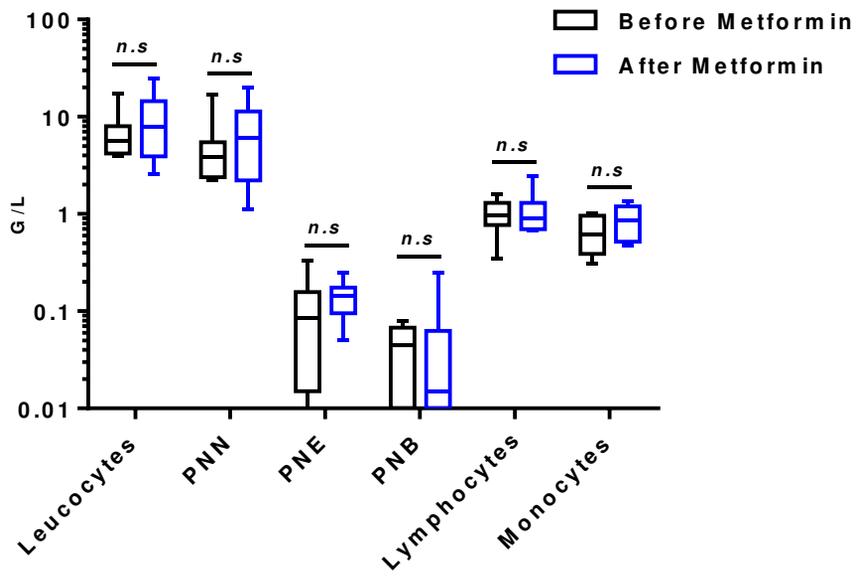
A. Flow cytometry gating strategy to identify human memory CD4 T cell subpopulations through chemokine receptor expression.

B and C. Memory Th17 (CD4⁺ CD45RA⁻ CCR6⁺ CXCR3⁻) cells were sorted from blood of healthy volunteers and stimulated in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 72 hours treated or not with the SIRT1 agonists (low dose of metformin, resveratrol and SRT1720). IL-17A secretion or expression was assessed using ELISA on supernatants after 3 days of culture (B) and using intracellular cytokine staining after 3 days of culture (C).

D and E. Same as B and C, but memory Th17 cells were also treated with EX-527 for 72 hours. IL-17A secretion or expression was assessed using ELISA on supernatants after 3 days of culture (D) and using intracellular cytokine staining after 3 days of culture (E).

NS, not significant; *P < 0.05 and **P < 0.01 (Mann-Whitney test). Data are from three (a, b, c, d, e, f) independent experiments (median and s.e.m.).

Supplementary Figure 7



Supplementary Figure 7

Blood parameters in metastatic colorectal cancer patients before and after metformin treatment.

Supplementary Table 1

Patients (N = 10) characteristics

Age (years)	Mean 56 range [42-67]
Sex	
Male	7
Female	3
pTumor origin	
Colon	6
Rectum	4
Metastatic sites (number)	
1	4
2	4
3 or more	2
CEA level ng/mL	Mean : 67 range [34-134]
Genetic Mutations	
RAS	5
RAF	1

Supplementary Table 1

Patient characteristics

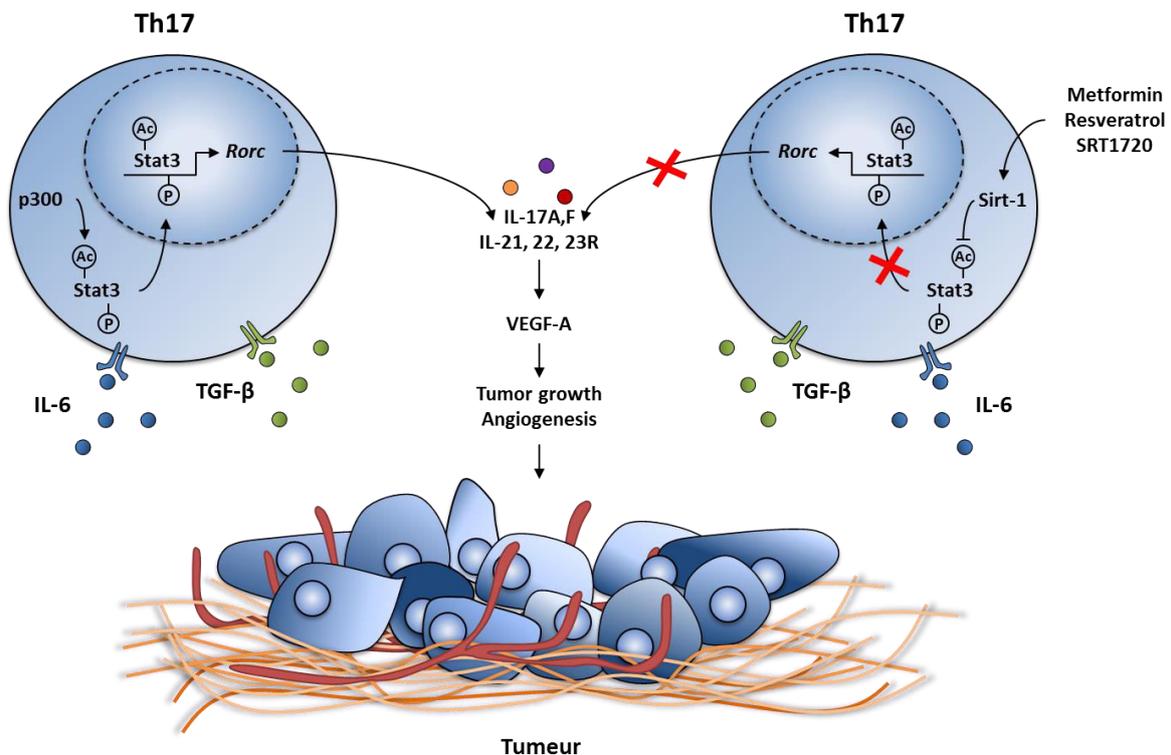
Ce projet nous a permis de mettre en évidence différents points importants :

1. Rôle de l'activation de SIRT1 sur la polarisation T-CD4⁺

- ✓ L'activation de SIRT1 par les agonistes des agonistes pharmacologiques (resvératrol, SRT1720, metformine) permet d'inhiber spécifiquement la polarisation Th17 chez la souris et chez l'homme. Elle n'impacte pas la polarisation Th1, Th2 et T_{Reg}.
- ✓ L'activation de SIRT1 inhibe la voie STAT3 par désacétylation et inhibition de sa translocation nucléaire, il en résulte une absence d'expression génique du facteur de transcription ROR γ t indispensable à la bonne marche du programme Th17.

2. L'activation de SIRT1 *in vivo*

- ✓ L'activation *in vivo* de SIRT1 diminue le nombre de Th17 et permet de retarder la croissance tumorale de deux modèles précliniques de cancer (B16F10 : mélanome et CT26 : cancer colique). Ce retard est lié à une diminution de la production de VEGF-A dans la tumeur.



3. Perspectives thérapeutiques pour la prise en charge du mCCR :

Les conclusions et perspectives de l'article précédant faisait appel à l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le mCCR associant le FOLFOX-bevacizumab à des agents

ciblant les cellules Th17. Le travail que nous avons mené sur les agonistes de SIRT1 s'inscrit dans cette démarche qui vise à stopper l'inflammation et l'angiogenèse induites par les Th17 dans le mCCR. Les premiers résultats que nous avons obtenus chez l'homme montre que la prise de metformine permet effectivement de limiter la fonctionnalité des cellules Th17 tout en conservant celle des populations de bon pronostic dans ce cancer (Th1, T_{Reg}). Nous pourrions donc envisager à l'avenir la mise en place d'essais thérapeutiques dans le cancer colorectal associant la metformine au FOLFOX-bevacizumab.

La confrontation de nos données et des publications de la littérature concernant l'impact de SIRT1 sur la polarisation des Th17 peut montrer quelques contradictions en particulier depuis la publication de l'équipe d'Eric Verdin (Lim et al, 2015). Nous avons montré que l'activation de SIRT1 par des agonistes pharmacologiques provoque une diminution de la différenciation des Th17 par l'intermédiaire de la désacétylation de STAT3. Cette modification de STAT3 supprime l'expression de *RORc* et de *il-17a*. L'équipe d'Eric Verdin a montré que SIRT1 pouvait au contraire favoriser la polarisation des cellules Th17 grâce à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de RORgt suite à sa désacétylation. Ces données pourraient laisser croire à un rôle biphasique de SIRT1 sur la polarisation des Th17. Mais il est important de préciser que l'équipe de Verdin n'a pas étudié les mêmes mécanismes biologiques que nous et les autres équipes étudiant le rôle de SIRT1 sur la polarisation des Th17. Cet article est également assez en contradiction avec l'ensemble des données de la littérature sur l'impact biologique de SIRT1 dans les processus inflammatoires.

Notre hypothèse de départ concernant la régulation de la polarisation des Th17 repose sur le contrôle de l'activité de STAT3, un facteur de transcription impliqué très précocement dans le programme de différenciation des Th17. STAT3 à la possibilité de contrôler l'expression génique de *RORc* qui pourra à son tour induire avec STAT3 l'expression de *il-17a*. Nous avons montré que l'activation de SIRT1 dès le début de la polarisation des Th17, permet de limiter l'acétylation de STAT3, ce qui empêche l'expression de *RORc* et par voie de conséquence l'expression protéique de RORgt et de l'IL-17A. L'impact de SIRT1 sur STAT3 est décrit par de nombreuses autres équipes dans différents modèles cellulaires et pathologiques (obésité, inflammation articulaire, cutanée, neurologique, ect). L'effet anti-inflammatoire de SIRT1 est également lié à la désacétylation d'autre facteur de transcription tels que NFκB, AP-1, NFAT, Bclaf1 (pour revue voir : Kong S et al, 2012). Il est également important de replacer SIRT1 et la réponse inflammatoire dans le contexte métabolique. La réponse immunitaire effectrice nécessite la prolifération rapide des clones T et donc un métabolisme énergétique basé sur la glycolyse. Dans ce contexte, l'axe AMPK/SIRT1 est régulé négativement pour justement permettre l'utilisation du glucose et la production d'ATP au niveau de la mitochondrie. En cas, de restriction calorique, le rapport ATP/ADP change et provoque une activation de l'AMPK qui

régule les taux de NAD⁺ pour induire l'activité de SIRT1. La cellule change alors complètement de stratégie d'un point de vue métabolique et va chercher à économiser son énergie en recyclant le groupement acétyl sur les protéines pour produire de l'acétyl-CoA. SIRT1 intervient à cette étape de désacétylation des protéines et l'économie d'énergie imposée par SIRT1 n'est pas en faveur de la réponse inflammatoire. Notre analyse du rôle de SIRT1 sur la polarisation des Th17 repose justement sa régulation dans un contexte de restriction calorique. Nous avons utilisé la metformine comme activateur de SIRT1, une molécule qui joue sur le ration ATP/ADP et NAD⁺/NADH. L'activation de SIRT1 par la metformine dépend de l'activation de l'AMPK ce qui permet d'induire le « remodelage » métabolique. Cet axe AMPK/SIRT1 est très important dans la régulation de la polarisation cellulaire T-CD4 et de nombreuses études récentes montre que jouer sur cet axe permet de moduler la balance Th17/T_{Reg}. Une étude vient justement de montrer que l'activation de la voie AMPK/SIRT1 par l'adiponectine, une cytokine produite par le tissu adipeux, permet de réguler négativement l'expression de *RORc* via l'activation du facteur de transcription PPAR γ . Dans cette étude, l'absence de SIRT1 provoque une augmentation de l'expression protéique de ROR γ t et une plus forte production d'IL-17A (Zhang Kai et al, 2016). D'autres études, utilisant d'autres activateurs de SIRT1, tel que le NAD⁺, décrivent aussi cet axe moléculaire comme limitant la polarisation des Th17 et le processus d'EAE chez la souris. (Wang J, Int Immunopharmacol, 2016 ; Wang J, J Neuroimmunol, 2016). Dans le cancer chez l'homme, des données récentes de la littérature montrent également que la metformine peut limiter le risque de rechute des patients hyperglycémiques et porteurs de cancer du pancréas (Pusceddu S et al, ESMO Abstract 2016). Ces données sont largement contradictoires avec la publication de l'équipe d'Eric Verdin qui s'est-elle intéressée au rôle de SIRT1 beaucoup plus en aval du programme de différenciation des Th17. Ils ont en effet étudié l'impact de SIRT1 sur l'acétylation de ROR γ t sans activation préalable. Les travaux de cette équipe indiquent qu'en désacétylant ROR γ t, SIRT1 augmente son activité transcriptionnelle ce qui favorise l'expression de l'il-17a. C'est le premier article présentant un rôle pro-inflammatoire de SIRT1 alors que des dizaines d'article étudiant le rôle de SIRT1 dans de nombreux modèles pathologiques indique très clairement que cette enzyme joue un rôle anti-inflammatoire puissant et qu'elle permet de protéger de nombreux organismes des pathologies liées au vieillissement. L'utilisation d'agonistes pharmacologiques de SIRT1 ou le recours à la restriction calorique pour limiter l'inflammation due en particulier au Th17 est au vue de la littérature, je pense, la meilleure stratégie à adopter. Les oncologues médicaux peuvent être craintifs quant à l'utilisation de ces méthodes thérapeutiques chez les patients qui présentent une cachexie et des dysfonctionnements d'organes importants. Néanmoins de nombreuses études prouvent que cette alternative thérapeutique est crédible et qu'elle permet, lorsqu'elle est combinée à la chimiothérapie, d'obtenir des réponses importantes

tout en limitant les effets secondaires des traitements chez la souris (Raffaghello *et al*, 2008 ; Lee C *et al*, 2010) et chez l'homme (Raffaghello *et al*, 2010; Safdie *et al*, 2009). Une étude récente publiée par l'équipe de Valter Longo dans la célèbre revue *Cancer Cell*, montre d'ailleurs que combiner plusieurs périodes de jeûne avec une chimiothérapie (doxorubicine) permet d'induire la prolifération des progéniteurs lymphoïdes, d'augmenter la fonction anti-tumorale des T-CD8⁺ et l'immunogénicité des tumeurs par l'inhibition de l'enzyme HO-1 (*Heme-Oxygenase 1*) ce qui permet d'obtenir un effet thérapeutique dans le cancer du sein et le mélanome (Di Biase *et al*, 2016). C'est aux laboratoires universitaires de poursuivre ces recherches, qui ne sont pas forcément dans l'intérêt des industries pharmaceutiques, mais qui ont néanmoins toutes leur place en oncologie. La démonstration que nous avons faite avec ce travail, permet également d'apporter des preuves concrètes de cibler SIRT1 chez l'homme et donc de crédibiliser les approches moins conventionnelles que sont la restriction calorique ou le jeûne. Pour finir, ce travail ne se délimite pas uniquement à la prise en charge du cancer puisque l'utilisation d'agents pharmacologiques capables d'inhiber la polarisation des Th17 peut avoir une utilité dans le traitement de nombreuses maladies inflammatoires tels que le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde ou encore les maladies neurodégénératives.

PROJET 3 – Résultats préliminaires

**Rôle des cellules myéloïdes circulantes sur l'efficacité
thérapeutique du nivolumab dans le cancer
bronchique non à petites cellules (CBNPC)**

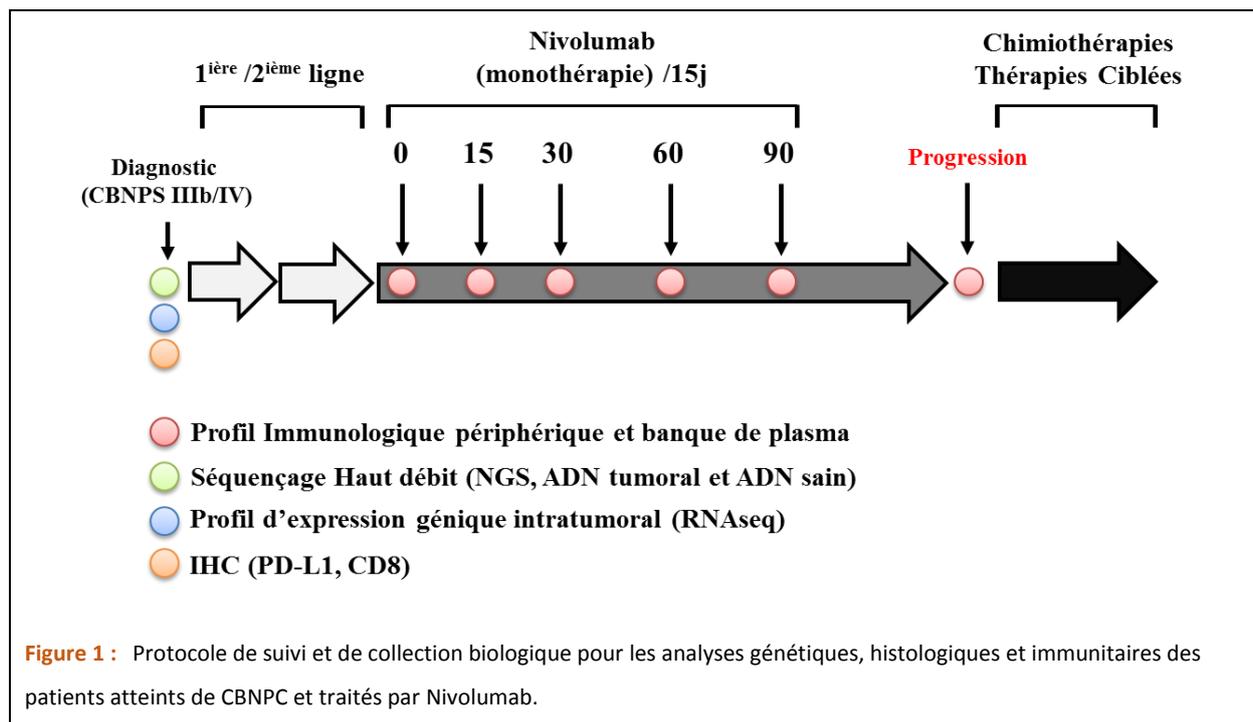
a) Contexte du projet et objectifs

Malgré les progrès récents dans le démantèlement moléculaire des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC), le pronostic des malades de stade avancé reste sombre. La majorité des CBNPC de stade avancé (IIIB, IV) est traitée par une chimiothérapie cytotoxique basée sur l'utilisation d'un sel de platine (cisplatine ou carboplatine) associé à une autre chimiothérapie (docétaxel, pemetrexed, gemcitabine). En plus de ces agents, des thérapies ciblées visant le VEGF-A (bevacizumab) peuvent être associées. En cas de mutation activatrice de l'EGFR, ou de réarrangements ou mutations activant ALK ou ROS, des inhibiteurs de tyrosines kinases sont utilisés. Malgré l'efficacité de ces thérapies ciblées, le pronostic reste sombre et la maladie finit par échapper au traitement assez rapidement. Suite à cette progression, une deuxième ligne de traitement est nécessaire. Récemment, l'immunothérapie utilisant des anticorps monoclonaux ciblant les checkpoints inhibiteurs de la réponse immunitaire, tels que l'interaction PD-1/PD-L1, ont démontré une supériorité par rapport aux traitements de chimiothérapie standards en deuxième ligne.

L'étude CheckMate 057 (Borghaei *et al*, 2015), comparant le nivolumab (anticorps anti-PD-1) au docétaxel dans les adénocarcinomes bronchiques avancés ayant progressé après une première ligne de traitement (comprenant un sel de platine), a montré un allongement de la survie globale médiane (SG) (Hazard Ratio (HR) = 0,73 (95% CI, 0.59 - 0.89; $p = 0,002$)). Cet essai a également montré un taux de réponse objective (RO) à 19% pour le nivolumab *versus* 12% pour le docétaxel ($p = 0,002$). De manière similaire, l'étude CheckMate 017 (Brahmer *et al*, 2015) a comparé le nivolumab au docétaxel dans les carcinomes épidermoïdes bronchiques avancés ayant progressé après une première ligne de chimiothérapie à base de sels de platine. Cette étude confirme un bénéfice en faveur du nivolumab en terme de survie globale avec un « hold ratio » (HR) pour le décès à 0.59 (95% CI, 0.44 - 0.79; $p < 0,001$). Le taux de RO était de 20% pour le nivolumab contre 9% pour le docétaxel ($p = 0,008$). Enfin, la Survie Sans Progression (SSP) était en faveur du nivolumab (HR = 0.62 (95% CI, 0.47 - 0.81; $p < 0,001$)) (Brahmer *et al*, 2015). Le nivolumab a ainsi obtenu son autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement de deuxième ligne des carcinomes épidermoïdes et des adénocarcinomes bronchiques qui ne présentent pas d'altérations de l'EGFR et d'ALK, et à partir de la troisième ligne pour les adénocarcinomes EGFR mutés, ou ALK réarrangés.

Malgré l'apport indéniable de l'immunothérapie par nivolumab dans la prise en charge des CBNPC, ce traitement n'est pas efficace chez tous les malades, et des biomarqueurs prédictifs du bénéfice à ce traitement sont absolument nécessaires pour prendre en charge correctement et rapidement les patients. Cependant, à ce jour, aucun biomarqueur prédictif de l'efficacité thérapeutique du nivolumab n'a pu être identifié de manière claire et consensuelle.

Le projet que nous avons mis en place en avril 2015 consiste donc à générer une cohorte prospective bi-centrique entre les centres de lutte contre le cancer de Dijon (Centre Georges-François Leclerc) et de Lyon (Centre Léon Bérard). Les patients inclus sont atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules de stade IIIB ou IV et traités dans le cadre de l'AMM par nivolumab. Ils bénéficient d'un immunomonitoring multiparamétrique périphérique (sang) afin de tenter de générer une signature prédictive du bénéfice de ce traitement. Le protocole de recueil biologique est présenté ci-dessous. Les marqueurs utilisés, la méthode de marquages et la stratégie d'analyse sont présentés dans la partie matériels et méthodes.



b) Matériels et méthodes

(i) Génération de la cohorte prospective et de validation de CBNPC et des volontaires sains

Nous avons prévu d'inclure 104 malades dans cette cohorte (52 pour la série test et 52 pour la série de validation). Depuis Avril 2015, nous avons déjà inclus 82 malades (60 à Dijon et 22 à Lyon). L'analyse statistique sera réalisée de deux façon. Premièrement, nous réaliserons une analyse en distinguant deux groupes en fonction du bénéfice clinique du nivolumab (la limite que nous avons choisie est placée à une survie sans progression de la maladie supérieure (PFS) ou égale à 6 mois). Deuxièmement, nous ferons l'analyse en considérant la PFS comme une donnée continue. Le protocole de suivi et de collection biologique des patients est présenté dans la figure de la partie matériel et méthode. Le calcul du nombre des patients a été déterminé selon les hypothèses

suivantes : en se basant sur les études précédentes (Borghaei *et al*, 2015; Brahmer *et al*, 2015) on peut estimer que 20 à 40% des patients traités seront indemnes de progression tumorale à 6 mois (somme des réponses partielles et des stabilisations). Les calculs réalisés par les biostatisticiens montrent qu'il faut inclure au total 52 sujets pour la cohorte test et 52 pour la cohorte de validation. Dans le but de comparer le profil immunologique des CBNPC à des personnes sans cancer, nous avons également obtenue des prélèvements sanguins de volontaires sains (10 volontaires sains ont pu être inclus à ce jour).

(ii) *Marqueurs utilisés pour l'identification des populations leucocytaires*

Les marqueurs utilisés pour l'identification des différentes populations leucocytaires sont répartis en quatre panels d'anticorps fluorescents indiqués ci-dessous :

CD8 épuisés				T helper			
Marqueur	Fournisseur	Clone	Fluorochrome	CD4	Milteny	VIT4	VioGreen
CD8	Milteny	BW135/80	VioGreen	CD45RA	Milteny	T6D11	APC-Vio 770
CD45RA	Milteny	T6D11	APC-Vio 770	CD25	Milteny	3G10	APC
CD44	Milteny	DB105	APC	CCR6	Milteny	REA190	PE
CCR7	Milteny	REA547	PE	CXCR3	Milteny	REA232	PE-Vio770
CD62L	Milteny	145/15	PE-Vio770	CRTH2	BD	BM16	BV421
CD3	Milteny	BW264/56	VioBlue	Tim-3	Milteny	F38-3E2	FITC
Tim3	Milteny	F38-3E2	FITC	PD-1	ebioscience	MIH4	PerCP-eFluor700
PD-1	ebioscience	MIH4	PerCP-eFluor700				

Treg/NK				Panel "Immunité Innée"			
CD4	Milteny	VIT4	VioGreen	HLA-DR	Milteny	AC122	VioBlue
CD45RA	Milteny	T6D11	APC-Vio 770	CD15	Milteny	VIMC6	VioGreen
CD25	Milteny	3G10	APC	CD33	Milteny	AC104.3E3	APC-Vio 770
Foxp3	Milteny	3G3	PE	PD-L1	ebioscience	MIH1	APC
CD56	Milteny	AF12-7H3	PE-Vio770	CD123	Milteny	AC145	PE
CD3	Milteny	BW264/56	VioBlue	CD11c	Milteny	MJ4-27G12	PE-Vio 770
Tim3	Milteny	F38-3E2	FITC	CD3	Milteny	REA613	FITC
PD-1	ebioscience	MIH4	PerCP-eFluor700	CD56	Milteny	REA196	FITC
				CD19	Milteny	LT19	FITC
				CD20	Milteny	LT20	FITC
				CD14	ebioscience	61D3	PerCP-eFluor700

Tableau 1 : Panel de marquage utiliser pour l'identification des population lymphoïdes (T-CD4, T-CD8, T_{Reg} et NK) et myéloïdes (gMDSC, mMDSC, Monocytes, granulocytes, mDC et pDC)

(iii) *Marquage, numération et identification des populations leucocytaires*

Le sang du patient est prélevé sur tube anticoagulant (héparinate de sodium). 100 µL de sang total est introduit dans un tube de cytométrie en flux et 50 µL du mélange d'anticorps est ajouté. Le

mélange est réalisé dans le tampon FSB (eBioscience). Après 45 minutes de marquage à température ambiante, 2 mL de solution de lyse des globules rouges est ajouté pendant 10 minutes à température ambiante. Après ce temps d'incubation, les tubes sont centrifugés pendant 5 minutes à 450g, la solution de lyse est jetée et 300µL de tampon de fixation/perméabilisation (eBioscience) est ajouté pendant 45 minutes à 4°C. Une fois cette étape terminée, les tubes sont une nouvelle fois centrifugés et 400 µL de tampon FSB est ajouté dans les tubes des panels « CD8 épuisés », « Thelper » et « Immunité innée ». Pour les tubes du panel « NK/Treg », 300µL de tampon de fixation/perméabilisation (ebioscience) contenant l'anticorps anti-Foxp3 (3µL/tube) et ajouté pendant 45 min à température ambiante. Une fois l'incubation de cet anticorps terminé, le tube est centrifugé et 400µL de tampon FSB est ajouté. Les tubes sont conservés à 4°C et à l'abri de la lumière jusqu'à l'analyse sur le cytomètre en flux LSRII (BD Biosciences). Avant de passer les cellules au cytomètre en flux, les 400 µL de suspension cellulaire sont vortexés et transférés dans des tubes truecount (BD Biosciences) qui permettent de réaliser une numération absolue des populations leucocytaires. La numération absolue des cellules leucocytaires est réalisée grâce au tubes truecount. Ces tubes contiennent un nombre connu de billes lyophilisées, identifiables en cytométrie sur la fenêtre taille (FSC-A) /structure (SSC-A). La concentration (nombre cellules/µL de sang) d'une population A est obtenue selon la formule suivante : $[A] = A_{\text{comptées}} / [(billes_{\text{comptées}} / (bille_{\text{truecount}}/400))/4]$. L'expression de PD-L1, PD-1 ou Tim-3 peut être exprimé en nombre absolu de cellules positive pour ces marqueurs ou en intensité moyenne de fluorescence.

c) Résultats

Les résultats présentés ci-après sont préliminaires et se focalisent sur l'analyse du panel d'identification et de caractérisation des cellules myéloïdes circulantes (gMDSC, mMDSC, mDC, pDC, monocytes et granulocytes) pour les 49 premiers malades inclus. L'analyse des cellules lymphoïdes circulantes (T-CD4⁺, T-CD8⁺ et NK) a également été réalisée mais n'a pas été intégré à l'analyse statistique pour générer le modèle prédictif. Elles ont néanmoins été exploitées pour établir un lien biologique avec le modèle établi avec les cellules myéloïdes et pour générer des hypothèses.

(i) Caractéristiques des populations analysées

Les 49 patients atteints de CBNPC de stade IIIb/IV ont été inclus de Mai 2015 à Mai 2016 au sein du Centre George François Leclerc. Les différentes caractéristiques de ces patients sont présentées dans le tableau 1. Notre population est composée à 77,6% d'homme et d'une majorité de personne âgés (âge médian de 66,6 ans). Une très faible proportion des patients n'avait jamais fait usage de tabac (10,2%). 61,2% des patients présentaient un CBNPC de type adénocarcinome et 38,8% de type épidermoïde. 83,7% des patients présentaient un stade très avancé de type IV, contre

12,2% de patients avec un stade IIIb. Les patients avaient déjà reçu au moins une première ligne de traitement par chimiothérapie (range 1-5) avec un nombre médian de lignes thérapeutiques préalables de 2. Les traitements de premières lignes sont variés mais repose dans 73,3% des cas sur l'utilisation d'un doublet thérapeutique comportant un sel de platine (Cisplatine ou Carboplatine).

Sex, No. (%)		Specific mutation before NGS No. (%)	
Female	11 (22,4)	EGFR	2 (4,1)
Male	38 (77,6)	KRAS	10 (20,4)
Age at diagnosis, years		BRAF	1 (2)
Median	66,6	Other	1 (2)
Range	(50,9-84,9)	No mutation	36 (73,5)
ECOG performance status, No. (%)		Number of lines of treatment	
0	22 (44,9)	Median	2,18
1	25 (51,0)	Range	(1-5)
2	2 (4,1)	Chemotherapy used in first line	
≥ 3	0 (0)	Platine Premetrexed	21 (22,4)
Cigarette smoking history, No. (%)		Platine Gemcitabine	10 (20,4)
Never smoked	5 (10,2)	Platine Paclitaxel	6 (12,2)
Former or current smoker	44 (89,8)	Platine Docetaxel	6 (12,2)
Unknown	0 (0)	Platine Navelbine	3 (6,1)
Histology, No. (%)		Navelbine	1 (2)
Adenocarcinoma	30 (61,2)	TKI	1 (2)
Squamous cell carcinoma	19 (38,8)	Unknown	1 (2)
Other	0 (0)	Chemotherapy + bevacizumab	8 (16,3)
Stade No. (%)			
IIIb	8 (16,3)		
IV	41 (83,7)		
Brain metastase, No. (%)			
Yes	6 (12,2)		
No	43 (87,8)		

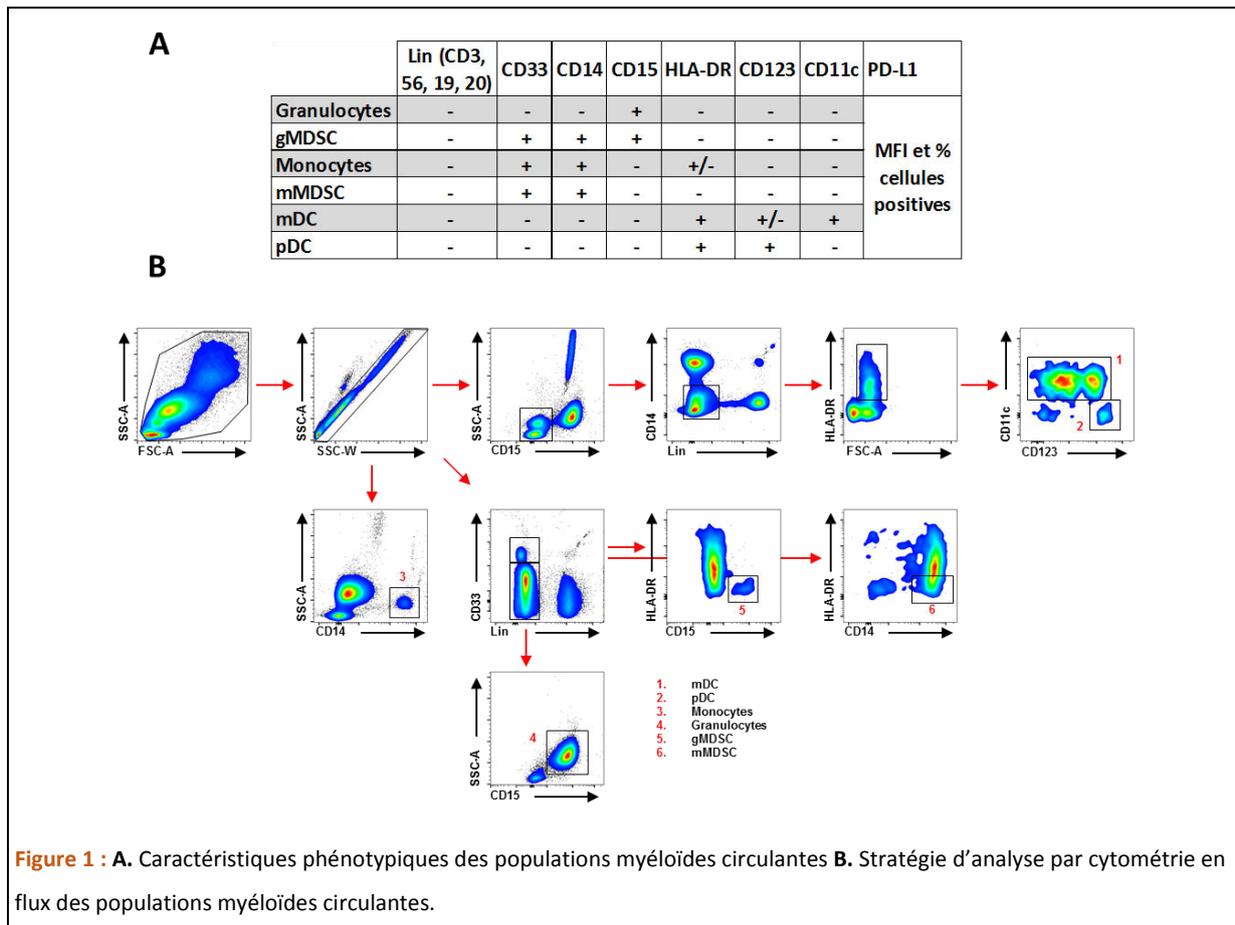
Tableau 2 : Caractéristiques de 49 patients atteints de CBNPC et traités par Nivolumab

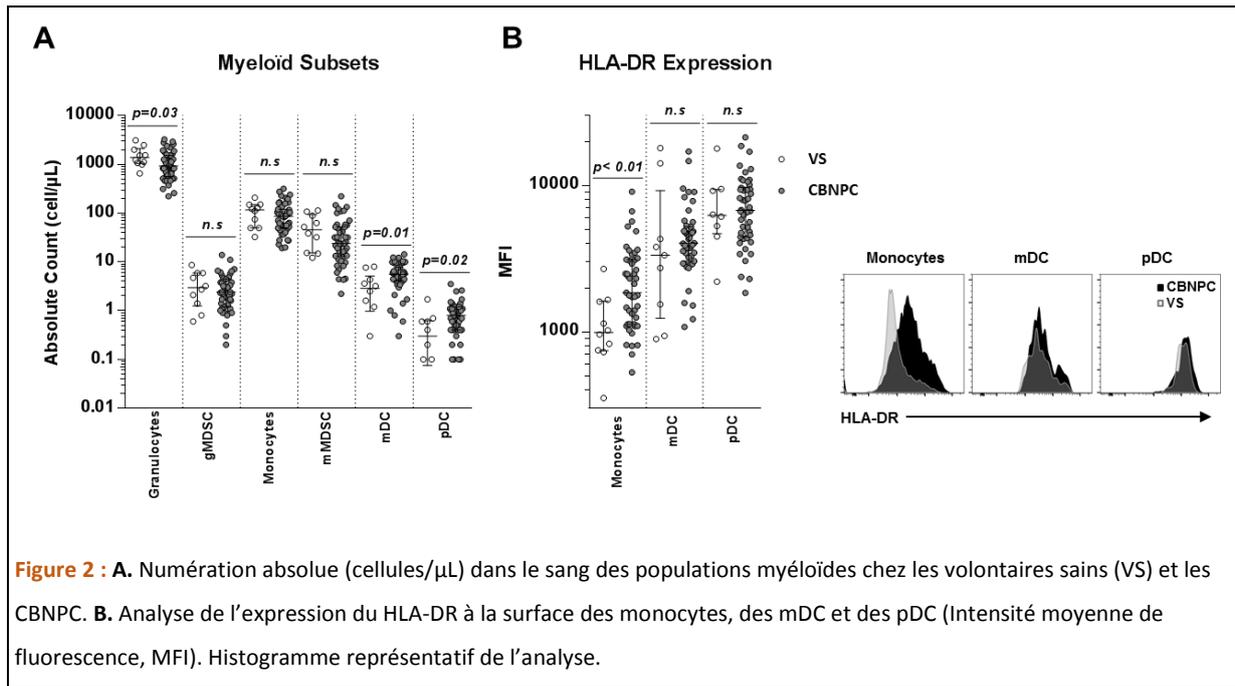
Les 10 donneurs sains inclus dans notre étude l'ont été entre Janvier 2016 et Avril 2016, 5 femmes et 5 hommes d'un âge médian de 66 ans (range de 61 à 70 ans). Tous ces patients n'ont jamais présenté de pathologies auto-immunes ou cancéreuses et elles ne présentaient au moment de l'inclusion aucun signe d'infection ou d'affection pouvant être à l'origine de modifications immunologiques majeures.

(ii) *Comparaison du profil immunologique initial : donneurs sains versus CBNPC*

Dans un premier temps, nous avons analysé le profil immunologique circulant des donneurs sains et des CBNPC au moment de l'inclusion (avant Nivolumab) (**Figure 1A et B**). L'analyse du panel des cellules myéloïdes a révélé que le taux de granulocytes est significativement plus faible chez les CBNPC ($p= 0,03$). La quantité de monocytes est, elle, équivalente entre les deux groupes ($p= 0,43 : n.s$). Nous avons ensuite fait une constatation surprenante. Les CBNPC ne présentent pas une élévation du nombre absolue de cellules MDSC par rapport aux donneurs sains, qu'elles soient de type monocytaire ($p= 0,19 : n.s$) ou granulocytaire ($p=0,63 : n.s$). Ils possèdent néanmoins une élévation du taux des sous-types monocytaire ($p= 0,01$) et plasmocytaire ($p= 0,02$) des cellules

dendritiques circulantes (**Figure 2A**). Les cellules MDSC et en particulier, les mMDSC, sont caractérisées par une expression faible ou inexistence du HLA-DR. Lorsque nous avons analysé l'expression de ce marqueur (intensité moyenne de fluorescence, MFI), nous avons pu constater que les monocytes des CBNPC présentaient une MFI bien plus importante que les donneurs sains ($p=0,63 : n.s$). Ce résultat permet d'expliquer pourquoi le taux de mMDSC n'est pas supérieur chez les CBNPC (**Figure 2B**).





Nous avons ensuite réalisé l'analyse de l'expression de PD-L1 à la surface des différentes sous-populations myéloïdes. Nous avons mené deux types d'analyses. Premièrement la numération absolue des cellules PD-L1⁺ (**Figure 3A**) et ensuite calculé la MFI de PD-L1 (**Figure 3B**). Dans l'ensemble, nous pouvons constater que les cellules myéloïdes PD-L1⁺ sont plus nombreuses chez les CBNPC. Ce constat est particulièrement vrai pour les cellules monocytaires ($p=0,06$) et dendritiques (mDC, $p=0,02$; pDC, $p=0,04$). L'expression de ce marqueur (MFI) n'est pas différente entre les donneurs sains et les CBNPC (Figure 2B).

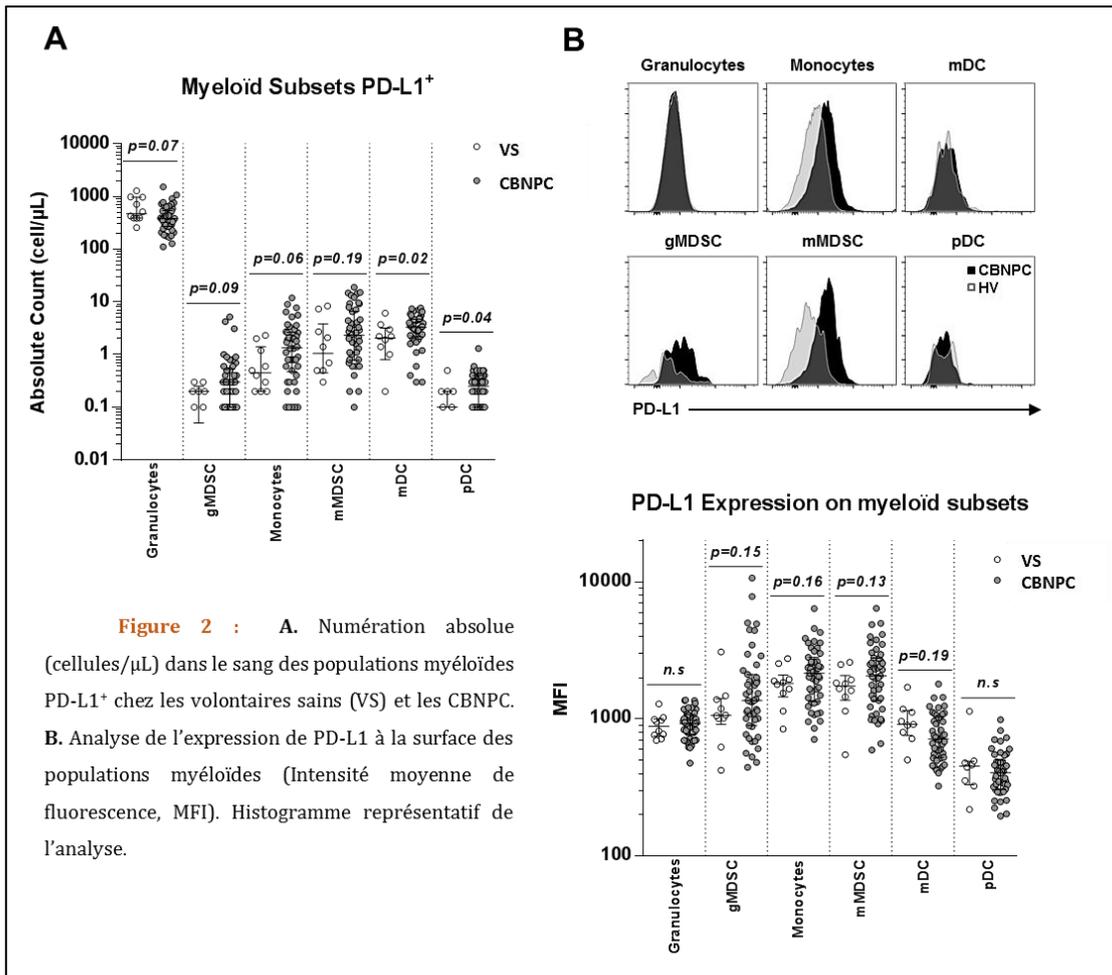


Figure 2 : A. Numération absolue (cellules/μL) dans le sang des populations myéloïdes PD-L1⁺ chez les volontaires sains (VS) et les CBNPC. B. Analyse de l'expression de PD-L1 à la surface des populations myéloïdes (Intensité moyenne de fluorescence, MFI). Histogramme représentatif de l'analyse.

Nous avons ensuite analysé les sous-populations lymphoïdes circulantes. Premièrement, cette analyse révèle que le taux de lymphocytes T totaux (CD3⁺) est le même entre donneurs sains et CBNPC. Il en est de même pour les cellules T-CD8⁺. Néanmoins, il existe une très forte tendance à la diminution en cellules T-CD4⁺ chez les CBNPC ($p=0,07$) (**Figure 4A**).

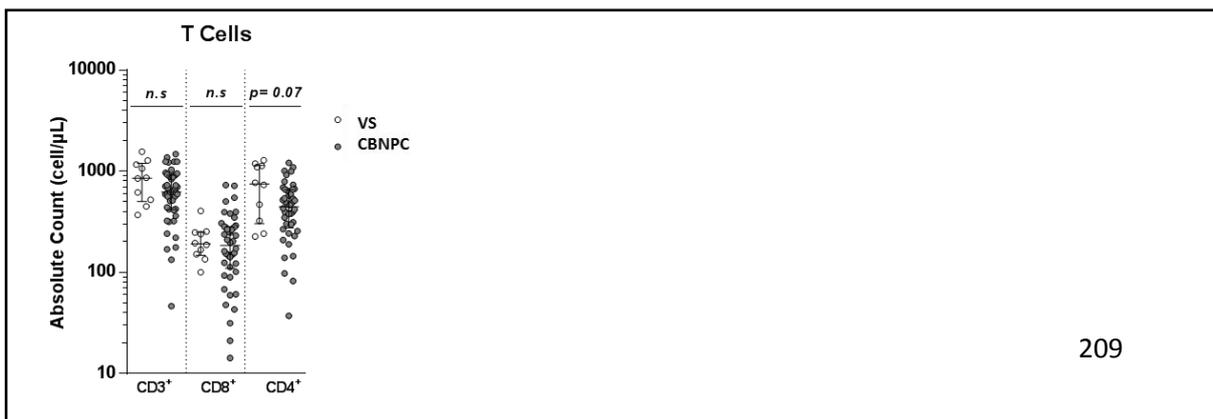


Figure 4 : A. Numération absolue (cellules/ μL) dans le sang des populations lymphoïdes chez les volontaires sains (VS) et les CBNPC (lymphocytes T totaux ($\text{CD}3^+$), $\text{T-CD}8^+$ et $\text{T-CD}4^+$).

Nous nous sommes ensuite intéressés aux sous-populations $\text{CD}8^+$ (Naïf (N), Central Mémoire (CM), Effecteur Mémoire (EM), Effecteur Mémoire $\text{CD}45^{\text{RAint}}$ (EM RAint) et Effecteur Mémoire Terminaux (EMRA)) (**Figure 5A**). Nous n'avons pas constaté de différences en terme de nombre entre les donneurs et les CBNPC. Une tendance à la baisse a néanmoins pu être observée sur la population centrale mémoire (CM) chez les CBNPC (**Figure 5B**). Cette observation se confirme avec l'analyse de la répartition des sous-populations $\text{T-CD}8^+$. En effet, il est probable que la chute de cette population chez les CBNPC soit associée à l'augmentation de la proportion en $\text{CD}8$ effecteurs terminaux (EMRA) (CM, $p=0,09$; EMRA, $p<0,001$) (**Figure 5C**).

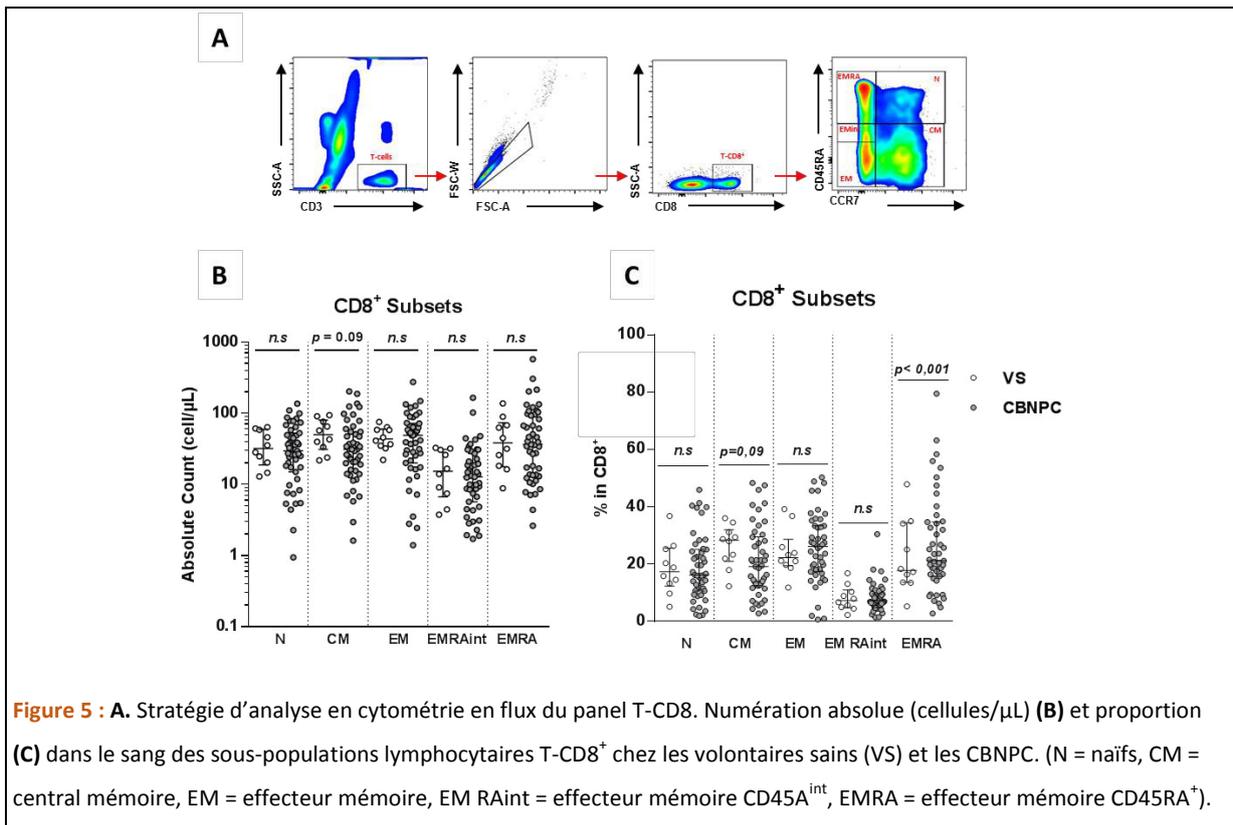
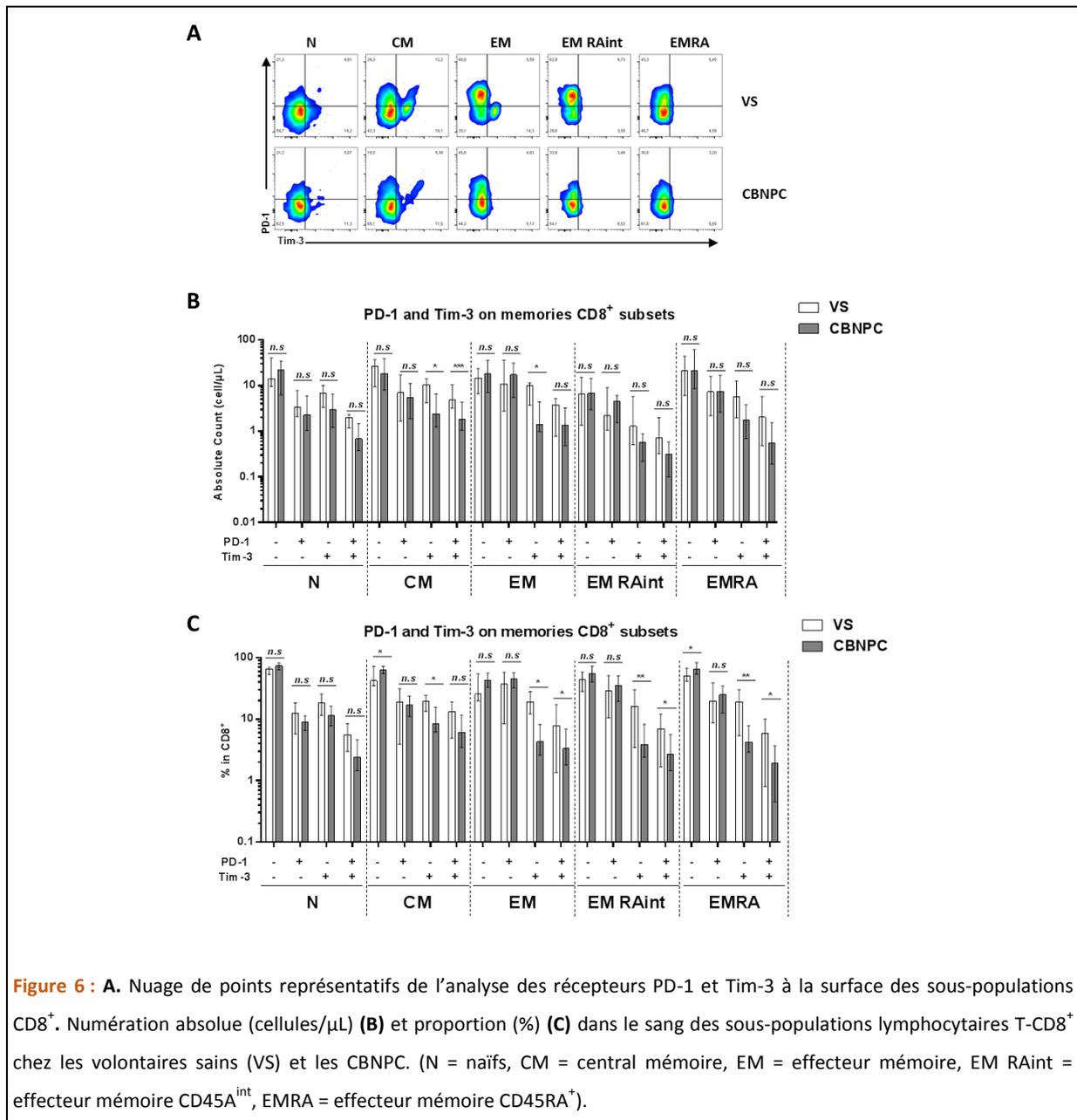


Figure 5 : A. Stratégie d'analyse en cytométrie en flux du panel T-CD8. Numération absolue (cellules/ μL) (**B**) et proportion (**C**) dans le sang des sous-populations lymphocytaires $\text{T-CD}8^+$ chez les volontaires sains (VS) et les CBNPC. (N = naïfs, CM = central mémoire, EM = effecteur mémoire, EM RAint = effecteur mémoire $\text{CD}45^{\text{Aint}}$, EMRA = effecteur mémoire $\text{CD}45^{\text{RA+}}$).

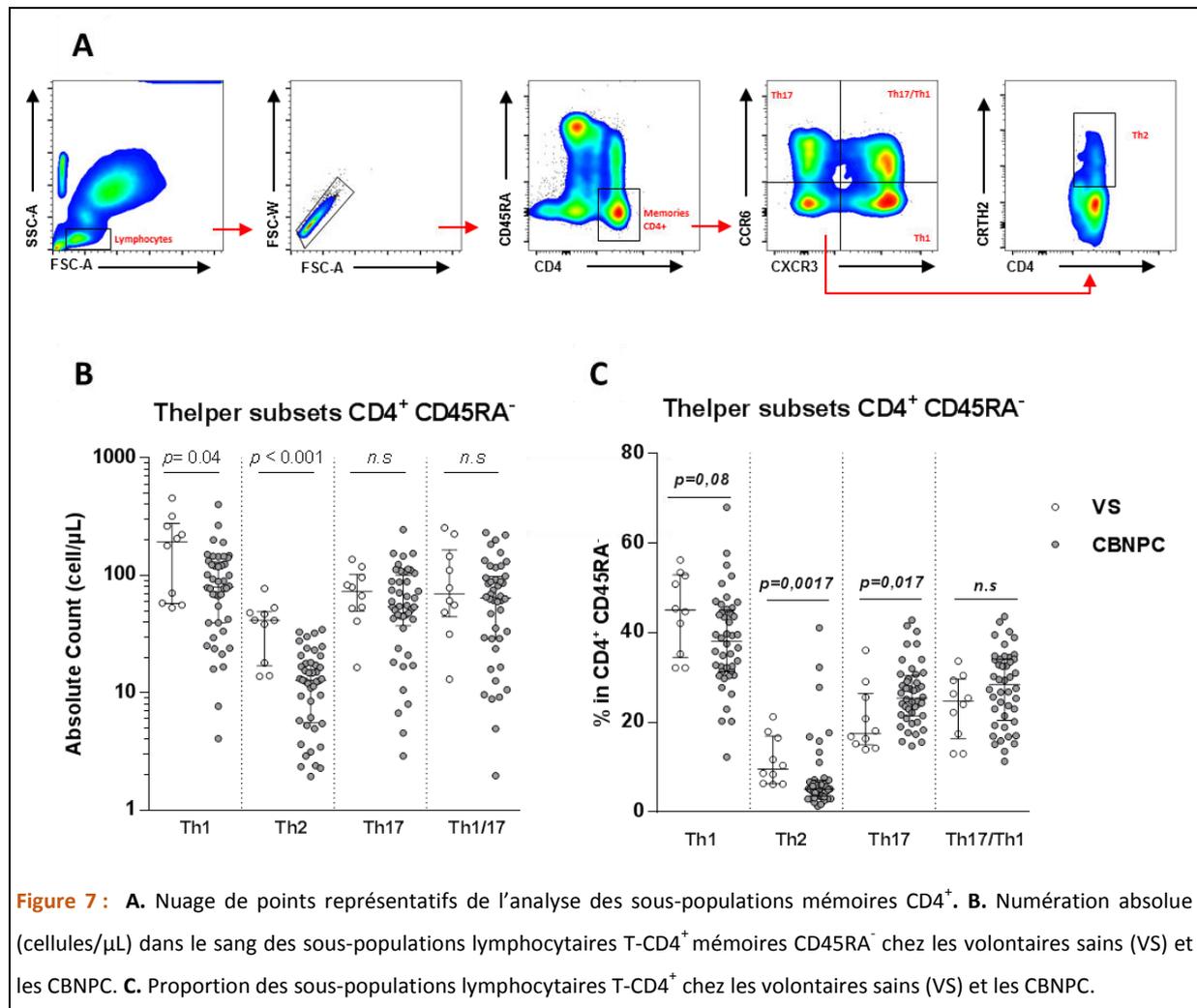
Après avoir analysé la quantité et la répartition des sous-populations $\text{T-CD}8^+$, nous avons également étudié leurs caractéristiques quant à l'expression des récepteurs inhibiteurs PD-1 et Tim-3 (**Figure 6A**). Nous avons confirmé les résultats obtenus par l'équipe de Daniel Speiser sur l'expression de ces récepteurs au niveau périphérique avec notamment un maximum d'expression de PD-1 sur les

CD8 effecteurs mémoire et une expression de Tim-3 assez équivalente entre les populations (Legat *et al*, 2013). Ce qui est le plus intéressant dans cette analyse c'est bien qu'il existe une différence en terme de nombre et également de répartition dans l'expression de ces deux récepteurs. En effet, la population PD-1⁻/Tim-3⁺ et PD-1⁺/Tim-3⁺ des CD8 effecteurs et centraux mémoires (EM et CM) chute significativement chez les CBNPC (**Figure 6B**). Il en est de même sur la répartition de ces deux populations pour l'ensemble des sous-types mémoires (CM, EM, EM RA^{int} et EMRA) (**Figure 6C**).



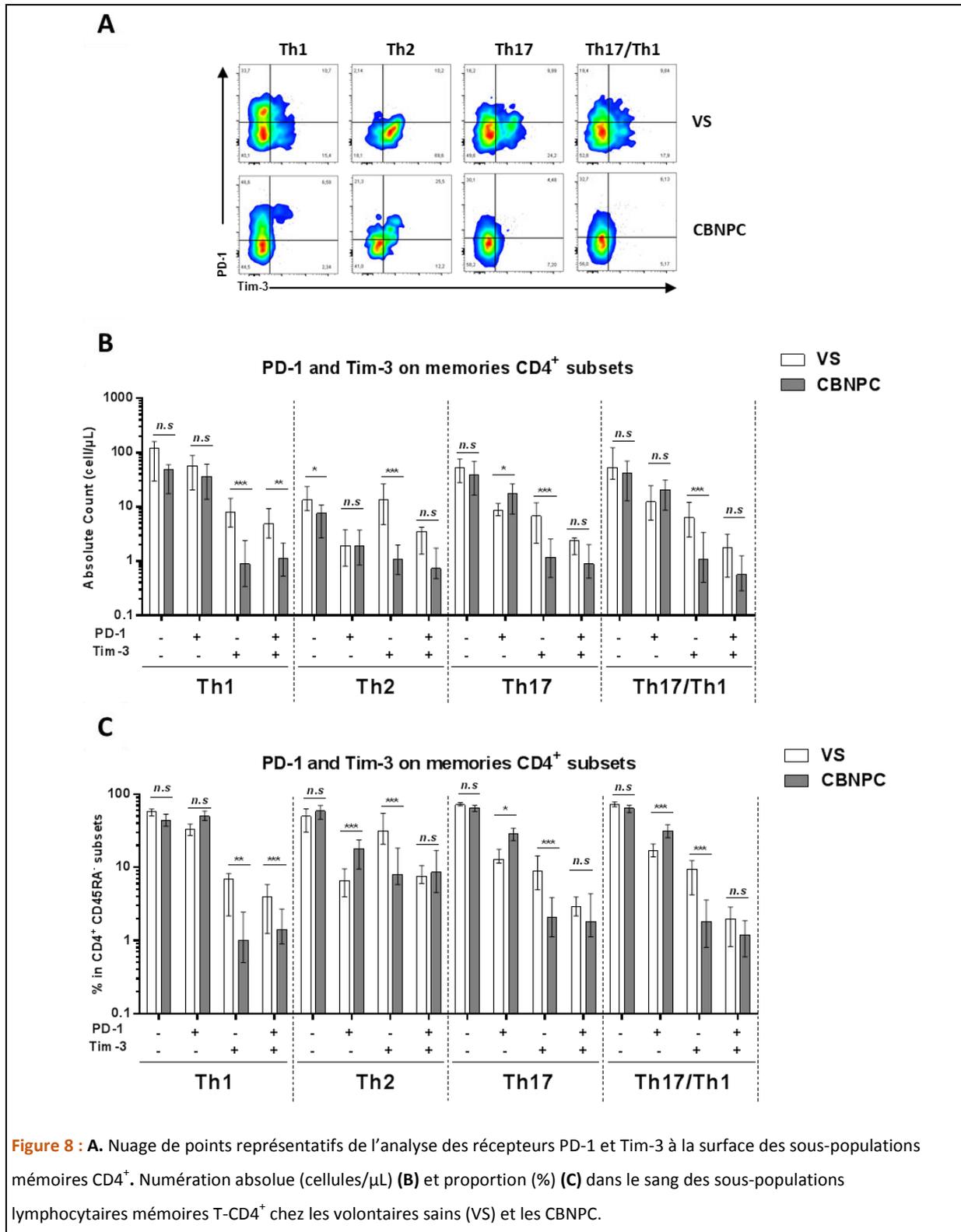
Nous avons ensuite comme pour les T-CD8⁺, analysé les sous-populations T-CD4⁺ (Th1, Th2, Th17 et Th1/Th17) (**Figure 7A**). Cette analyse révèle que le nombre de Th1 et de Th2 est réduit chez les CBNPC (Th1, $p=0,04$; Th2, $p<0,001$). Le nombre de Th17 et de Th17/Th1 est identique (**Figure 7B**).

L'analyse de la fréquence de ces sous-populations montre que les lymphocytes Th17 sont majoritaires au sein des T-CD4⁺ mémoires alors que celui des Th17/Th1 est identique (**Figure 7C**).



Nous avons ensuite analysé les caractéristiques des sous-populations T-CD4⁺ quant à l'expression des récepteurs inhibiteurs PD-1 et Tim-3. L'expression du marqueur PD-1 est fortement liée à la capacité du sous-type à produire des cytokines de type 1, en particulier l'IFN γ . C'est la raison pour laquelle, parmi les quatre populations Thelper analysées ici, ce sont les Th1 qui expriment majoritairement PD-1, suivi par les Th17/Th1, les Th17 et les Th2 (**Figure 8A**). La quantité absolue des cellules PD-1⁺ n'est pas modifiée entre donneurs sains et CBNPC, hormis pour le sous-type Th17 qui est plus important (**Figure 8B**). Tim-3 a été décrit comme un marqueur exprimé spécifiquement sur les cellules Th1 chez la souris (Hastings *et al*, 2009). L'analyse de ce marqueur révèle néanmoins qu'il peut être exprimé aussi par les cellules Th2, les Th17 et les Th1/Th17 chez l'homme. Il existe d'ailleurs des différences importantes sur le nombre des cellules Tim-3⁺ avec une chute significative chez les CBNPC sur l'ensemble des sous-populations Thelper. L'analyse de l'expression concomitante

de PD-1 et de Tim-3 révèle une chute significative de ce phénotype pour les Th1 chez les CBNPC (Figure 8B).



(iii) *Identification d'un modèle prédictif de la survie des CBPNC à partir des données du panel « immunité innée »*

Afin d'identifier un modèle prédictif de la survie des malades à partir des variables générées avec le panel « immunité innée » et des données cliniques, nous avons réalisé une analyse par une approche du CoxBoost (test multivarié). 21 variables biologiques ont pu être testées. L'algorithme a retenu 8 variables biologiques importantes pour la discrimination des deux groupes (Table ci-dessous).

Variables	Coefficient CoxBoost	p-value CoxBoost
Age	0,65	3,70E-03
pDC MFI PD-L1	0,74	1,50E-02
mMDSC MFI PD-L1	0,84	3,30E-02
gMDSC	1,25	8,90E-02
mDC	0,93	9,30E-02
Monocytes PD-L1 ⁺	0,93	0,12
Monocytes MFI HLA-DR	0,95	0,14
Fumeur	0,94	0,32
OMS	1,02	0,56

Coefficient >1 variable associée à une valeur prédictive favorable
 Coefficient <1 variable associée à une valeur prédictive défavorable

Comme en attestent les coefficients du test, un taux élevé en cellules gMDSC (Coefficient : 1,25) est associé à une survie plus faible. Les autres variables biologiques retenues ont toutes une valeur prédictive positive sur la survie. La courbe ROC générée à partir de ce test possède une aire sous la courbe de 0,89. Un seuil sur le modèle a été défini pour obtenir une spécificité de 100% et une sensibilité la plus haute possible, ici 66%, correspondant au point rouge sur la courbe ROC (**Figure 9A**). Nous avons pu ainsi définir deux groupes de patients, l'un de haut risque de progression, l'autre de risque faible. La différence entre ces deux distributions de données de survie est significative avec une *p*-value du test du log-rank de 2^e-08. La médiane de survie sans progression est de 1,8 *versus* 5,5 mois respectivement pour le groupe de haut et de faible risque (**Figure 9B**).

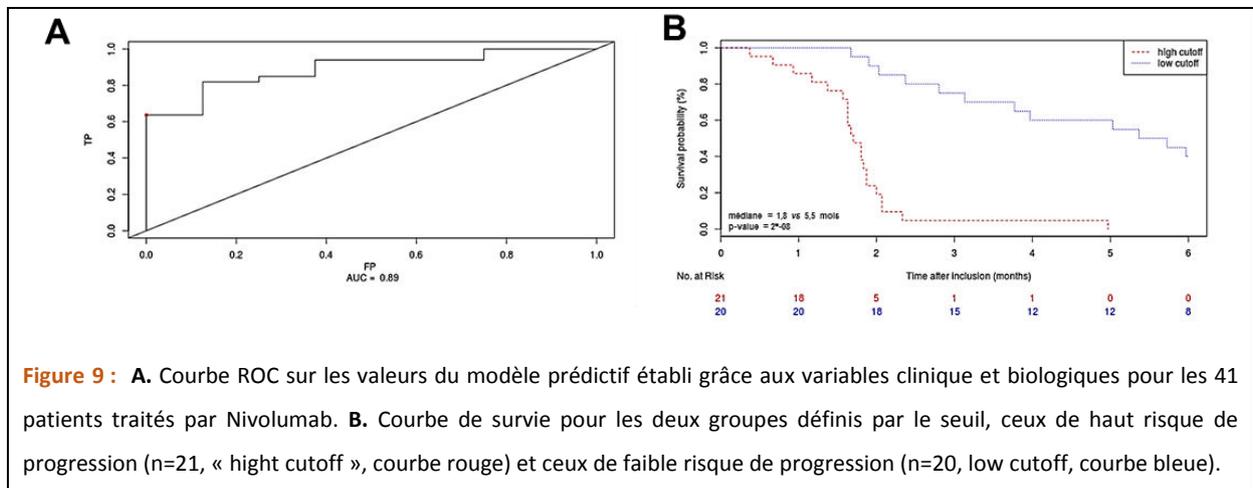


Figure 9 : **A.** Courbe ROC sur les valeurs du modèle prédictif établi grâce aux variables clinique et biologiques pour les 41 patients traités par Nivolumab. **B.** Courbe de survie pour les deux groupes définis par le seuil, ceux de haut risque de progression (n=21, « high cutoff », courbe rouge) et ceux de faible risque de progression (n=20, low cutoff, courbe bleue).

(iv) Populations lymphoïdes et réponse au Nivolumab

Le modèle prédictif généré par le CoxBoost n'a pris en compte que les données issues du panel d'analyse « immunité innée » et des données cliniques. Les données issues des panels « Thelper », « T-CD8 » et « TBNK » n'ont pas été utilisées pour générer le modèle. Elles seront néanmoins incluses dans l'analyse finale de l'ensemble des données d'immunomonitoring.

Une première analyse intermédiaire a néanmoins pu être réalisée. Nous avons choisi de comparé le nombre absolu, la répartition et l'expression des récepteurs inhibiteurs des sous-populations T-CD8⁺, T-CD4⁺ pour les 8 patients ayant une survie supérieure ou égale à 6 mois et pour les 33 ayant une survie inférieure à 6 mois. Nous avons pour l'instant simplement réalisé une comparaison par un test univarié de Mann-Whitney Wilcoxon. Aucune différence n'a pu être mise en évidence. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que la donnée « survie sans progression » est analysée comme une donnée qualitative (< ou > à 6 mois). En effet, des résultats préliminaires obtenus très récemment tentent à montrer qu'il existe une corrélation positive entre la survie sans progression et le taux de cellules T-CD8⁺ et T-CD4⁺. De plus, il semble également que la quantité de cellules myéloïdes PD-L1⁺ en particulier les cellules dendritiques soient associées négativement avec les taux de des cellules T-CD8⁺ et T-CD4⁺. L'analyse de ces résultats va être poursuivie et approfondie.

b) Discussion des résultats

La mise en place d'une étude prospective de CBNPC traité par un anti-PD-1 est un enjeu actuel fort. Le taux de réponse à l'immunothérapie par anti-PD-1 chez les CBNPC de stade avancé reste assez faible et il est indispensable d'identifier des marqueurs de réponse précocement dans la prise en charge du patient et si possible avant la mise sous traitement. Le premier objectif de cette étude est donc d'identifier un profil biologique prédictif d'une réponse ou d'une non réponse. Le second objectif est de pouvoir donner un sens à ce profil pour générer des hypothèses quant aux mécanismes de résistance au Nivolumab. Afin de répondre à ces deux objectifs, il nous a semblé important d'étudier d'abord le profil immunologique de volontaires sains pour le comparer à celui des CBNPC. Cette première étape nous a permis de mettre en évidence des modifications immunologiques liée à la présence du cancer et de rassembler des hypothèses sur les mécanismes immunologiques périphériques qui peuvent favoriser l'échappement tumoral et/ou la non réponse à l'immunothérapie. Le récapitulatif présenté dans la figure 10 précise quels sont les paramètres immunologiques qui diffèrent entre les volontaires sains et les CBNPC.

Concernant les cellules myéloïdes, deux différences majeures doivent être soulignées. Premièrement, nous avons pu observer une augmentation en nombre des cellules présentatrices d'antigènes de type mDC et pDC et une plus forte expression du HLA-DR à la surface des monocytes

circulants chez les CBNPC. Ces trois paramètres témoignent de l'existence d'une réponse immunitaire périphérique qui pourrait être directement liée à la présentation des antigènes tumoraux. Cette observation est particulièrement intéressante et elle est à mettre en relation avec les observations faites par l'équipe du Pr. Rizvi sur la charge mutationnelle des cancers bronchiques. En effet, la quantité et l'état d'activation des cellules présentatrices d'antigènes circulantes pourraient être liés au niveau de mutation et en être un marqueur indirect. Ce paramètre est essentiel puisque cette même équipe a montré que la présence d'une charge mutationnelle importante pouvait être un marqueur de réponse à l'immunothérapie par un anticorps anti-PD-1 dans le cancer bronchique (Rizvi *et al*, 2015). Le problème de notre analyse est qu'elle ne permet pas d'appréhender le type de réponse immunitaire contre les antigènes présentés et il est fort probable qu'au stade IIIB/IV, les cellules mDC, pDC et les monocytes soient associés à une réponse tolérogène. Une étude publiée cette année a d'ailleurs montré que les cellules myéloïdes présentatrice d'antigène du circulantes et ganglionnaires ont un profil tolérogénique chez les patients atteints de CBNPC comparativement aux volontaires sains. Ces cellules perdent l'expression du CD80/86, de l'IL-12 et du TNF α et produisent de l'IL-10 et du TGF- β (Bugalho *et al*, 2016). Deuxièmement, nous avons observé une augmentation de l'expression de PD-L1 chez les CBNPC. Ce paramètre est important dans la suppression de la réponse immunitaire par les cellules myéloïdes. L'analyse de son expression indique que les mDC, les pDC, les monocytes et les gMDSC sont plus nombreuses à exprimer PD-L1 chez les CBNPC. Cette observation pourrait, là encore, être liée à l'existence d'une réponse immunitaire qui est ou était en place. En effet, comme vu en introduction, la réponse immunitaire anti-tumorale passe par la production de cytokines inflammatoires telles que les IFN de type I/II qui peuvent conduire à la surexpression de PD-L1. Nous verrons également par la suite qu'il existe une augmentation des cellules Th17 et de leur activation périphérique. On peut également penser que l'expression de l'IL-17A, l'IL-21 et l'IL22 produite par ces cellules peut avoir un effet stimulant sur l'expression de PD-L1. En modulant l'expression de PD-L1 à la hausse, ce qui force la mise en place d'une tolérance par une perte de la prolifération des cellules T-CD8⁺ et T-CD4⁺ qui expriment PD-1.

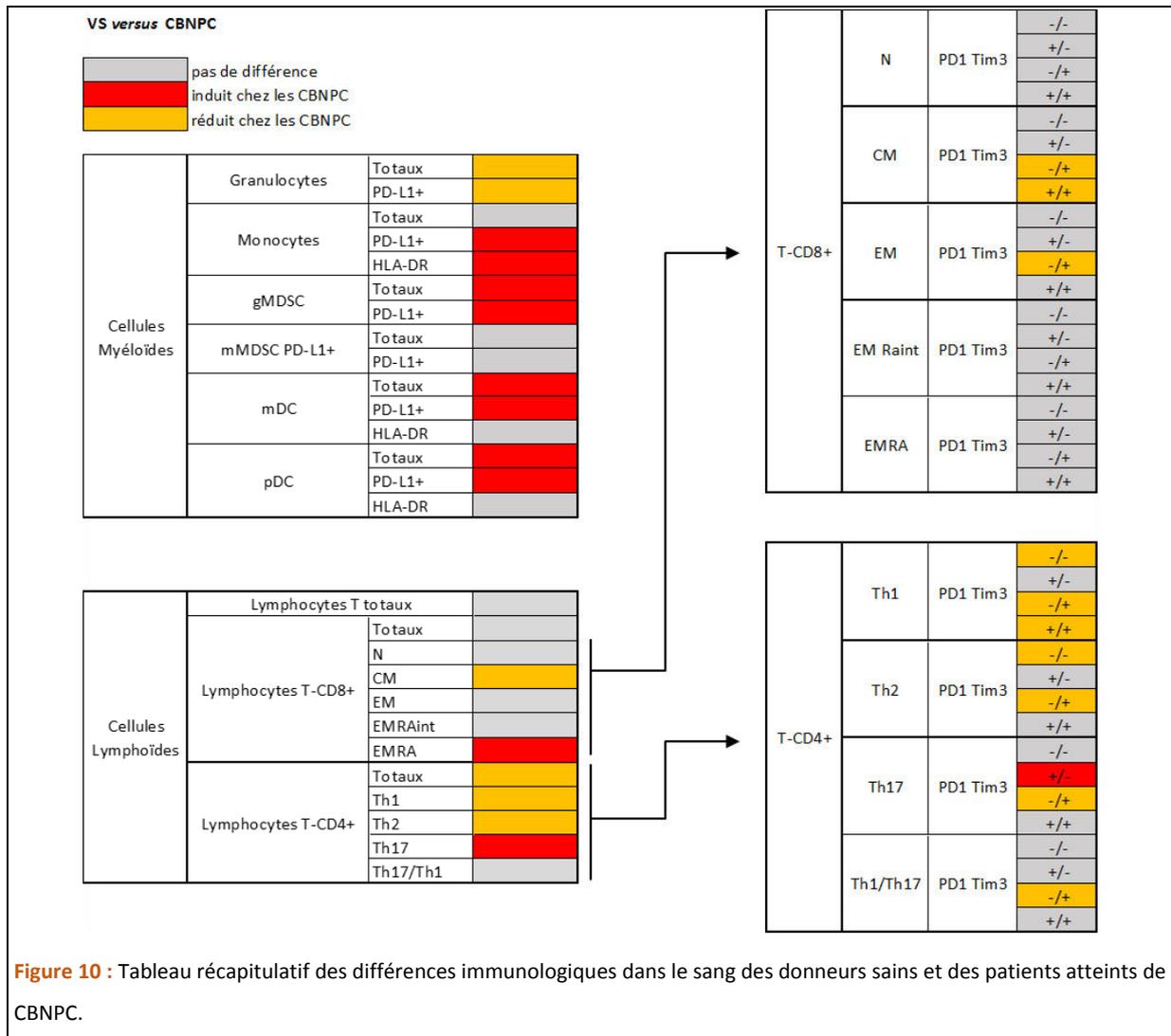
L'analyse du profil lymphoïde montre qu'il existe effectivement des différences importantes entre donneurs sains et CBNPC. Même si d'un point de vue général il n'existe pas de lymphopénie T-CD3⁺ et T-CD8⁺, néanmoins, il existe une tendance importante à une diminution des cellules Thelper. Ce résultat sur la lymphopénie peut paraître contradictoire avec les données de la littérature qui montre une lymphopénie importante en cas de CBNPC de stade avancé. Nos résultats peuvent s'expliquer par un biais de sélection des patients au moment de la mise sous traitement. Comme en témoigne l'ECOG performance, la plus grande majorité des patients présentent un score compris entre 1 et 2 ce qui indique un état général plutôt bon. En ce qui concerne les T-CD8⁺, il n'existe pas

de diminution en nombre des sous-familles (Naïfs, Centrale Mémoire, Effecteur Mémoire RA⁻ et RA^{int} et des EMRA). Néanmoins, il existe une modification de la répartition, avec une proportion plus faible en central mémoire au profit des EMRA chez les CBNPC. Cette première observation pourrait indiquer que la réponse CD8⁺ chez les malades est plus « avancée ». Les cellules centrales mémoires circulent continuellement grâce à l'expression du CCR7 et ont un rôle important dans la communication entre l'immunité innée et adaptative. Par ailleurs, une plus forte proportion en EMRA au niveau périphérique peut témoigner d'une moins bonne capacité des cellules T-CD8⁺ à migrer vers la tumeur pour y exercer leur effet anti-tumoral. Ces paramètres peuvent être déterminant dans l'échappement de la tumeur à la réponse cytotoxique T-CD8⁺. Ces observations sont à mettre en relation avec la numération et la répartition des cellules exprimant PD-1 et Tim-3 dans les différents sous-types. Les différences entre volontaires sains et CBNPC sont principalement liées à une diminution des cellules PD-1⁻/Tim-3⁺ et PD-1⁺/Tim-3⁺. Il est donc très probable que les interactions avec le compartiment myéloïde, qui exprime davantage PD-L1, puisse être à l'origine de cette chute. La perte de ces cellules est un mécanisme certainement important pour l'échappement puisque les cellules T-CD8⁺ qui expriment PD-1 et Tim-3 sont celles qui ont les capacités anti-tumorales les plus fortes.

Les Thelper sont moins nombreux chez les patients porteurs de CBNPC. Cette première différence est importante puisque c'est par leur intermédiaire qu'une réponse T-CD8⁺ efficace peut se mettre en place. C'est d'ailleurs *via* les Th1, qui sont significativement moins nombreux chez les CBNPC que cette réponse s'active grâce à la sécrétion de l'IFN γ . Les cellules Th2 sont elles aussi réduites en nombre. Cette observation peut paraître surprenante puisque la perte de cellules Th1 pourrait favoriser la polarisation des Th2. Néanmoins, si l'on considère les populations Th17 et Th17/Th1, qui en proportion sont plus représentés parmi les CD4 chez les CBNPC, on peut penser que la polarisation Th2 est restreinte par la sécrétion des cytokines de ces sous-types (IL-17, IFN γ , IL-22 et IL-21). Comme pour les T-CD8⁺, la diminution des sous-types Th1 et Th2 est principalement due à une perte des populations exprimant les récepteurs PD-1 et Tim-3. Cette observation suggère une nouvelle fois que l'interaction PD-1/PD-L1 joue un rôle central dans l'immunosuppression induite chez les patients porteurs de CBNPC. Par ailleurs, l'augmentation de la proportion des cellules Th17 chez les malades est probablement à l'origine d'une inflammation au niveau tumoral qui peut être délétère *via* la promotion de l'angiogenèse. L'activation de ces cellules est très certainement supérieure aux autres sous-types lymphocytaires, en témoigne un nombre plus élevé de Th17 PD-1⁺ chez les CBNPC.

Pour conclure sur les différences immunologiques périphériques entre les volontaires sains et les CBNPC nous avons pu établir plusieurs points importants :

- Les cellules dendritiques (mDC et pDC) sont plus nombreuses et les monocytes expriment davantage la molécule HLA-DR chez les CBNPC
- Les cellules dendritiques (mDC et pDC) les mMDSC sont plus nombreuses à exprimer PD-L1 chez les CBNPC
- Les cellules T-CD8⁺ centrales mémoires sont en proportion plus faible et c'est l'inverse pour les EMRA chez les CBNPC
- Les Th1, les Th2 sont en moins grande quantité chez les CBNPC
- Les Th17 sont en proportion plus importante et expriment davantage PD-1 chez les CBNPC
- Les cellules lymphocytaires exprimant PD-1 et Tim3 sont globalement moins nombreuses chez les CBNPC



Les conclusions que nous venons de faire sur le profil immunologique de personnes saines et atteintes de CBNPC, nous permet de mieux comprendre le rôle des variables biologiques identifiées

dans l'analyse du CoxBoost. En effet, il semble logique que les variables associées à une survie sans progression plus longue sous nivolumab soient les populations myéloïdes exprimant le récepteur PD-L1. Premièrement, ces cellules sont une cible indirecte du médicament qui va empêcher la liaison entre PD-1 et son ligand et deuxièmement la présence de ces cellules PD-L1 positives est la preuve qu'il existe une réponse immunitaire sous-jacente, potentiellement activable par le nivolumab. Le taux de cellules mDC, ainsi que le niveau d'expression du HLA-DR à la surface des monocytes sont deux variables qui ressortent dans le modèle. Ces cellules sont effectivement importantes dans la présentation des antigènes tumoraux, le nombre de ces cellules est donc logiquement lié à une stimulation plus forte de la réponse adaptative. Concernant les cellules gMDSC, c'est la seule population myéloïde à être associée à une survie plus faible. L'analyse de PD-L1 à la surface de ces cellules n'indique pas qu'elles sont exemptées de l'expression de ce récepteur, ce qui pourrait suggérer que ces cellules ont des capacités immunosuppressives liées à d'autres récepteurs ou enzymes. On peut d'ailleurs penser à l'expression des enzymes CD39 et CD73 que nous avons retrouvé en quantité importante à la surface des gMDSC des patients porteurs d'un cancer colorectal. Une analyse phénotypique plus approfondie de ces cellules serait intéressante pour identifier le ou les mécanismes par lesquels elles inhibent la réponse immunitaire.

Nous envisageons à présent de valider biologiquement ce modèle par un test biologique. La stratégie que nous allons mettre en place consiste à purifier les cellules T-CD3⁺ d'un malade porteur d'un CBNPC de façon à tester ces combinaisons *in vitro* :

- 1- Anti-CD3/28 + Cellules T +/- anti-PD-1
- 2- Anti-CD3/28 + Cellules T + monocytes/mDC/pDC +/- anti-PD-1
- 3- Anti-CD3/28 + Cellules T + monocytes/mDC/pDC + gMDSC +/- anti-PD-1

Les cellules seront restimulées par un anti-CD3 et un anti-CD28 en présence ou non du Nivolumab. Après 5 jours de stimulation, nous analyserons par un marquage intracellulaire le niveau d'expression du TNF α , de l'IFN γ et du Ki67. Si notre modèle prédictif est exact, l'efficacité du nivolumab sera maximale dans la condition 2 et sera limitée par la présence des gMDSC dans la condition 3. Cette validation biologique est importante et nécessaire pour apporter une preuve supplémentaire de la véracité du modèle. Par ailleurs, ce modèle généré à partir des données cliniques et biologiques du panel myéloïde sera prochainement testé sur une cohorte de validation que nous sommes en train de constituer. A l'heure actuelle, 30 malades ont pu être inclus dans cette cohorte depuis Avril 2016. Si nous confirmons l'implication des gMDSC dans l'inefficacité du Nivolumab, nous envisagerons d'étudier l'impact des chimiothérapies de première lignes utilisées dans le traitement du CBNPC sur la prolifération et l'activité biologique de ces cellules. Nous

espérons ainsi proposer de nouvelles associations d'immunochimiothérapie basées sur un rationnel biologique qui prend en compte le profil immunologique du patient.

DISCUSSION

Notre équipe de recherche s'applique depuis bientôt 10 ans à mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'échappement des cellules tumorales aux agents anticancéreux et plus particulièrement aux chimiothérapies. L'efficacité thérapeutique des chimiothérapies est transitoire et dans la majorité des cas elles ne permettent pas d'obtenir une guérison complète des malades. Fort de ce constat, la recherche en oncologie n'a plus seulement centré son attention sur la cellule cancéreuse elle-même mais sur une compréhension plus globale du microenvironnement tumoral. Au milieu des années 2000, de nombreuses publications ont indiqué que la quantité et la qualité de l'infiltrat immunologique avait un rôle majeur dans la gravité et la progression de la maladie (Galon *et al*, 2006; Pages *et al*, 2005). De plus, les travaux de Laurence Zitvogel et Guido Kroemer ont apporté les preuves d'une interdépendance entre le système immunitaire et l'efficacité thérapeutique des traitements de chimiothérapie (Casares *et al*, 2005). C'est dans ce contexte que notre équipe a eu pour objectif d'appréhender l'impact des chimiothérapies et des immunothérapies sur le microenvironnement immunologique de la tumeur dans le but de proposer de nouveaux marqueurs de réponse et de nouvelles stratégies de traitement.

1. Immunomonitoring des cancer colorectaux traités par FOLFOX-bevacizumab : impact pronostic des MDSC et des Th17

Avant mon arrivée au sein de l'équipe, de nombreux travaux avaient été réalisés sur le rôle des MDSC dans l'échappement tumoral et sur les stratégies d'élimination de ces cellules. L'accumulation des cellules MDSC au sein de la tumeur et des organes lymphoïdes secondaires (sang, rate, ganglions) est un paramètre important dans la suppression de la réponse immunitaire anti-tumorale. L'augmentation en nombre de ces cellules est associée dans de nombreux cancers au stade de la maladie et à un échec des thérapies anticancéreuses (Zhang *et al*, 2013). Notre équipe a pu montrer chez la souris que l'accumulation et la fonctionnalité de ces cellules étaient liées à la composition du microenvironnement tumoral dans plusieurs types de cancers chez la souris (EL4, CT26, 4T1). D'une part, les facteurs solubles tels que la PGE2 ou le GM-CSF favorise la prolifération et l'arrêt de maturation des cellules myéloïdes et d'autre part les exosomes tumoraux accentuent leurs fonctions immunosuppressives. La caractérisation moléculaire de ces vésicules extracellulaires a montré qu'elles portaient à leur surface la protéine HSP72, capable de se fixer au récepteur TLR2 présent au niveau des cellules MDSC. En interagissant, ces deux protéines permettent l'activation de la voie Myd88 qui conduit à la production d'IL-6 et à l'activation autocrine de STAT3. Ce facteur de transcription est important et essentiel pour les fonctions immunosuppressives des MDSC. En identifiant ce mécanisme d'immunosuppression, le choix a été fait de tester des agents

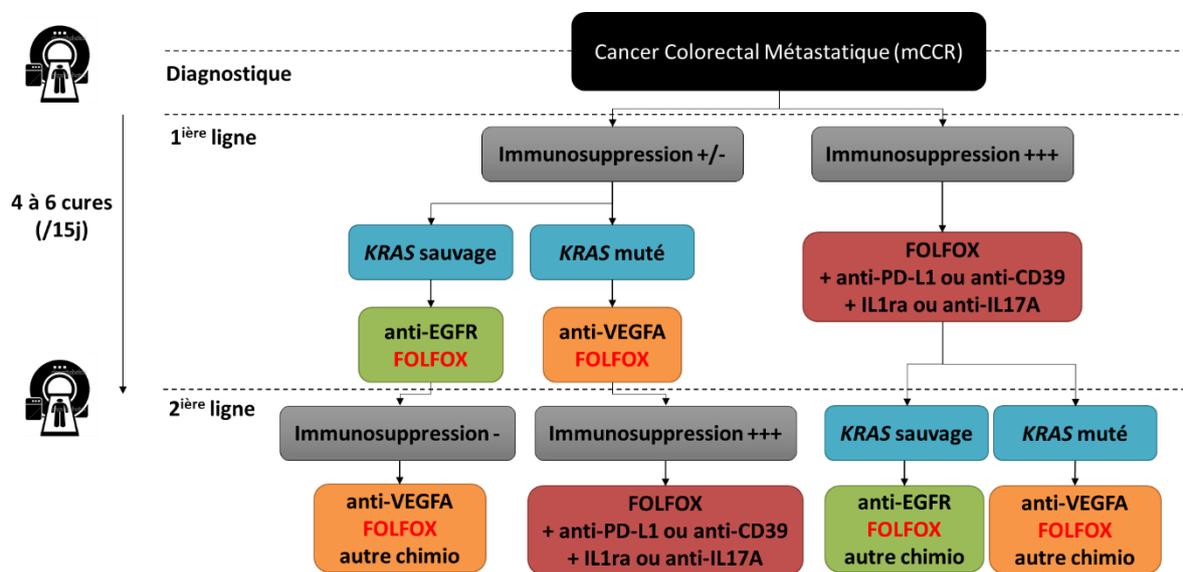
thérapeutiques tels que le dimethyl-amiloride (DMA) dans le but d'inhiber la sécrétion des exosomes et donc d'empêcher l'activation des MDSC. Chez la souris, l'administration de DMA permet de prolonger et d'amplifier l'effet d'une vaccination antitumorale. Chez l'homme, la prise de DMA chez des patients porteurs de cancer est associée à une plus faible activation de STAT3 au sein des MDSC et permet de restaurer l'activation des cellules T-CD3⁺ *in vitro* après activation du TCR (Chalmin *et al*, 2010). A l'issue de cette première publication, une batterie de chimiothérapie a été testée chez la souris dans le but d'identifier des drogues capables d'éliminer les MDSC dans la rate et la tumeur. C'est de cette manière que le 5-FU et la Gemcitabine, deux antimétabolites très couramment utilisés dans le traitement des cancers colorectaux, mammaires ou bronchiques, ont été identifiés comme pouvant réduire le nombre de cellules MDSC chez la souris. C'est grâce à une faible expression de la thymidylate synthase, une enzyme impliquée dans la résistance au 5-FU, que les MDSC possèdent une sensibilité importante au 5-FU. L'effet cytotoxique du 5-FU et de la Gemcitabine sur les MDSC permet de restaurer la sécrétion d'IFN γ par les cellules T-CD8⁺, élément indispensable pour induire un ralentissement de la croissance tumorale (Vincent *et al*, 2010). Néanmoins, les choses ne sont pas si simples en immunologie. L'effet thérapeutique du 5-FU reste néanmoins transitoire et la grande majorité des souris progresse de nouveau après traitement. Cet échappement est directement lié à la mort des MDSC. En effet, le 5-FU provoque une mort cellulaire atypique, la pyroptose, qui se caractérise notamment par l'activation de la caspase 1 *via* l'inflammasome NLRP3. L'activation de cette caspase est responsable de la maturation de l'IL-1 β par clivage de la pro-IL-1 β . Cette cytokine très fortement inflammatoire provoque une amplification de la maturation des T-CD4⁺ en Th17, un sous-type Thelper hautement pro-angiogénique qui est à l'origine de l'échappement de la tumeur. En inhibant la signalisation induite par l'IL-1 β ou en bloquant l'IL-17A à l'aide d'anticorps neutralisant (IL1ra, anti-IL-17A), l'effet thérapeutique du 5-FU peut être prolongé et induire des régressions tumorales prolongées chez la souris. Ces observations ont pu être confirmées chez l'homme. Après l'administration du 5-FU chez les patients porteurs de cancers coliques, les MDSC circulantes ont une caspase-1 active et une capacité à produire de l'IL-1 β plus importante. Après la première cure, le niveau sérique d'IL-17A est significativement plus important (Bruchard *et al*, 2013). A partir de ces données expérimentales chez la souris et la preuve de concept chez l'homme un essai multicentrique de phase II a pu être mis en place afin d'évaluer l'association 5-FU/Bevacizumab/Anakinra (IL1ra) chez les patients porteurs de cancers coliques métastatiques. A ce jour, 20 patients ont pu bénéficier de cette association. Les résultats préliminaires sont encourageants, puisque parmi les 20 patients, 16 (70%) ont présenté une survie sans progression (PFS) supérieure à 6 mois et 4 d'entre eux ont eu une réponse partielle prolongée.

C'est en parallèle de cet essai clinique que nous avons entrepris de monitorer le profil périphérique des patients porteurs d'un cancer colorectal métastatique (mCCR) pour lesquels une première ligne de traitement par FOLFOX-bevacizumab (5-FU/oxaliplatine/bevacizumab) est indiquée. L'impact de cette chimiothérapie sur la réponse immunitaire anti-tumorale périphérique n'a jamais été décrite. De plus, le lien entre les modifications induites par la chimiothérapie sur ce profil et la réponse thérapeutique n'a jamais été appréhendé. Cette question était d'autant plus intéressante que l'association FOLFOX-bevacizumab peut avoir un impact immunologique à différents niveaux. L'oxaliplatine est une drogue immunogène qui permet de réveiller le système immunitaire contre les antigènes tumoraux (Tesniere *et al*, 2010). Le 5-FU est une drogue capable de limiter l'immunosuppression en tuant les MDSC (Vincent *et al*, 2010). Enfin, le bevacizumab freine la prolifération des lymphocytes T régulateurs et l'expression des récepteurs inhibiteurs à la surface des cellules effectrices (Noman *et al*, 2014; Voron *et al*, 2015). La première étape de notre travail a été de comparer le profil périphérique des volontaires sains (VS) aux mCCR. Nous avons pu confirmer qu'il existe une accumulation périphérique des MDSC chez les mCCR comparativement aux VS. Cette accumulation s'accompagne d'une diminution des Th1 et d'une augmentation des cellules de type Th17 et T_{Reg}. L'accumulation périphérique des MDSC et des Th17 est probablement le résultat d'un dialogue entre ces deux populations. Ce dialogue pourrait impliquer l'IL-17A qui favorise la prolifération et l'activation des MDSC. L'accumulation de ces deux sous-types cellulaires est associée à une perte de la fonctionnalité des cellules CD8 cytotoxiques et à une augmentation de la croissance tumorale (He *et al*, 2010). Concernant les mCCR, le taux initial en Th17 et en T_{Reg} n'est pas associé à la survie sans progression, ce qui n'est pas le cas des MDSC de type granulocytaire. Ce résultat devra être confirmé sur une plus large cohorte de manière à valider qu'il s'agisse bien d'un facteur pronostique indépendant. Si le taux en cellules gMDSC semble associé au pronostic des patients, ce n'est pas le cas du sous-type monocytaire pourtant présent en plus grand nombre dans le sang. L'explication pourrait se trouver au niveau des caractéristiques phénotypique et fonctionnelle des gMDSC. Le phénotype de ces cellules ne fait pas parti d'un consensus comme pour les mMDSC (Lin⁻, CD14⁺, CD33⁺, HLA-DR^{low/-}). Lors de notre analyse, nous sommes rendus compte que les cellules que nous appelons gMDSC (Lin⁻, CD15⁺, CD33^{low}, HLA-DR⁻) exprimaient également le CD14 un marqueur typiquement monocytaire. Elles présentent pourtant bien des caractéristiques morphologiques de cellules granuleuses après coloration par le May-Grunwald-Giemsa et sont hautes en taille/structure en cytométrie de flux. Cette première observation laisse à penser que ces cellules pourraient être le reflet indirect d'une perturbation et d'un blocage plus profond de la myélopoïèse. Elles pourraient également être le fruit de tumeurs ayant un niveau de sécrétion en facteurs solubles « myélo-modulateurs » plus élevé. La caractérisation phénotypique de ces cellules

ne suffit pas pour dire qu'elles peuvent être appelées gMDSC. Nous avons donc entrepris de tester leur capacité d'immunosuppression *in vitro* et nous les avons comparés à leurs pendant mature, les granulocytes qui n'expriment pas le CD33 et le CD14. Nous avons pu mettre en évidence que les cellules Lin⁻, CD15⁺, CD33^{low}, HLA-DR⁻, CD14⁺ avaient des propriétés immunosuppressives et donc que nous pouvions les considérer comme des gMDSC, ce qui n'était pas le cas des cellules Lin⁻, CD15⁺, CD33⁻, HLA-DR⁻, CD14⁻ que nous avons considéré comme des granulocytes matures. La seconde observation permettant d'expliquer le rôle pronostic des gMDSC est qu'elles ont des capacités d'immunosuppression supérieures aux cellules mMDSC. Ce phénomène est très probablement lié à une expression plus importante de PD-L1 et des ectonucléotidases CD39/73 par les gMDSC comparativement au mMDSC. De plus, nous avons constaté qu'il existe une élévation de l'expression de ces protéines chez les mCCR comparativement au VS, ce qui suggère une augmentation des capacités d'immunosuppression de ces cellules dans un contexte tumoral. C'est donc logiquement que l'ajout d'anticorps anti-PD-1 ou anti-CD39 permet de restaurer la production de TNF α et la prolifération des lymphocytes T *in vitro* lorsqu'ils sont en présence de gMDSC. L'ensemble de ces observations permet de comprendre biologiquement pourquoi le taux initial en gMDSC et son évolution sous traitement puisse être associé à la survie sans progression des malades. Nous n'avons pas les moyens de savoir si c'est bien le 5-FU qui est à l'origine d'une chute du taux en MDSC après la première cure de chimiothérapie. Néanmoins, comme chez la souris, la première cure de chimiothérapie provoque chez certains patients une élévation du taux en cellules Th17. Cette augmentation est associée à une PFS significativement plus courte. On peut donc imaginer que la mort des MDSC induite par la chimiothérapie et par le 5-FU en particulier puisse être à l'origine d'une expansion des Th17 *via* l'IL-1 β . L'analyse de l'expression de l'IFN γ et de l'IL-17A montre que le sous-type Th17 est exempt de sécrétion d'IFN γ , ce qui n'est pas le cas du sous-type Th17/Th1 qui lui, est davantage associé à une réponse de type 1 avec une co-expression de l'IL-17A et de l'IFN γ . Cette population n'augmente pas après la première cure de chimiothérapie ce qui laisse à penser que ce sous-type est moins sensible que les Th17 à l'IL-1 β .

L'ensemble de ces résultats ouvre des perspectives intéressantes pour la prise en charge des cancers colorectaux. Le nombre limité de patients inclus dans notre étude nous oblige à rester prudent et à confirmer ces résultats sur une cohorte prospective de validation plus importante de validation. Nos résultats sont néanmoins la preuve qu'il existe un intérêt à mettre en place de manière plus systématique l'étude du profil immunologique sanguin pour les patients porteurs de cancer colorectaux avant et pendant la chimiothérapie. Cette analyse pourrait à terme permettre l'identification des malades ayant un risque plus important de chimiorésistance et de récurrence du fait d'un taux élevé en cellules MDSC ou Th17. Une meilleure compréhension de la cinétique d'apparition

de ces différents évènements aidera à la mise en place de stratégie thérapeutique plus logique d'un point de vue biologique. Certaines questions pourraient se poser : Serait-il plus avantageux d'inhiber d'abord l'immunosuppression et d'induire une immunogénicité (5-FU + Oxaliplatine + anti-PD-L1/CD39/IL1ra) afin de garder les agents ciblant l'EGFR et le VEGF-A en deuxième intention ? Ne pouvons-nous pas imaginer en effet que ces traitements puissent être plus efficaces si l'immunosuppression est rapidement bloquée et si l'immunogénicité de la tumeur est restaurée précocement ? Ne faudrait-il pas prendre en compte en premier lieu le profil immunologique plutôt que le profil génétique (*KRAS*, *BRAF*). Cette question est d'autant plus intéressante que l'activité thérapeutique des anti-EGFR (cetuximab) peut passer par la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) (Kimura *et al*, 2007). Or, pour être efficace, cette stratégie ne doit pas être mise en place dans un contexte d'immunosuppression puisque les mécanismes d'ADCC sont sensibles et peuvent être inhibés par les MDSC (Sarhan *et al*, 2016). Repenser le modèle thérapeutique des cancers colorectaux pourrait donc être envisager grâce également à la caractérisation phénotypique des cellules immunosuppressive. Cette caractérisation permettrait d'envisager de nouvelles associations d'immunochimiothérapie. Notre caractérisation phénotypique des gMDSC et des mMDSC nous a permis d'identifier PD-L1, CD39 et CD73 comme des cibles thérapeutiques complémentaires à la chimiothérapie. Le modèle proposé pourrait donc être le suivant :



Nous pourrions prochainement tester de telles associations lors d'un essai thérapeutique multicentrique de phase II associant le FOLFOX à deux immunothérapies : un anticorps anti-CTLA4 (Tremelimumab, AstraZeneca) et un anti-PD-L1 (Durvalumab, AstraZeneca). Ce traitement sera donné en première intention pour les patients diagnostiqués pour un cancer colorectal métastatique au niveau hépatique et/ou pulmonaire. Un immunomonitoring approfondi, permettant la caractérisation et la numération d'un grand nombre de populations leucocytaires (sous population T-

CD8⁺ et T-CD4⁺, T_{Reg}, NK, mDC, pDC, MDSC, Monocytes, Granulocytes) et de récepteurs inhibiteurs ou activateurs (CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, Tim-3, Lag3, ICOS, HLA-DR, NKG2s) sera réalisé avant et pendant le traitement. Les patients bénéficieront également d'une analyse génétique somatique et constitutionnelle (séquençage haut débit), ainsi que d'une cartographie complète du profil d'expression génique tumorale (RNA sequencing). L'analyse quantitative et qualitative de l'infiltrat immunologique est également prévue (CD45RO, CD4, CD8, Foxp3, CD68, PD-L1, PD-1, ect). Ces analyses seront réalisées avant et pendant le traitement d'immunochimiothérapie. Concernant l'immunomonitoring, les marquages seront réalisés de manière standardisée. Les anticorps de marquages seront lyophilisés et le marquage sera réalisé par un automate dédié à cette analyse. Les prélèvements seront analysés sur un cytomètre en flux validé pour les analyses cliniques. L'étude des données de cytométrie en flux se fera de manière non supervisée à l'aide du logiciel Infinicyt (Cytognos). Cette analyse nous permettra d'établir des profils de type « réponse » ou « non réponse » et *via* le module d'orientation, d'apporter une aide à la décision thérapeutique. La mise en place de ces procédures standardisées sera un outil complémentaire à la biologie moléculaire. Nous espérons qu'elles offriront une aide précieuse à la caractérisation du profil immunologique des patients et qu'elles permettront d'améliorer la prise en charge des cancers du côlon.

2. L'acétylation de STAT3 : une cible prometteuse pour limiter les effets biologiques des Th17

Ce second projet de recherche s'inscrit dans la continuité de l'immunomonitoring réalisé chez les patients porteurs de cancers coliques traités par FOLFOX-bevacizumab. Comme nous venons de le voir précédemment, l'évolution du taux des cellules Th17 entre la première et la deuxième cure de chimiothérapie est un élément pronostique de la réponse thérapeutique. De plus, les travaux de l'équipe menés chez la souris et chez l'homme sur cette population lymphocytaire indiquent clairement qu'elle est une cible thérapeutique de choix. Premièrement, la polarisation de ces cellules par l'intermédiaire de l'IL-6 et du TGF- β leur confère des capacités immunosuppressives insoupçonnées *via* l'expression des ectonucléotidases CD39 et CD73. Ces enzymes dégradent l'ATP et l'AMP extracellulaires en adénosine. Cette dégradation limite l'action de l'ATP sur la maturation des cellules dendritiques et bloque la réponse immunitaire par l'intermédiaire de l'adénosine, une molécule hautement immunosuppressive (Chalmin *et al*, 2012). L'étude des cellules Th17 chez l'homme montre que l'accumulation de ces cellules dans le tissu tumoral mammaire est associée à un mauvais pronostic et qu'il contrecarre le bénéfice d'une infiltration importante en CD8. L'expression intra-tumorale de CCL20, ligand du récepteur CCR6 porté par les Th17 favorise leur migration depuis la circulation et les organes lymphoïdes. Une fois dans la tumeur, c'est la présence

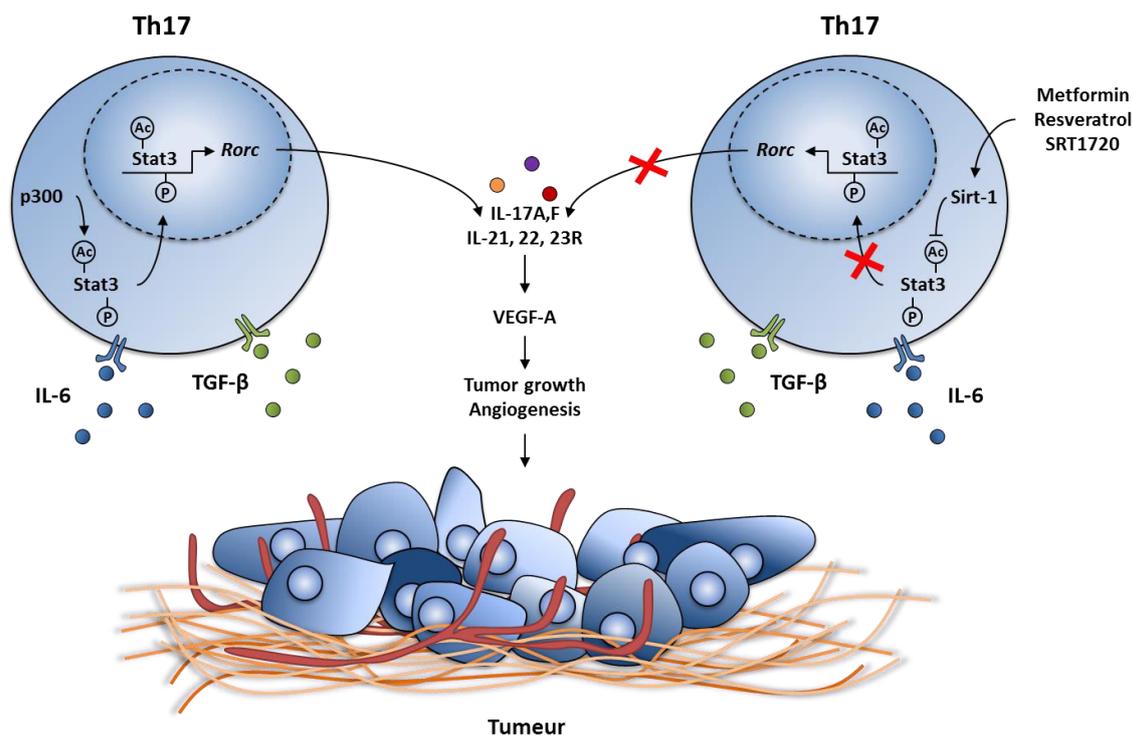
de l'IL-6 et du TGF- β qui est responsable de modifications phénotypique et fonctionnelle notamment en induisant l'expression du facteur Foxp3. Ce dernier permet l'expression de CD39 et CD73 qui pourront transformer l'ATP en adénosine et supprimer la réponse Th1 et CD8 en inhibant la production du TNF α et de l'IFN γ (Thibaudin *et al*, 2016). Deuxièmement, c'est aussi l'action pro-inflammatoire des cellules Th17 qui est un élément déterminant dans l'échappement tumoral. Les lymphocytes Th17 sont caractérisés par la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que l'IL-21, l'IL-22, l'IL-17A/F qui peuvent avoir un rôle ambivalent sur la progression tumorale. L'inflammation induite par ces cytokines peut être bénéfique à l'hôte et favoriser la régression tumorale en stimulant une réponse immunitaire adaptative *via* la différenciation des lymphocytes T-CD8⁺ et T-CD4⁺ en cellules cytotoxiques de type 1. A l'opposé, les signaux biologiques induit par ces cytokines, en particulier ceux de l'IL-17A, accentue l'angiogenèse par la stimulation de l'expression de l'IL-8 et de MMP9 (Inozume *et al*, 2009; Maniati & Hagemann, 2013). Par ailleurs, en activant la voie STAT3, l'IL-17A favorise la résistance des cellules tumorale à l'apoptose par surexpression de Bcl-2 et Bcl-xL (Wang *et al*, 2009). Ces données sur l'angiogenèse ont été confirmés dans notre laboratoire. En effet, l'administration de 5-FU à des souris sauvages ou *il17a*^{-/-} n'induit pas le même niveau d'expression des gènes pro-angiogéniques *pecam1* (PECAM1) et *eng* (Endogline). Au moment de la reprise tumorale, les tumeurs des souris sauvages sont bien plus angiogéniques que celles des souris *il17a*^{-/-}, ce qui indique une fonction angiogénique claire de l'IL-17A.

C'est dans ce contexte biologique que notre équipe a entrepris de tester différents agents pharmacologiques ayant la capacité d'inhiber la différenciation ou les fonctions biologiques des Th17. C'est ainsi qu'il a pu être mis en évidence un rôle anti-inflammatoire et anti-tumoral d'un acide gras polyinsaturé, l'acide docosahexaénoïque (DHA). Ce lipide active le facteur de transcription PPAR γ qui induit en retour l'expression génique de *SOCS3*. *SOCS3* agit comme un répresseur intrinsèque de la différenciation Th17 en interférant avec la signalisation de la voie IL-6/STAT3, ce qui aboutit à une diminution de l'expression de *rorc* et à une plus faible expression de l'IL-17A (Berger *et al*, 2013). STAT3 fait partie des facteurs de transcription qui initie le programme de différenciation des Th17. Sa présence est indispensable à l'expression génique de *rorc*. *Rorc* code pour la protéine ROR γ t qui agit à son tour comme un facteur de transcription pour induire les gènes de l'*il17a/f*, de l'*il21*, de l'*il22* et l'*il23r* et réprimer les gènes impliqués dans la polarisation des autres sous-types Thelper. Cibler les voies de signalisation menant à l'activation de STAT3 est donc une stratégie particulièrement intéressante qui a déjà montré une certaine efficacité thérapeutique dans différentes pathologies auto-immunes, inflammatoires et cancéreuses (Caetano *et al*, 2016; Gavino *et al*, 2016). L'activation de STAT3 nécessite deux modifications post-traductionnelles distinctes : la phosphorylation et l'acétylation. La phosphorylation de STAT3 fait intervenir l'activation des PKC et

de JAK2 suite à la fixation de l'IL-6, de l'IL23, de l'IL-21 ou de l'IL-22 sur leurs récepteurs. Les PKC conduisent à la phosphorylation de STAT3 au niveau de la sérine 727 et JAK2 induit celle de la tyrosine 705. Concernant l'acétylation, c'est la protéine CBP/p300 dotée d'une activité histone acétyltransférase (HAT) qui permet le transfert des groupements acétyl sur les lysines 679, 685, 707 et 709. Ces modifications sont importantes pour la dimérisation, la translocation nucléaire et la fixation de STAT3 au niveau des promoteurs des gènes cibles. Les voies de signalisation permettant un rétrocontrôle négatif de la phosphorylation de STAT3 impliquent les phosphatases SOCS3 et PTP1B. Ces deux enzymes agissent très en amont de la signalisation en inhibant la phosphorylation de JAK2 notamment. Pour ce qui est de l'acétylation, c'est l'histone désacétylase SIRT1 qui est décrite comme pouvant interagir avec STAT3 (Nie *et al*, 2009). Cette interaction a été décrite dans de nombreux types cellulaires tels que les kératinocytes, les hépatocytes ou encore les cellules musculaires (Nie *et al*, 2009; Schenk *et al*, 2011). A ce jour, aucune publication n'a exploré l'impact biologique de la perturbation de cette interaction sur la biologie des cellules T-CD4 et en particulier des cellules Th17. C'est dans ce contexte que nous avons donc émis l'hypothèse que l'activation pharmacologique de SIRT1 pourrait avoir un effet inhibiteur sur la polarisation des Th17 *via* la désacétylation de STAT3. Nous avons testé trois activateurs différents, le resvératrol, le SRT1720 et la metformine. Ces trois molécules ont montré une capacité à inhiber spécifiquement la polarisation des Th17 *in vitro* à la fois chez la souris et chez l'homme (diminution de la sécrétion de l'IL-17A, diminution de l'expression de ROR γ t). Nous avons pu montrer que cet effet biologique est dépendant de SIRT1 en utilisant un inhibiteur spécifique, l'EX527, ou en traitant des T-CD4 issus de souris fl-CD4/SIRT1-Cre. Nous avons ensuite cherché à expliquer le lien entre l'activation de SIRT1 et la diminution de ROR γ t et de l'IL-17A. Pour cela, nous avons réalisé une analyse en cinétique de l'expression génique d'un ensemble de facteurs de transcriptions (*rorc*, *roa*, *irf4*, *cmaf*, *foxp3*, *batf*) et de cytokines (*il6*, *il23r*, *il21*, *il22*, *il17f*, *il17a*) afin d'identifier lequel ou lesquels d'entre eux pouvaient être impactés et à quel moment de la différenciation. Nous nous sommes rendus compte que l'expression de deux gènes était rapidement diminuée, celle de *rorc* et de *il6*. Ces deux gènes ont un point commun. Ils sont tous deux induit par STAT3 dans les premières heures de différenciation. Le lien était donc trouvé : en désacétylant STAT3, SIRT1 favorise bien l'inhibition du programme de différenciation en perturbant l'expression génique de *rorc*. Nous avons confirmé cela en analysant par western blot le niveau d'acétylation de STAT3 après traitement par les différents agonistes en présence ou en absence de l'EX527 ou en travaillant dans les T-CD4 de souris fl-CD4/SIRT1-Cre. Grâce à la technique de « proximity ligation assay » permettant l'analyse des interactions protéiques, nous avons pu constater que la désacétylation de STAT3 est liée à une dérégulation de la balance existant entre CBP/p300 et SIRT1 pour l'interactions avec STAT3. Nous avons constaté par imagerie que

STAT3 est présent dans le noyau avec CBP/p300 dans des cellules Th17 mais qu'en présence d'agonistes de SIRT1, il devient cytoplasmique et interagit avec SIRT1. Cela se traduit par une absence de STAT3 au niveau du promoteur de *rorc* et donc logiquement à une diminution drastique de son expression génique. Nous avons pu valider *in vivo* ce mécanisme en montrant d'une part que les agonistes ont une activité anti-tumorale *via* la diminution des Th17 intratumoraux et que cette diminution est directement liée à la présence de SIRT1. L'activation de SIRT1 *in vivo* provoque une diminution du niveau d'acétylation de STAT3 au sein des lymphocytes T-CD4, ce qui limite leur capacité à produire de l'IL-17A. Cette chute de l'IL-17A se traduit par un taux plus faible de VEGF-A dans la tumeur et donc à une vascularisation moins importante.

Une question se posait néanmoins quant au rôle central de STAT3 dans notre modèle. En effet, STAT3 n'est pas l'unique cible de SIRT1. Il existe un grand nombre de protéines qui peuvent être désacétylées par SIRT1 et qui jouent un rôle dans la réponse inflammatoire. C'est le cas notamment de NFκB (sous unité p65) qui peut être inhibé suite à la désacétylation de la lysine 310. L'effet sur les lymphocytes Th17 pourrait donc être lié aussi à une inhibition de ce facteur. Pour répondre à la question, nous avons analysé de manière simultanée l'acétylation de p65 et de STAT3 au sein d'un Th17 et d'un Th1 après traitement par les agonistes de SIRT1. Nous avons pu constater dans les deux cas une chute du niveau d'acétylation de p65 et de STAT3. L'expression de *Tbx21* ou de l'IFNγ n'est pour autant pas impactée dans les cellules Th1, ce qui semble indiquer que la désacétylation de p65 n'a pas un impact majeur dans notre modèle. De plus, nous avons analysé la sécrétion d'IL-17A par les Th17 lorsque ceux-ci sont traités par metformine en présence ou en absence d'un inhibiteur pharmacologique visant des cibles de SIRT1 (p65, PPARγ, RORγt ou encore STAT3). Nous avons constaté que l'effet de ces inhibitions sont additives pour p65, PPARγ ou encore RORγt mais que ce n'est pas le cas pour STAT3. Ces données indiquent donc que l'effet biologique d'une activation de SIRT1 passe essentiellement par STAT3 dans un lymphocyte Th17.



Le point intéressant de notre analyse est la validation de ce concept chez l'homme. Nous avons effectivement pu montrer que les Th17 humains induits en différenciation *in vitro* sont aussi inhibés par l'activation de SIRT1. De plus, nous avons montré que la restimulation de cellules Th17 mémoires en présence de ces activateurs avait aussi un effet sur les fonctions biologiques de ces cellules. Ces données issues d'analyses *ex vivo* sur de prélèvements sanguins de donneurs sains, nous ont poussé à explorer l'effet sur les Th17 d'une prise de metformine (500 mg/jour) chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique. Les patients ont été inclus de manière prospective (n=10). Nous avons obtenu du sang avant la prise de metformine et deux à trois semaines après. Les données que nous avons générées indique qu'il n'y a pas de variation du nombre absolu de cellules Th17, Th1, Th2 ou T_{Reg}. Cette information est importante car elle nous permet de valider le fait qu'une prise quotidienne de 500mg de metformine n'a pas un effet immunosuppresseur. Cet effet aurait pu se traduire par une chute drastique des Th1 et par une élévation du taux de cellules T_{Reg}, qui sont sensibles aux modulateurs de la voie AKT/mTOR comme peut l'être la metformine à haute dose. Néanmoins, nous avons pu constater une baisse du niveau d'acétylation de STAT3 au sein des Th17 ce qui laisse à penser que SIRT1 a pu être activée. Cette observation est liée avec la diminution du taux de cellules IL-17A⁺ parmi les cellules CD4⁺ RORγt⁺ qui indique une perte de la fonctionnalité biologique des Th17 chez ces patients. Cette donnée est particulièrement intéressante d'autant que la capacité des cellules CD4⁺ Tbet⁺ à produire de l'IFNγ n'est quant à elle pas affectée. Ces données obtenues chez l'homme dans un contexte de cancer du côlon valide notre modèle sur l'impact de l'activation de SIRT1 dans la polarisation des Th17. La metformine n'est pas une molécule

anticancéreuse à proprement parlé. Elle a néanmoins montré une capacité à retarder les phénomènes de cancérogenèse digestive chez les patients diabétiques. Nos données peuvent suggérer que ces effets préventifs passent par l'inhibition des Th17 qui sont associés aux processus de cancérogenèse. D'autre part, on pourrait imaginer d'associer la metformine aux agents anticancéreux utilisés pour le traitement du cancer colique et qui ont un effet délétère par la stimulation des Th17, comme le 5-FU par exemple. La metformine et les activateurs de SIRT1 en général se positionne donc plutôt comme un adjuvant thérapeutique qui permettrait de limiter l'effet pro-tumoral des Th17.

3. Immunomonitoring des cancers bronchiques non à petites cellules traités par Nivolumab :

Le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) est une pathologie grave qui est dans la grande majorité des cas diagnostiqué à un stade assez avancé de la maladie. Des progrès thérapeutiques ont néanmoins pu être réalisés ces dernières années grâce à l'utilisation des thérapies ciblées anti-EGFR, anti-VEGF, aux inhibiteurs d'EML4-ALK, C-MET ou encore ROS1. Ces progrès sont néanmoins limités et le pronostic des patients reste extrêmement sombre avec une chance de survie à 1 an pour les stade IIIB et IV comprise entre 10 et 30 %. Les résultats extraordinaires obtenus dans le traitement du mélanome métastatique grâce à l'immunothérapie par anti-CTLA4 ou anti-PD-1 à accélérer le processus de développement de ces médicaments, en particulier les anti-PD-1, pour la prise en charge des CBNPC. Fin 2015, le Nivolumab (BMS) obtient son AMM dans le traitement du cancer bronchique après échec des deux premières lignes de traitement. Les résultats de deux essais cliniques majeurs que nous avons évoqué en introduction montrent très bien que l'efficacité du Nivolumab est supérieure à celle de la chimiothérapie standard. L'analyse des réponses thérapeutiques montre néanmoins que l'efficacité du Nivolumab est restreinte à un nombre limité de patient. Environ 20% des patients traités présenteront une réponse partielle durable et 20% auront une stabilisation de la maladie. Ces résultats peuvent sembler faibles, mais au regard de l'efficacité des chimiothérapies conventionnelles, qui induisent un taux de réponse brève pour environ 10% des patients, le Nivolumab apparait comme une très bonne alternative thérapeutique au CBNPC (Borghaei *et al*, 2015; Brahmer *et al*, 2015). L'objectif actuel est donc double. Premièrement, il est indispensable d'identifier des marqueurs prédictifs de réponse ou de non-réponse au Nivolumab. Ce premier objectif est essentiel puisqu'un marqueur de réponse

permettra de rentabiliser la prise en charge d'un point de vue économique et de traiter les patients qui pourront tirer un bénéfice thérapeutique réel du nivolumab. Le second objectif a une visée plus fondamentale. En effet, la mise en place d'un modèle prédictif basé sur des profils d'expression génique, histologique ou immunologique permettra de mieux comprendre les mécanismes de résistance au nivolumab et plus généralement aux anti-PD-1. C'est dans ce contexte que nous avons entrepris une exploration clinique et biologique exhaustive d'une cohorte prospective de CBNPC traités par nivolumab en troisième ligne. Cette cohorte est mise en place au sein du centre anticancéreux G.F Leclerc (Dijon) et Léon Bérard (Lyon) depuis Avril 2015. A l'heure actuelle 61 patients dijonnais et 22 patients lyonnais ont pu être inclus dans cette étude. Nous avons également inclus une dizaine de volontaires sains de manière à comparer le profil immunologique dans un contexte de cancer ou pas.

Les résultats préliminaires que nous avons obtenus indiquent qu'il existe probablement chez les patients porteurs de CBNPC une réponse immunologique anti-tumorale qui est probablement inhibée. Pourquoi une telle affirmation ? La comparaison que nous avons réalisée entre les volontaires sains et les patients atteints de cancer colique métastatique indique clairement qu'il existe une augmentation des cellules myéloïdes immunosuppressives en périphérie. Cette augmentation est liée à la perte d'expression du HLA-DR à la surface des monocytes et des granulocytes qui sont alors considérés comme des cellules immatures de type MDSC. Cette observation n'a pas été faite chez les CBNPC qui ont un taux de cellules MDSC équivalent aux donneurs sains. De plus, la quantité absolue de cellules dendritiques de type mDC ou pDC est plus importante chez les CBNPC. Or, le premier critère d'identification des cellules dendritiques est l'expression du HLA-DR, leur augmentation est donc forcément liée à une expression accrue du HLA-DR. Cette différence entre le cancer colique et bronchique pourrait s'expliquer par les différences qui existent en terme de charge mutationnelle. Les données de la littérature montrent que le taux de mutation n'est pas identique entre les différents types de cancer. Les cancers les plus mutés sont le mélanome et le cancer bronchique non à petites cellules, le cancer du côlon arrive lui en 6^{ième} position (Alexandrov *et al*, 2013). Ces données peuvent suggérer que le nombre d'antigènes tumoraux est plus important dans les CBNPC comparativement au cancer du côlon et qu'il peut exister une réponse immunitaire anti-tumorale polyclonale plus puissante, donc un taux de cellules dendritique et myéloïde matures supérieur. Cette hypothèse est d'autant plus probable qu'il existe globalement une quantité plus importante de cellules myéloïdes PD-L1⁺ en périphérie. Or, l'expression de PD-L1 est une preuve indirecte de la présence d'une réponse immunitaire de type 1. L'augmentation des cellules PD-L1⁺ est donc probablement due à l'existence d'une réponse immunitaire contre la tumeur qui est détectable en périphérie. L'analyse statistique des données

issues du panel myéloïde nous a permis de mettre en relation la réponse au Nivolumab et un ensemble de populations ayant un caractère prédictif. De façon très intéressante, les populations impliquées dans la prédiction de la réponse sont associées à la présentation des antigènes (mDC, pDC, monocyte). De plus, l'expression de PD-L1 ressort comme un facteur important puisque son expression à la surface de cellules pDC et mMDSC est un des éléments du modèle. La présence de cellules gMDSC est la seule variable biologique associée à une prédiction défavorable. Cette donnée pourrait paraître contradictoire, d'autant que l'expression de PD-L1 sur les gMDSC n'est pas très différente de celle des autres populations myéloïdes. Il faut néanmoins garder en tête que la voie PD-L1/PD-1 n'est pas la seule impliquée dans l'immunosuppression. Nous avons pu montrer que ces cellules expriment également les ectonucléotidases CD39 et CD73 qui peuvent contribuer à l'échappement tumoral. Il est donc probable que ces cellules aient un phénotype particulier leur conférant un pouvoir immunosuppresseur indépendant de PD-L1.

L'analyse des populations T-CD4 nous a permis d'identifier les cellules Th17 comme une population prédominante parmi les Thelper chez les CBNPC. Comme pour le cancer colique, cette population est plutôt associée à un mauvais pronostic de la maladie et pourrait contribuer à la progression de la maladie sous nivolumab. Cette population présente par ailleurs une caractéristique qui lui est propre. C'est la seule population T qui présente un taux d'expression de PD-1 supérieur chez les CBNPC. L'expression de PD-1 à la surface des cellules Th17 indique que ces cellules sont plus actives d'un point de vue biologique et qu'elles peuvent donc favoriser une réponse inflammatoire et pro-angiogénique délétère. Cette hypothèse devra être confirmée ultérieurement. L'analyse des autres sous-populations Thelper indique que les Th1 et les Th2 sont très profondément diminués chez les CBNPC. Par ailleurs, l'analyse de l'expression des récepteurs inhibiteurs PD-1 et Tim-3 indique qu'il existe une chute importante des sous-groupes PD-1⁺/Tim-3⁺ et PD-1⁻/Tim-3⁺. Deux explications distinctes peuvent permettre de comprendre ce phénomène. La première est qu'une réponse immunitaire induite par la présence du cancer peut conduire la migration des cellules effectrices au niveau tumoral, ce qui contribue à leur diminution au niveau périphérique. La seconde est une vraie diminution de ces cellules du fait d'un blocage de prolifération ou d'une mort induite par les récepteurs inhibiteurs tels que PD-L1. Les cellules CD8⁺ circulantes ne sont pas tellement différentes entre les volontaires sains et les CBNPC. Ces cellules sont extrêmement importantes pour l'efficacité de la réponse immunitaire antitumorale. En terme de nombre, les sous-groupes T-CD8 ne sont pas différents. En terme de proportion, une tendance à la baisse des cellules T-CD8 centrales mémoires et une augmentation des cellules effectrices terminales est observée. Cette modulation pourrait indiquer qu'il existe un épuisement général du compartiment T-CD8⁺ dans le CBNPC. De plus, une proportion plus faible des cellules centrales mémoires peut conduire à une plus faible

activation de l'immunité par une perte de réactivation CD8 au sein des organes lymphoïdes. Concernant l'expression des récepteurs inhibiteurs, les résultats sont similaires à ceux observés pour la population T-CD4⁺. En effet, une plus faible proportion de cellules PD-1⁺/Tim-3⁺ et PD-1⁻/Tim-3⁺ existe pour les populations mémoires centrales et effectrices. De la même manière que pour les Thelper, cette donnée pourrait indiquer une migration tissulaire plus importante ou une inhibition des CD8 dans un contexte de cancer. Le fait est que ce mécanisme soit commun aux populations CD4⁺ et CD8⁺ indique qu'il s'agit d'un phénomène généralisé aux populations lymphocytaire T et qu'il contribue à l'échappement immunitaire. Il est donc très probable que la diminution de ces populations soit associée à l'expression de différents récepteur inhibiteurs par les cellules myéloïdes et tumorales, tels que la galectine-9, ligand de Tim-3, et qui contribue à la dysfonction des cellules T mémoires.

La suite de ce travail sera de finaliser l'inclusion des patients pour la cohorte test et la cohorte de validation. Par ailleurs, nous allons également finaliser les analyses statistiques et insérer la globalité des données d'immunomonitoring de JO pour générer un modèle prédictif basé à la fois sur les données myéloïdes et lymphoïdes. Nous envisageons également d'utiliser les données de suivi immunologique pour analyser l'évolution de l'expression de PD-L1 à la surface des cellules myéloïdes. Cette étude nous permettra d'identifier de potentielles modifications quantitatives et/ou qualitatives liées à la survenue d'une progression tumorale. Nous avons déjà pu observer un phénomène très particulier, celui d'une induction précoce de PD-L1 à la surface des cellules dendritiques et monocytaires après la première et la deuxième cure de traitement chez les patients ayant une survie sans progression inférieure à 6 mois. Cette augmentation n'est absolument pas observée chez les patients qui présentent une réponse ou une stabilisation de leur maladie au-delà de ces 6 mois. Cette augmentation n'a peut-être pas de lien de cause à effet mais il est envisageable de penser que PD-L1 peut toujours jouer un rôle immunosuppresseur. Cet effet pourrait être lié à sa capacité de fixation avec le CD80 (Butte M *et al*, 2007). Des données préliminaires nous indiquent que ce récepteur peut être présent en plus ou moins grande quantité à la surface des cellules T-CD4⁺. Or, la liaison de CD80 à PD-L1 provoque une chute de la prolifération et de l'activation des cellules T au même titre que PD-1. Il est donc possible que ce récepteur prenne le relais afin d'induire une immunosuppression favorable pour la croissance tumorale. Sur ce principe, le blocage de la voie PD-1/PD-L1/2 pourrait ne pas être suffisante et bloquer simultanément PD-1 et PD-L1 pourrait s'avérer logique biologiquement parlant. L'effet de cette double inhibition chez la souris est actuellement testé dans notre laboratoire.

Un projet est également en cours pour identifier quelles sont les combinaisons chimiothérapeutiques de premières lignes permettant d'induire une réponse immunitaire puissante

qui puisse être maintenue dans le temps par les anticorps ciblant les récepteurs inhibiteurs. Nous testerons entre autres l'impact immunologique des doublets chimiothérapeutiques associant le cisplatine au pemetrexed, au docétaxel ou à la gemcitabine. Nous analyserons l'impact de ces doublets sur les populations suppressives (T_{Reg} , gMDSC, mMDSC) et sur la maturation des cellules dendritiques, induite par la mort immunogène des cellules tumorales. Si une réponse immunitaire T-CD8 est induite en réponse à la chimiothérapie, nous chercherons à caractériser le phénotype de ces cellules afin de proposer le ou les meilleures associations d'immunochimiothérapies.

Nous espérons que l'ensemble de ce travail conduira à une prise en charge plus rationnelle et plus efficace des CBNPC et que nous pourrons identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.

CONCLUSIONS

PERSPECTIVES

L'oncologie actuelle est confrontée à la résistance et à la progression rapide des cancers. Les mécanismes de résistance intrinsèque développés par les cellules tumorales peuvent compromettre l'efficacité des chimiothérapies. Il est maintenant admis que l'état de la réponse immunitaire de l'hôte détermine en partie l'issue thérapeutique des patients. L'objectif de notre équipe de recherche est donc de caractériser la réponse immunitaire anti-tumorale et d'identifier l'impact des thérapies conventionnelles (chimiothérapie) sur cette réponse dans le but d'identifier des mécanismes liés à un échappement futur de la tumeur. Cette caractérisation nous permet de tester ensuite de nouvelles associations thérapeutiques basées sur un rationnel biologique prédéfini. Cette première approche nous a permis de valider chez l'homme qu'une combinaison de chimiothérapie utilisée dans le traitement du cancer colique métastatique, le FOLFOX-bevacizumab, a la capacité d'induire chez l'homme une diminution des cellules myéloïdes suppressives, chute qui est associée à une réponse thérapeutique plus favorable. La caractérisation des MDSC circulantes nous a permis d'identifier PD-L1 et les ectonucléotidases CD39/CD73 comme de potentielles cibles thérapeutiques en particulier pour les patients qui ne tirent aucun bénéfice du traitement quant à la diminution des MDSC. Nous avons pu montrer que l'effet délétère du 5-FU, celui d'induire des Th17, est également une réalité chez l'homme. Envisager de nouvelles stratégies de traitement basées sur l'inhibition des Th17 est donc également une priorité. L'utilisation d'anticorps ou d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant cette population sont à l'heure actuelle en cours d'évaluation. Notre travail sur les Th17 nous pousse à croire qu'il est possible de cibler ces lymphocytes en modulant l'acétylation de STAT3 grâce à l'activation pharmacologique de SIRT1. La désacétylation de STAT3 est un élément clé de son activation. L'utilisation d'agonistes de SIRT1 nous a permis de montrer chez l'homme et la souris qu'il est possible de moduler cette acétylation et de neutraliser la fonctionnalité des cellules Th17. Sur la base de ce rationnel biologique, il ne reste donc plus qu'à mettre en place l'évaluation de l'efficacité d'une telle stratégie. Nous pourrions envisager de mettre en place cet essai dans le cadre du cancer colorectal traité par FOLFOX-bevacizumab pour lequel nous avons pu constater un rôle pronostique défavorable des lymphocytes Th17 (Figure 1).

Le dernier volet de cette thèse a été consacré à la présentation des résultats préliminaires obtenus sur une cohorte prospective de cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) traités par Nivolumab (anti-PD-1) et la comparaison du profil immunologique de ces patients à des volontaires sains. Cette étude a révélé des différences majeures quant à la composition de ce profil. Elle a aussi révélé que le profil immunologique périphérique n'est pas identique d'un cancer à un autre, les MDSC en sont un exemple. La caractérisation de ce profil nous a permis de montrer qu'il existait une réponse immunologique périphérique parmi les CBNPC. Cette réponse est très certainement contrôlée différemment en fonction des individus par une expression plus ou moins importante de

PD-L1. L'expression de ce marqueur est un facteur prédictif de réponse au nivolumab. En effet, parmi les 6 variables biologiques identifiées comme prédictives, 3 sont liées à l'expression de PD-L1. Les gMDSC sont quant à elles associées à une mauvaise réponse au nivolumab ce qui laisse à penser qu'elles suppriment la réponse par un mécanisme complémentaire qu'il faudra étudier. L'étude des sous-populations Thelper nous a permis de constater une nouvelle fois que les lymphocytes Th17 sont au cœur des perturbations immunologiques chez les malades. La chute drastique des Th1, une population impliquée dans la réponse T-CD8 de type 1 est très certainement à mettre en relation avec l'augmentation des Th17. Il est fort probable qu'ils participent de près ou de loin à l'efficacité thérapeutique des immunothérapies. Les analyses futures nous diront s'ils sont effectivement associés à une bonne ou à une mauvaise réponse au nivolumab.

L'ensemble de ce travail met en lumière qu'il existe un lien clair entre les cellules myéloïdes immunosuppressives, les lymphocytes Th17 et la réponse aux thérapeutiques actuellement utilisées dans les cancers du côlon et du poumon. Cibler ces populations est un enjeu majeur en oncologie pour augmenter les chances de réponse et de régression des malades. Les études qui sont actuellement en cours ou qui seront menées prochainement nous diront si cette stratégie est payante, nous l'espérons grandement !

ANNEXES

Liste des publications (période de thèse, 2013-2016)

2016

Sirtuin-1 (SIRT1) activation controls tumor growth by impeding Th17 differentiation via STAT3 deacetylation. Emeric Limagne, Marion Thibaudin, Romain Euvrard, Hélène Berger, Pauline Chalons, Frédérique Végan, Etienne Humblin, Romain Boidot, Cédric Rébé, Valentin Derangère, Sylvain Ladoire, Lionel Apetoh, Dominique Delmas, François Ghiringhelli. En préparation

Accumulation of MDSC and Th17 cells in patients with metastatic colorectal cancer predicts the efficacy of a FOLFOX-bevacizumab drug treatment regimen. Limagne E, Euvrard R, Thibaudin M, Rébé C, Derangère V, Chevriaux A, Boidot R, Végran F, Bonnefoy N, Vincent J, Bengrine-Lefevre L, Ladoire S, Delmas D, Apetoh L, Ghiringhelli F. *Cancer Res*, 2016

Resveratrol Interferes with IL1- β -Induced Pro-Inflammatory Paracrine Interaction between Primary Chondrocytes and Macrophages. Limagne E, Lançon A, Delmas D, Cherkaoui-Malki M, Latruffe N. *Nutrients*, 2016

2015

Human ectonucleotidase-expressing CD25^{high} Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions. Thibaudin M, Chaix M, Boidot R, Végran F, Derangère V, Limagne E, Berger H, Ladoire S, Apetoh L, Ghiringhelli F. *Oncoimmunology*. 2015

Does bevacizumab impact anti-EGFR therapy efficacy in metastatic colorectal cancer? Derangère V, Fumet JD, Boidot R, Bengrine L, Limagne E, Chevriaux A, Vincent J, Ladoire S, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. *Oncotarget*. 2016

The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. Bruchard M, Rebé C, Derangère V, Togbé D, Ryffel B, Boidot R, Humblin E, Hamman A, Chalmin F, Berger H, Chevriaux A, Limagne E, Apetoh L, Végran F, Ghiringhelli F. *Nat Immunol*. 2015

2014

Potential role of oxidative DNA damage in the impact of PNPLA3 variant (rs 738409 C>G) in hepatocellular carcinoma risk. Limagne E, Cottet V, Cotte AK, Hamza S, Hillon P, Latruffe N, Delmas D. *Hepatology*. 2014

The role of reactive oxygen species and subsequent DNA-damage response in the emergence of resistance towards resveratrol in colon cancer models. Colin DJ, Limagne E, Ragot K, Lizard G, Ghiringhelli F, Solary E, Chauffert B, Latruffe N, Delmas D. *Cell Death Dis*. 2014

Liver X receptor β activation induces pyroptosis of human and murine colon cancer cells. Derangère V, Chevriaux A, Courtaut F, Bruchard M, Berger H, Chalmin F, Causse SZ, Limagne E, Végran F, Ladoire S, Simon B, Boireau W, Hichami A, Apetoh L, Mignot G, Ghiringhelli F, Rébé C. *Cell Death Differ*. 2014

Differential protective effects of red wine polyphenol extracts (RWEs) on colon carcinogenesis. Mazué F, Delmas D, Murillo G, Saleiro D, Limagne E, Latruffe N. *Food Funct*. 2014

A role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma in resveratrol-induced colon cancer cell apoptosis. Aires V, Brassart B, Carlier A, Scagliarini A, Mandard S, **Limagne E**, Solary E, Martiny L, Tarpin M, Delmas D. *Mol Nutr Food Res.* 2014

2013

Resveratrol metabolites inhibit human metastatic colon cancer cells progression and synergize with chemotherapeutic drugs to induce cell death. **Limagne E**, Aires V, Cotte AK, Latruffe N, Ghiringhelli F, Delmas D. *Mol Nutr Food Res.* 2013

Importance of lipid microdomains, rafts, in absorption, delivery, and biological effects of resveratrol. Delmas D, Aires V, Colin DJ, **Limagne E**, Scagliarini A, Cotte AK, Ghiringhelli F. *Ann N Y Acad Sci.* 2013

BIBLIOGRAPHIE

(2015) Tumor Glucose Consumption Inhibits T-Cell Function. *Cancer discovery* **5**(11): 1121-1121

Abelev GI, Perova SD, Khramkova NI, Postnikova ZA, Irlin IS (1963) Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation* **1**: 174-80

Adams JL, Smothers J, Srinivasan R, Hoos A (2015) Big opportunities for small molecules in immuno-oncology. *Nature reviews Drug discovery* **14**(9): 603-22

Aires V, Limagne E, Cotte AK, Latruffe N, Ghiringhelli F, Delmas D (2013) Resveratrol metabolites inhibit human metastatic colon cancer cells progression and synergize with chemotherapeutic drugs to induce cell death. *Molecular nutrition & food research* **57**(7): 1170-81

Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Borresen-Dale AL, Boyault S, Burkhardt B, Butler AP, Caldas C, Davies HR, Desmedt C, Eils R, Eyfjord JE, Foekens JA, Greaves M, Hosoda F, Hutter B, Ilicic T, Imbeaud S, Imielinski M, Jager N, Jones DT, Jones D, Knappskog S, Kool M, Lakhani SR, Lopez-Otin C, Martin S, Munshi NC, Nakamura H, Northcott PA, Pajic M, Papaemmanuil E, Paradiso A, Pearson JV, Puente XS, Raine K, Ramakrishna M, Richardson AL, Richter J, Rosenstiel P, Schlesner M, Schumacher TN, Span PN, Teague JW, Totoki Y, Tutt AN, Valdes-Mas R, van Buuren MM, van 't Veer L, Vincent-Salomon A, Waddell N, Yates LR, Australian Pancreatic Cancer Genome I, Consortium IBC, Consortium IM-S, PedBrain I, Zucman-Rossi J, Futreal PA, McDermott U, Lichter P, Meyerson M, Grimmond SM, Siebert R, Campo E, Shibata T, Pfister SM, Campbell PJ, Stratton MR (2013) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**(7463): 415-21

Alizadeh D, Trad M, Hanke NT, Larmonier CB, Janikashvili N, Bonnotte B, Katsanis E, Larmonier N (2014) Doxorubicin eliminates myeloid-derived suppressor cells and enhances the efficacy of adoptive T-cell transfer in breast cancer. *Cancer research* **74**(1): 104-18

Allan JM, Travis LB (2005) Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nature reviews Cancer* **5**(12): 943-55

Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, Carbone DP, Gibrilovich DI (2001) Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *Journal of immunology* **166**(1): 678-89

Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S (2008) The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *International immunology* **20**(11): 1361-8

Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, Andre F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature medicine* **13**(9): 1050-9

Aruga A, Aruga E, Tanigawa K, Bishop DK, Sondak VK, Chang AE (1997) Type 1 versus type 2 cytokine release by Vbeta T cell subpopulations determines in vivo antitumor reactivity: IL-10 mediates a suppressive role. *Journal of immunology* **159**(2): 664-73

Aspord C, Pedroza-Gonzalez A, Gallegos M, Tindle S, Burton EC, Su D, Marches F, Banchereau J, Palucka AK (2007) Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *The Journal of experimental medicine* **204**(5): 1037-47

Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay Nel H, Mosseri V, Laccourreye O, Bruneval P, Fridman WH, Brasnu DF, Tartour E (2006) Prognostic value of tumor-infiltrating

CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**(2): 465-72

Baitsch L, Legat A, Barba L, Fuertes Marraco SA, Rivals JP, Baumgaertner P, Christiansen-Jucht C, Bouzourene H, Rimoldi D, Pircher H, Rufer N, Matter M, Michielin O, Speiser DE (2012) Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization. *PLoS one* **7**(2): e30852

Bamias A, Koutsoukou V, Terpos E, Tsiatas ML, Liakos C, Tsitsilonis O, Rodolakis A, Voulgaris Z, Vlahos G, Papageorgiou T, Papatheodoridis G, Archimandritis A, Antsaklis A, Dimopoulos MA (2008) Correlation of NK T-like CD3+CD56+ cells and CD4+CD25+(hi) regulatory T cells with VEGF and TNFalpha in ascites from advanced ovarian cancer: Association with platinum resistance and prognosis in patients receiving first-line, platinum-based chemotherapy. *Gynecologic oncology* **108**(2): 421-7

Barbi J, Pardoll D, Pan F (2013) Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunological reviews* **252**(1): 52-77

Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH (2006) Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **24**(34): 5373-80

Benevides L, da Fonseca DM, Donate PB, Tiezzi DG, De Carvalho DD, de Andrade JM, Martins GA, Silva JS (2015) IL17 Promotes Mammary Tumor Progression by Changing the Behavior of Tumor Cells and Eliciting Tumorigenic Neutrophils Recruitment. *Cancer research* **75**(18): 3788-99

Bennett JA, Rao VS, Mitchell MS (1978) Systemic bacillus Calmette-Guerin (BCG) activates natural suppressor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**(10): 5142-4

Berger H, Vegran F, Chikh M, Gilardi F, Ladoire S, Bugaut H, Mignot G, Chalmin F, Bruchard M, Derangere V, Chevriaux A, Rebe C, Ryffel B, Pot C, Hichami A, Desvergne B, Ghiringhelli F, Apetoh L (2013) SOCS3 transactivation by PPARGamma prevents IL-17-driven cancer growth. *Cancer research* **73**(12): 3578-90

Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, Angell H, Fredriksen T, Lafontaine L, Berger A, Bruneval P, Fridman WH, Becker C, Pages F, Speicher MR, Trajanoski Z, Galon J (2013) Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* **39**(4): 782-95

Bingle L, Brown NJ, Lewis CE (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *The Journal of pathology* **196**(3): 254-65

Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ (2009) Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature immunology* **10**(1): 29-37

Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E, Holgado E, Barlesi F, Kohlhaufl M, Arrieta O, Burgio MA, Fayette J, Lena H, Poddubskaya E, Gerber DE, Gettinger SN, Rudin CM, Rizvi N, Crino L, Blumenschein GR, Jr., Antonia SJ, Dorange C, Harbison CT, Graf Finckenstein F, Brahmer JR (2015) Nivolumab versus Docétaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine* **373**(17): 1627-39

Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crino L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, Antonia S, Pluzanski A, Vokes EE, Holgado E, Waterhouse D, Ready N, Gainor J, Aren Frontera O, Havel L, Steins M, Garassino MC, Aerts JG, Domine M, Paz-Ares L, Reck M, Baudelet C, Harbison CT, Lestini B, Spigel DR (2015) Nivolumab versus Docétaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine* **373**(2): 123-35

Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay TM, Alaparthi S, Grosso JF, Korman AJ, Parker SM, Agrawal S, Goldberg SM, Pardoll DM, Gupta A, Wigginton JM (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *The New England journal of medicine* **366**(26): 2455-65

Braumuller H, Wieder T, Brenner E, Assmann S, Hahn M, Alkhaled M, Schilbach K, Essmann F, Kneilling M, Griessinger C, Ranta F, Ullrich S, Mocikat R, Braungart K, Mehra T, Fehrenbacher B, Berdel J, Niessner H, Meier F, van den Broek M, Haring HU, Handgretinger R, Quintanilla-Martinez L, Fend F, Pesic M, Bauer J, Zender L, Schaller M, Schulze-Osthoff K, Rocken M (2013) T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* **494**(7437): 361-5

Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, Forster R (2000) Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *The Journal of experimental medicine* **192**(11): 1545-52

Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, Zamboni P, Restifo NP, Zanovello P (2000) Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* **96**(12): 3838-46

Broomfield S, Currie A, van der Most RG, Brown M, van Bruggen I, Robinson BW, Lake RA (2005) Partial, but not complete, tumor-debulking surgery promotes protective antitumor memory when combined with chemotherapy and adjuvant immunotherapy. *Cancer research* **65**(17): 7580-4

Bruchard M, Mignot G, Derangere V, Chalmin F, Chevriaux A, Vegran F, Boireau W, Simon B, Ryffel B, Connat JL, Kanellopoulos J, Martin F, Rebe C, Apetoh L, Ghiringhelli F (2013) Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nature medicine* **19**(1): 57-64

Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, Golstein P (1987) A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* **328**(6127): 267-70

Buckanovich RJ, Facciabene A, Kim S, Benencia F, Sasaroli D, Balint K, Katsaros D, O'Brien-Jenkins A, Gimotty PA, Coukos G (2008) Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nature medicine* **14**(1): 28-36

Buckowitz A, Knaebel HP, Benner A, Blaker H, Gebert J, Kienle P, von Knebel Doeberitz M, Kloor M (2005) Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *British journal of cancer* **92**(9): 1746-53

Bugalho A, Martins C, Silva Z, Nunes G, Mendes AS, Ferreira I, Videira PA (2016) Immature myeloid cells and tolerogenic cytokine profile in lung adenocarcinoma metastatic lymph nodes assessed by endobronchial ultrasound. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **37**(1): 953-61

Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S (2007) Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer research* **67**(20): 10019-26

Burnet M (1957a) Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *British medical journal* **1**(5023): 841-7

Burnet M (1957b) Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *British medical journal* **1**(5022): 779-86

Caetano MS, Zhang H, Cumpian AM, Gong L, Unver N, Ostrin EJ, Daliri S, Chang SH, Ochoa CE, Hanash S, Behrens C, Wistuba II, Sternberg C, Kadara H, Ferreira CG, Watowich SS, Moghaddam SJ (2016) IL6 Blockade Reprograms the Lung Tumor Microenvironment to Limit the Development and Progression of K-ras-Mutant Lung Cancer. *Cancer research* **76**(11): 3189-99

Cai G, Freeman GJ (2009) The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation. *Immunological reviews* **229**(1): 244-58

Callahan MK, Wolchok JD (2013) At the bedside: CTLA-4- and PD-1-blocking antibodies in cancer immunotherapy. *Journal of leukocyte biology* **94**(1): 41-53

Camus M, Tosolini M, Mlecnik B, Pages F, Kirilovsky A, Berger A, Costes A, Bindea G, Charoentong P, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J (2009) Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence. *Cancer research* **69**(6): 2685-93

Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, Schmitt E, Hamai A, Hervas-Stubbs S, Obeid M, Coutant F, Metivier D, Pichard E, Aucouturier P, Pierron G, Garrido C, Zitvogel L, Kroemer G (2005) Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *The Journal of experimental medicine* **202**(12): 1691-701

Cerboni C, Fionda C, Soriani A, Zingoni A, Doria M, Cippitelli M, Santoni A (2014) The DNA Damage Response: A Common Pathway in the Regulation of NKG2D and DNAM-1 Ligand Expression in Normal, Infected, and Cancer Cells. *Frontiers in immunology* **4**: 508

Cha E, Klinger M, Hou Y, Cummings C, Ribas A, Faham M, Fong L (2014) Improved survival with T cell clonotype stability after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients. *Science translational medicine* **6**(238): 238ra70

Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin JP, Boireau W, Rouleau A, Simon B, Lanneau D, De Thonel A, Multhoff G, Hamman A, Martin F, Chauffert B, Solary E, Zitvogel L, Garrido C, Ryffel B, Borg C, Apetoh L, Rebe C, Ghiringhelli F (2010) Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *The Journal of clinical investigation* **120**(2): 457-71

Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Vegran F, Hichami A, Ladoire S, Derangere V, Vincent J, Masson D, Robson SC, Eberl G, Pallandre JR, Borg C, Ryffel B, Apetoh L, Rebe C, Ghiringhelli F (2012) Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* **36**(3): 362-73

Chang CC, Pirozzi G, Wen SH, Chung IH, Chiu BL, Errico S, Luongo M, Lombardi ML, Ferrone S (2015) Multiple structural and epigenetic defects in the human leukocyte antigen class I antigen presentation pathway in a recurrent metastatic melanoma following immunotherapy. *The Journal of biological chemistry* **290**(44): 26562-75

Chang HC, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL, Jabeen R, McKinley C, Ahyi AN, Han L, Nguyen ET, Robertson MJ, Perumal NB, Tepper RS, Nutt SL, Kaplan MH (2010) The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nature immunology* **11**(6): 527-34

Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, Alizadeh AA, Gentles AJ, Volkmer J, Weiskopf K, Willingham SB, Raveh T, Park CY, Majeti R, Weissman IL (2010) Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Science translational medicine* **2**(63): 63ra94

Chen G, Emens LA (2013) Chemoimmunotherapy: reengineering tumor immunity. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **62**(2): 203-16

Chen L, Flies DB (2013) Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature reviews Immunology* **13**(4): 227-42

Chen WC, Lai YH, Chen HY, Guo HR, Su IJ, Chen HH (2013) Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. *Histopathology* **63**(2): 225-33

Chen X, Wan J, Liu J, Xie W, Diao X, Xu J, Zhu B, Chen Z (2010) Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung cancer* **69**(3): 348-54

Chen Z, Freedman MS (2008) CD16+ gammadelta T cells mediate antibody dependent cellular cytotoxicity: potential mechanism in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Clinical immunology* **128**(2): 219-27

Cheng P, Corzo CA, Luetkeke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, Ortiz M, Nacken W, Sorg C, Vogl T, Roth J, Gabrilovich DI (2008) Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *The Journal of experimental medicine* **205**(10): 2235-49

Choy MK, Phipps ME (2010) MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends in molecular medicine* **16**(3): 97-106

Chugh S, Anand V, Swaroop L, Sharma M, Seth A, Sharma A (2013) Involvement of Th17 cells in patients of urothelial carcinoma of bladder. *Human immunology* **74**(10): 1258-62

Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, Agarwal A, Huang W, Parkhurst CN, Muratet M, Newberry KM, Meadows S, Greenfield A, Yang Y, Jain P, Kirigin FK, Birchmeier C, Wagner EF, Murphy KM, Myers RM, Bonneau R, Littman DR (2012) A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* **151**(2): 289-303

Coley WB (1991) The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clinical orthopaedics and related research*(262): 3-11

Colin D, Limagne E, Jeanningros S, Jacquelin A, Lizard G, Athias A, Gambert P, Hichami A, Latruffe N, Solary E, Delmas D (2011) Endocytosis of resveratrol via lipid rafts and activation of downstream signaling pathways in cancer cells. *Cancer prevention research* **4**(7): 1095-106

Conejo-Garcia JR, Benencia F, Courreges MC, Kang E, Mohamed-Hadley A, Buckanovich RJ, Holtz DO, Jenkins A, Na H, Zhang L, Wagner DS, Katsaros D, Carroll R, Coukos G (2004) Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nature medicine* **10**(9): 950-8

Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn JI, Cheng P, Cho HI, Celis E, Quiceno DG, Padhya T, McCaffrey TV, McCaffrey JC, Gabrilovich DI (2010) HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *The Journal of experimental medicine* **207**(11): 2439-53

Cottone L, Capobianco A, Gualteroni C, Perrotta C, Bianchi ME, Rovere-Querini P, Manfredi AA (2015) 5-Fluorouracil causes leukocytes attraction in the peritoneal cavity by activating

autophagy and HMGB1 release in colon carcinoma cells. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* **136**(6): 1381-9

Crane CA, Panner A, Murray JC, Wilson SP, Xu H, Chen L, Simko JP, Waldman FM, Pieper RO, Parsa AT (2009) PI(3) kinase is associated with a mechanism of immunoresistance in breast and prostate cancer. *Oncogene* **28**(2): 306-12

Croft M, Carter L, Swain SL, Dutton RW (1994) Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *The Journal of experimental medicine* **180**(5): 1715-28

Crowe NY, Coquet JM, Berzins SP, Kyparissoudis K, Keating R, Pellicci DG, Hayakawa Y, Godfrey DI, Smyth MJ (2005) Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *The Journal of experimental medicine* **202**(9): 1279-88

Crowe NY, Smyth MJ, Godfrey DI (2002) A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *The Journal of experimental medicine* **196**(1): 119-27

Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE (2001) Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *Journal of leukocyte biology* **70**(4): 478-90

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**(6924): 744-8

Curtin JF, Liu N, Candolfi M, Xiong W, Assi H, Yagiz K, Edwards MR, Michelsen KS, Kroeger KM, Liu C, Muhammad AK, Clark MC, Arditi M, Comin-Anduix B, Ribas A, Lowenstein PR, Castro MG (2009) HMGB1 mediates endogenous TLR2 activation and brain tumor regression. *PLoS medicine* **6**(1): e10

D'Asaro M, La Mendola C, Di Liberto D, Orlando V, Todaro M, Spina M, Guggino G, Meraviglia S, Caccamo N, Messina A, Salerno A, Di Raimondo F, Vigneri P, Stassi G, Fournie JJ, Dieli F (2010) V gamma 9V delta 2 T lymphocytes efficiently recognize and kill zoledronate-sensitized, imatinib-sensitive, and imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *Journal of immunology* **184**(6): 3260-8

Dang EV, Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, Bordman Z, Fu J, Kim Y, Yen HR, Luo W, Zeller K, Shimoda L, Topalian SL, Semenza GL, Dang CV, Pardoll DM, Pan F (2011) Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* **146**(5): 772-84

Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho IC, Khoury S, Oukka M, Kuchroo VK (2008) IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nature immunology* **9**(12): 1347-55

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine* **204**(6): 1257-65

Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller BM, Komor M, Budczies J, Darb-Esfahani S, Kronenwett R, Hanusch C, von Torne C, Weichert W, Engels K, Solbach C, Schrader I, Dietel M, von Minckwitz G (2010) Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**(1): 105-13

- Di Biase S, Lee C, Brandhorst S, Manes B, Buono R, Cheng CW, Cacciottolo M, Martin-Montalvo A, de Cabo R, Wei M, Morgan TE, Longo VD (2016) Fasting-Mimicking Diet Reduces HO-1 to Promote T Cell-Mediated Tumor Cytotoxicity. *Cancer cell* **30**(1): 136-46
- Di Carlo E, Bocca P, Emionite L, Cilli M, Cipollone G, Morandi F, Raffaghello L, Pistoia V, Prigione I (2013) Mechanisms of the antitumor activity of human Vgamma9Vdelta2 T cells in combination with zoledronic acid in a preclinical model of neuroblastoma. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **21**(5): 1034-43
- Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, Caccamo N, Meraviglia S, Cicero G, Roberts A, Buccheri S, D'Asaro M, Gebbia N, Salerno A, Eberl M, Hayday AC (2007) Targeting human {gamma}delta T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research* **67**(15): 7450-7
- Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de Chaisemartin L, Lebecque S, Fridman WH, Cadranet J (2008) Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**(27): 4410-7
- Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, Liao D, Zhang N, DeNardo DG, Coussens LM, Karin M, Goldrath AW, Johnson RS (2010) Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer research* **70**(19): 7465-75
- Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, Vecchiato N, Macri E, Fornasarig M, Boiocchi M (1999) High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *The American journal of pathology* **154**(6): 1805-13
- Domoszlai T, Martincuks A, Fahrenkamp D, Schmitz-Van de Leur H, Kuster A, Muller-Newen G (2014) Consequences of the disease-related L78R mutation for dimerization and activity of STAT3. *Journal of cell science* **127**(Pt 9): 1899-910
- Dorsam RT, Gutkind JS (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature reviews Cancer* **7**(2): 79-94
- Du R, Zhao H, Yan F, Li H (2014) IL-17+Foxp3+ T cells: an intermediate differentiation stage between Th17 cells and regulatory T cells. *Journal of leukocyte biology* **96**(1): 39-48
- Duncan TJ, Rolland P, Deen S, Scott IV, Liu DT, Spendlove I, Durrant LG (2007) Loss of IFN gamma receptor is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**(14): 4139-45
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* **3**(11): 991-8
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **21**(2): 137-48
- Dunn GP, Sheehan KC, Old LJ, Schreiber RD (2005) IFN unresponsiveness in LNCaP cells due to the lack of JAK1 gene expression. *Cancer research* **65**(8): 3447-53
- Durham NM, Nirschl CJ, Jackson CM, Elias J, Kochel CM, Anders RA, Drake CG (2014) Lymphocyte Activation Gene 3 (LAG-3) modulates the ability of CD4 T-cells to be suppressed in vivo. *PloS one* **9**(11): e109080
- Faghih Z, Rezaeifard S, Safaei A, Ghaderi A, Erfani N (2013) IL-17 and IL-4 producing CD8+ T cells in tumor draining lymph nodes of breast cancer patients: positive association with tumor progression. *Iranian journal of immunology : IJI* **10**(4): 193-204

Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanetz M, Vansteenkiste J, Mazieres J, Park K, Smith D, Artal-Cortes A, Lewanski C, Braiteh F, Waterkamp D, He P, Zou W, Chen DS, Yi J, Sandler A, Rittmeyer A, Group PS (2016) Atezolizumab versus docétaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* **387**(10030): 1837-46

Fidler IJ (1978) Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer research* **38**(9): 2651-60

Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, Castelli C, Mariani L, Parmiani G, Rivoltini L (2007) Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**(18): 2546-53

Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, Gottfried E, Schwarz S, Rothe G, Hoves S, Renner K, Timischl B, Mackensen A, Kunz-Schughart L, Andreesen R, Krause SW, Kreutz M (2007) Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* **109**(9): 3812-9

Foley EJ (1953) Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer research* **13**(12): 835-7

Fraser JH, Rincon M, McCoy KD, Le Gros G (1999) CTLA4 ligation attenuates AP-1, NFAT and NF-kappaB activity in activated T cells. *European journal of immunology* **29**(3): 838-44

Frederick DT, Piris A, Cogdill AP, Cooper ZA, Lezcano C, Ferrone CR, Mitra D, Boni A, Newton LP, Liu C, Peng W, Sullivan RJ, Lawrence DP, Hodi FS, Overwijk WW, Lizee G, Murphy GF, Hwu P, Flaherty KT, Fisher DE, Wargo JA (2013) BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**(5): 1225-31

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T (2000) Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine* **192**(7): 1027-34

Frey DM, Droeser RA, Viehl CT, Zlobec I, Lugli A, Zingg U, Oertli D, Kettelhack C, Terracciano L, Tornillo L (2010) High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *International journal of cancer Journal international du cancer* **126**(11): 2635-43

Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J (2012) The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews Cancer* **12**(4): 298-306

Fujita M, Kohanbash G, Fellows-Mayle W, Hamilton RL, Komohara Y, Decker SA, Ohlfest JR, Okada H (2011) COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research* **71**(7): 2664-74

Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, Carbone DP (1998) Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* **92**(11): 4150-66

Gabrilovich DI, Ishida T, Nadaf S, Ohm JE, Carbone DP (1999) Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving

endogenous dendritic cell function. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **5**(10): 2963-70

Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ (2014) The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nature reviews Immunology* **14**(9): 585-600

Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Colombo MP, Basso G, Brombacher F, Borrello I, Zanovello P, Biciato S, Bronte V (2006) Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *The Journal of clinical investigation* **116**(10): 2777-90

Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P (1999) Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nature medicine* **5**(11): 1249-55

Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G (2012) Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* **13**(12): 780-8

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **313**(5795): 1960-4

Gao Q, Wang XY, Qiu SJ, Zhou J, Shi YH, Zhang BH, Fan J (2011) Tumor stroma reaction-related gene signature predicts clinical outcome in human hepatocellular carcinoma. *Cancer science* **102**(8): 1522-31

Garg AD, Krysko DV, Vandenabeele P, Agostinis P (2012a) Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **61**(2): 215-21

Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T, Kaczmarek A, Ferreira GB, Marysael T, Rubio N, Firczuk M, Mathieu C, Roebroek AJ, Annaert W, Golab J, de Witte P, Vandenabeele P, Agostinis P (2012b) A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *The EMBO journal* **31**(5): 1062-79

Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, Almeida JR, Gostick E, Yu Z, Carpenito C, Wang E, Douek DC, Price DA, June CH, Marincola FM, Roederer M, Restifo NP (2011) A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature medicine* **17**(10): 1290-7

Gavino AC, Nahmod K, Bharadwaj U, Makedonas G, Tweardy DJ (2016) STAT3 inhibition prevents lung inflammation, remodeling, and accumulation of Th2 and Th17 cells in a murine asthma model. *Allergy*

Gertner-Dardenne J, Bonnafous C, Bezombes C, Capietto AH, Scaglione V, Ingoure S, Cendron D, Gross E, Lepage JF, Quillet-Mary A, Ysebaert L, Laurent G, Sicard H, Fournie JJ (2009) Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies. *Blood* **113**(20): 4875-84

Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, Elkum N, Alshabanah M, Bin Amer S, Tulbah A, Ajarim D, Al-Tweigeri T, Dermime S (2006) The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia* **8**(3): 190-8

Ghirelli C, Reyat F, Jeanmougin M, Zollinger R, Sirven P, Michea P, Caux C, Bendriss-Vermare N, Donnadieu MH, Caly M, Fourchette V, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, Sastre-Garau X, Soumelis V (2015) Breast Cancer Cell-Derived GM-CSF Licenses Regulatory Th2 Induction by Plasmacytoid Predendritic Cells in Aggressive Disease Subtypes. *Cancer research* **75**(14): 2775-87

Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, Vermaelen K, Panaretakis T, Mignot G, Ullrich E, Perfettini JL, Schlemmer F, Tasdemir E, Uhl M, Genin P, Civas A, Ryffel B, Kanellopoulos J, Tschopp J, Andre F, Lidereau R, McLaughlin NM, Haynes NM, Smyth MJ, Kroemer G, Zitvogel L (2009) Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nature medicine* **15**(10): 1170-8

Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, Chauffert B, Solary E, Bonnotte B, Martin F (2004) CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *European journal of immunology* **34**(2): 336-44

Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, Biota C, Doffin AC, Durand I, Olive D, Perez S, Pasqual N, Faure C, Ray-Coquard I, Puisieux A, Caux C, Blay JY, Menetrier-Caux C (2009) Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer research* **69**(5): 2000-9

Gonzalez S, Lopez-Soto A, Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Lopez-Larrea C (2008) NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends in immunology* **29**(8): 397-403

Gorelik L, Flavell RA (2002) Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nature reviews Immunology* **2**(1): 46-53

Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, Kletsas D, Mariatos G, Zoumpourlis V, Ryan KM, Kittas C, Papavassiliou AG (2003) p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF-kappaB-independent manner. *The EMBO journal* **22**(7): 1567-78

Gottlieb AB, Matheson RT, Menter A, Leonardi CL, Day RM, Hu C, Schafer PH, Krueger JG (2013) Efficacy, tolerability, and pharmacodynamics of apremilast in recalcitrant plaque psoriasis: a phase II open-label study. *Journal of drugs in dermatology : JDD* **12**(8): 888-97

Gran B, Zhang GX, Yu S, Li J, Chen XH, Ventura ES, Kamoun M, Rostami A (2002) IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *Journal of immunology* **169**(12): 7104-10

Grant GA, Miller JF (1965) Effect of neonatal thymectomy on the induction of sarcomata in C57 BL mice. *Nature* **205**(976): 1124-5

Grosso JF, Kelleher CC, Harris TJ, Maris CH, Hipkiss EL, De Marzo A, Anders R, Netto G, Getnet D, Bruno TC, Goldberg MV, Pardoll DM, Drake CG (2007) LAG-3 regulates CD8+ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems. *The Journal of clinical investigation* **117**(11): 3383-92

Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, Ravoet M, Le Buanec H, Sibille C, Manfouo-Foutsop G, Veys I, Haibe-Kains B, Singhal SK, Michiels S, Rothe F, Salgado R, Duvillier H, Ignatiadis M, Desmedt C, Bron D, Larsimont D, Piccart M, Sotiriou C, Willard-Gallo K (2013) CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *The Journal of clinical investigation* **123**(7): 2873-92

Halama N, Michel S, Kloor M, Zoernig I, Benner A, Spille A, Pommerencke T, von Knebel DM, Folprecht G, Luber B, Feyen N, Martens UM, Beckhove P, Gnjjatic S, Schirmacher P, Herpel E, Weitz J, Grabe N, Jaeger D (2011) Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. *Cancer research* **71**(17): 5670-7

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5): 646-74

Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, Ostrand-Rosenberg S (2009) Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *Journal of immunology* **183**(2): 937-44

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology* **6**(11): 1123-32

Hastings WD, Anderson DE, Kassam N, Koguchi K, Greenfield EA, Kent SC, Zheng XX, Strom TB, Hafler DA, Kuchroo VK (2009) TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *European journal of immunology* **39**(9): 2492-501

Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Van Kaer L, Saiki I, Okumura K (2001) Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. *Journal of immunology* **166**(10): 6012-8

He D, Li H, Yusuf N, Elmets CA, Li J, Mountz JD, Xu H (2010) IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology* **184**(5): 2281-8

Herber DL, Cao W, Nefedova Y, Novitskiy SV, Nagaraj S, Tyurin VA, Corzo A, Cho HI, Celis E, Lennox B, Knight SC, Padhya T, McCaffrey TV, McCaffrey JC, Antonia S, Fishman M, Ferris RL, Kagan VE, Gabrilovich DI (2010) Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nature medicine* **16**(8): 880-6

Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Horn L, Lawrence DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatrín A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS (2014) Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* **515**(7528): 563-7

Hervieu A, Rebe C, Vegran F, Chalmin F, Bruchard M, Vabres P, Apetoh L, Ghiringhelli F, Mignot G (2013) Dacarbazine-mediated upregulation of NKG2D ligands on tumor cells activates NK and CD8 T cells and restrains melanoma growth. *The Journal of investigative dermatology* **133**(2): 499-508

Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, Sandberg C, Beckmann S, Bayer E, Walczak H, Kalthoff H, Ungefroren H (2000) Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene* **19**(48): 5477-86

Hiraoka K, Miyamoto M, Cho Y, Suzuoki M, Oshikiri T, Nakakubo Y, Itoh T, Ohbuchi T, Kondo S, Katoh H (2006) Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *British journal of cancer* **94**(2): 275-80

Hobart M, Ramassar V, Goes N, Urmson J, Halloran PF (1996) The induction of class I and II major histocompatibility complex by allogeneic stimulation is dependent on the transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1): observations in IRF-1 knockout mice. *Transplantation* **62**(12): 1895-901

Hoechst B, Gamrekelashvili J, Manns MP, Greten TF, Korangy F (2011) Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells. *Blood* **117**(24): 6532-41

Holtmeier W, Kabelitz D (2005) gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chemical immunology and allergy* **86**: 151-83

- Horikawa N, Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Baba T, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Koshiyama M, Konishi I (2016) Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Ovarian Cancer Inhibits Tumor Immunity through the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*
- Hossain DM, Pal SK, Moreira D, Duttagupta P, Zhang Q, Won H, Jones J, D'Apuzzo M, Forman S, Kortylewski M (2015) TLR9-Targeted STAT3 Silencing Abrogates Immunosuppressive Activity of Myeloid-Derived Suppressor Cells from Prostate Cancer Patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **21**(16): 3771-82
- Hu CE, Gan J, Zhang RD, Cheng YR, Huang GJ (2011) Up-regulated myeloid-derived suppressor cell contributes to hepatocellular carcinoma development by impairing dendritic cell function. *Scandinavian journal of gastroenterology* **46**(2): 156-64
- Huang A, Zhang B, Wang B, Zhang F, Fan KX, Guo YJ (2013) Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **62**(9): 1439-51
- Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, Divino CM, Chen SH (2006) Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer research* **66**(2): 1123-31
- Huard B, Tournier M, Hercend T, Triebel F, Faure F (1994) Lymphocyte-activation gene 3/major histocompatibility complex class II interaction modulates the antigenic response of CD4+ T lymphocytes. *European journal of immunology* **24**(12): 3216-21
- Huber M, Heink S, Grothe H, Guralnik A, Reinhard K, Elflein K, Hunig T, Mittrucker HW, Brustle A, Kamradt T, Lohoff M (2009) A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *European journal of immunology* **39**(7): 1716-25
- Husain Z, Huang Y, Seth P, Sukhatme VP (2013) Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response: effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells. *Journal of immunology* **191**(3): 1486-95
- Ilie M, Long-Mira E, Bence C, Butori C, Lassalle S, Bouhlef L, Fazzalari L, Zahaf K, Lallee S, Washetine K, Mouroux J, Venissac N, Poudenx M, Otto J, Sabourin JC, Marquette CH, Hofman V, Hofman P (2016) Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **27**(1): 147-53
- Inozume T, Hanada K, Wang QJ, Yang JC (2009) IL-17 secreted by tumor reactive T cells induces IL-8 release by human renal cancer cells. *Journal of immunotherapy* **32**(2): 109-17
- Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T (1992) Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal* **11**(11): 3887-95
- Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR (2006) The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**(6): 1121-33
- Iwakura Y, Ishigame H (2006) The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *The Journal of clinical investigation* **116**(5): 1218-22

- Jackaman C, Majewski D, Fox SA, Nowak AK, Nelson DJ (2012) Chemotherapy broadens the range of tumor antigens seen by cytotoxic CD8(+) T cells in vivo. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **61**(12): 2343-56
- Jager E, Ringhoffer M, Karbach J, Arand M, Oesch F, Knuth A (1996) Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *International journal of cancer Journal international du cancer* **66**(4): 470-6
- Johnson DB, Peng C, Sosman JA (2015) Nivolumab in melanoma: latest evidence and clinical potential. *Therapeutic advances in medical oncology* **7**(2): 97-106
- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD (1998) Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(13): 7556-61
- Karakhanova S, Ryschich E, Mosl B, Harig S, Jager D, Schmidt J, Hartwig W, Werner J, Bazhin AV (2015) Prognostic and predictive value of immunological parameters for chemoradioimmunotherapy in patients with pancreatic adenocarcinoma. *British journal of cancer* **112**(6): 1027-36
- Kataoka T, Schroter M, Hahne M, Schneider P, Irmeler M, Thome M, Froelich CJ, Tschopp J (1998) FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *Journal of immunology* **161**(8): 3936-42
- Kim JR, Moon YJ, Kwon KS, Bae JS, Wagle S, Kim KM, Park HS, Lee H, Moon WS, Chung MJ, Kang MJ, Jang KY (2013a) Tumor infiltrating PD1-positive lymphocytes and the expression of PD-L1 predict poor prognosis of soft tissue sarcomas. *PloS one* **8**(12): e82870
- Kim JS, Sklarz T, Banks LB, Gohil M, Waickman AT, Skuli N, Krock BL, Luo CT, Hu W, Pollizzi KN, Li MO, Rathmell JC, Birnbaum MJ, Powell JD, Jordan MS, Koretzky GA (2013b) Natural and inducible TH17 cells are regulated differently by Akt and mTOR pathways. *Nature immunology* **14**(6): 611-8
- Kim MY, Koh J, Kim S, Go H, Jeon YK, Chung DH (2015a) Clinicopathological analysis of PD-L1 and PD-L2 expression in pulmonary squamous cell carcinoma: Comparison with tumor-infiltrating T cells and the status of oncogenic drivers. *Lung cancer* **88**(1): 24-33
- Kim S, Kim MY, Koh J, Go H, Lee DS, Jeon YK, Chung DH (2015b) Programmed death-1 ligand 1 and 2 are highly expressed in pleomorphic carcinomas of the lung: Comparison of sarcomatous and carcinomatous areas. *European journal of cancer* **51**(17): 2698-707
- Kimura H, Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Tamura T, Nishio K (2007) Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor. *Cancer science* **98**(8): 1275-80
- Kirkwood JM, Ernstoff MS, Davis CA, Reiss M, Ferraresi R, Rudnick SA (1985) Comparison of intramuscular and intravenous recombinant alpha-2 interferon in melanoma and other cancers. *Annals of internal medicine* **103**(1): 32-6
- Kitamura H, Iwakabe K, Yahata T, Nishimura S, Ohta A, Ohmi Y, Sato M, Takeda K, Okumura K, Van Kaer L, Kawano T, Taniguchi M, Nishimura T (1999) The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *The Journal of experimental medicine* **189**(7): 1121-8

Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakan H, Yosef N, Linker RA, Muller DN, Hafler DA (2013) Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature* **496**(7446): 518-22

Kobayashi H, Tanaka Y, Shimmura H, Minato N, Tanabe K (2010) Complete remission of lung metastasis following adoptive immunotherapy using activated autologous gammadelta T-cells in a patient with renal cell carcinoma. *Anticancer research* **30**(2): 575-9

Kodumudi KN, Woan K, Gilvary DL, Sahakian E, Wei S, Djeu JY (2010) A novel chemoimmunomodulating property of docétaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**(18): 4583-94

Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, Smyth MJ, Schreiber RD (2007) Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* **450**(7171): 903-7

Koinis F, Vetsika EK, Aggouraki D, Skalidaki E, Koutoulaki A, Gkioulmpasani M, Georgoulas V, Kotsakis A (2016) Effect of First-Line Treatment on Myeloid-Derived Suppressor Cells' Subpopulations in the Peripheral Blood of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **11**(8): 1263-72

Kokkola R, Andersson A, Mullins G, Ostberg T, Treutiger CJ, Arnold B, Nawroth P, Andersson U, Harris RA, Harris HE (2005) RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scandinavian journal of immunology* **61**(1): 1-9

Korbelik M, Banath J, Sun J, Canals D, Hannun YA, Separovic D (2014) Ceramide and sphingosine-1-phosphate act as photodynamic therapy-elicited damage-associated molecular patterns: cell surface exposure. *International immunopharmacology* **20**(2): 359-65

Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK (2007) IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* **448**(7152): 484-7

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* **27**: 485-517

Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, Wei S, Zhang S, Pilon-Thomas S, Niu G, Kay H, Mule J, Kerr WG, Jove R, Pardoll D, Yu H (2005) Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nature medicine* **11**(12): 1314-21

Kroemer G, Senovilla L, Galluzzi L, Andre F, Zitvogel L (2015) Natural and therapy-induced immunosurveillance in breast cancer. *Nature medicine* **21**(10): 1128-38

Krueger J, Clark JD, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Cueto I, Wang CQ, Tan H, Wolk R, Rottinghaus ST, Whitley MZ, Valdez H, von Schack D, O'Neil SP, Reddy PS, Tatulych S, Investigators AS (2016) Tofacitinib attenuates pathologic immune pathways in patients with psoriasis: A randomized phase 2 study. *The Journal of allergy and clinical immunology* **137**(4): 1079-90

Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Huang E, Finlayson E, Simeone D, Welling TH, Chang A, Coukos G, Liu R, Zou W (2009) Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* **114**(6): 1141-9

Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P (2012) Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature reviews Cancer* **12**(12): 860-75

Ku GY, Yuan J, Page DB, Schroeder SE, Panageas KS, Carvajal RD, Chapman PB, Schwartz GK, Allison JP, Wolchok JD (2010) Single-institution experience with ipilimumab in advanced melanoma patients in the compassionate use setting: lymphocyte count after 2 doses correlates with survival. *Cancer* **116**(7): 1767-75

Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, Coudert B, Martin F, Chauffert B, Fumoleau P, Ghiringhelli F (2008) Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**(8): 2413-20

Ladoire S, Enot D, Andre F, Zitvogel L, Kroemer G (2016) Immunogenic cell death-related biomarkers: Impact on the survival of breast cancer patients after adjuvant chemotherapy. *Oncoimmunology* **5**(2): e1082706

Ladoire S, Mignot G, Dabakuyo S, Arnould L, Apetoh L, Rebe C, Coudert B, Martin F, Bizollon MH, Vanoli A, Coutant C, Fumoleau P, Bonnetain F, Ghiringhelli F (2011) In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. *The Journal of pathology* **224**(3): 389-400

Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, Ferrucci PF, Hill A, Wagstaff J, Carlino MS, Haanen JB, Maio M, Marquez-Rodas I, McArthur GA, Ascierto PA, Long GV, Callahan MK, Postow MA, Grossmann K, Sznol M, Dreno B, Bastholt L, Yang A, Rollin LM, Horak C, Hodi FS, Wolchok JD (2015) Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England journal of medicine* **373**(1): 23-34

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Bousiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ (2001) PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology* **2**(3): 261-8

Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Duffy SM, Goldberg RM, de la Chapelle A, Koshiji M, Bhaijee F, Hübner T, Hruban RH, Wood LD, Cuka N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Zhou S, Cornish TC, Taube JM, Anders RA, Eshleman JR, Vogelstein B, Diaz LA, Jr. (2015) PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *The New England journal of medicine* **372**(26): 2509-20

Le HK, Graham L, Cha E, Morales JK, Manjili MH, Bear HD (2009) Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. *International immunopharmacology* **9**(7-8): 900-9

Leach DR, Krummel MF, Allison JP (1996) Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* **271**(5256): 1734-6

LeCouter J, Zlot C, Tejada M, Peale F, Ferrara N (2004) Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(48): 16813-8

Legat A, Speiser DE, Pircher H, Zehn D, Fuertes Marraco SA (2013) Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than "Exhaustion" of Human CD8 T Cells. *Frontiers in immunology* **4**: 455

Leonard WJ, Spolski R (2005) Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nature reviews Immunology* **5**(9): 688-98

Lepore M, de Lalla C, Gundimeda SR, Gsellinger H, Consonni M, Garavaglia C, Sansano S, Piccolo F, Scelfo A, Haussinger D, Montagna D, Locatelli F, Bonini C, Bondanza A, Forcina A, Li Z, Ni G, Ciceri F, Jenö P, Xia C, Mori L, Dellabona P, Casorati G, De Libero G (2014) A novel self-lipid antigen targets human T cells against CD1c(+) leukemias. *The Journal of experimental medicine* **211**(7): 1363-77

Leporini C, Ammendola M, Marech I, Sammarco G, Sacco R, Gadaleta CD, Oakley C, Russo E, De Sarro G, Ranieri G (2015) Targeting mast cells in gastric cancer with special reference to bone metastases. *World journal of gastroenterology* **21**(37): 10493-501

Lesterhuis WJ, Salmons J, Nowak AK, Rozali EN, Khong A, Dick IM, Harken JA, Robinson BW, Lake RA (2013) Synergistic effect of CTLA-4 blockade and cancer chemotherapy in the induction of anti-tumor immunity. *PloS one* **8**(4): e61895

Li H, Ciric B, Yang J, Xu H, Fitzgerald DC, Elbehi M, Fonseca-Kelly Z, Yu S, Zhang GX, Rostami A (2009) Intravenous tolerance modulates macrophage classical activation and antigen presentation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* **208**(1-2): 54-60

Li JY, Duan XF, Wang LP, Xu YJ, Huang L, Zhang TF, Liu JY, Li F, Zhang Z, Yue DL, Wang F, Zhang B, Zhang Y (2014) Selective depletion of regulatory T cell subsets by docétaxel treatment in patients with nonsmall cell lung cancer. *Journal of immunology research* **2014**: 286170

Li L, Yang C, Zhao Z, Xu B, Zheng M, Zhang C, Min Z, Guo J, Rong R (2015) Skewed T-helper (Th)1/2- and Th17/T regulatory cell balances in patients with renal cell carcinoma. *Molecular medicine reports* **11**(2): 947-53

Li N, Wang Y, Forbes K, Vignali KM, Heale BS, Saftig P, Hartmann D, Black RA, Rossi JJ, Blobel CP, Dempsey PJ, Workman CJ, Vignali DA (2007) Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG-3. *The EMBO journal* **26**(2): 494-504

Li Z, Jiang J, Wang Z, Zhang J, Xiao M, Wang C, Lu Y, Qin Z (2008) Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. *Cancer research* **68**(21): 8687-94

Liakou CI, Kamat A, Tang DN, Chen H, Sun J, Troncoso P, Logothetis C, Sharma P (2008) CTLA-4 blockade increases IFN γ -producing CD4⁺ICOS^{hi} cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(39): 14987-92

Limagne E, Euvrard R, Thibaudin M, Rebe C, Derangere V, Chevriaux A, Boidot R, Vegran F, Bonnefoy N, Vincent J, Bengrine-Lefevre L, Ladoire S, Delmas D, Apetoh L, Ghiringhelli F (2016a) Accumulation of MDSC and Th17 Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Predicts the Efficacy of a FOLFOX-Bevacizumab Drug Treatment Regimen. *Cancer research* **76**(18): 5241-52

Limagne E, Lancon A, Delmas D, Cherkaoui-Malki M, Latruffe N (2016b) Resveratrol Interferes with IL1-beta-Induced Pro-Inflammatory Paracrine Interaction between Primary Chondrocytes and Macrophages. *Nutrients* **8**(5)

Lin DC, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY (2002) Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry* **277**(22): 19276-80

- Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R (1994) Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* **1**(9): 793-801
- Liu FT, Rabinovich GA (2005) Galectins as modulators of tumour progression. *Nature reviews Cancer* **5**(1): 29-41
- Liu J, Duan Y, Cheng X, Chen X, Xie W, Long H, Lin Z, Zhu B (2011) IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications* **407**(2): 348-54
- Liu WM, Fowler DW, Smith P, Dalgleish AG (2010) Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses. *British journal of cancer* **102**(1): 115-23
- Lob S, Konigsrainer A, Rammensee HG, Opelz G, Terness P (2009) Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? *Nature reviews Cancer* **9**(6): 445-52
- Lotze MT, Chang AE, Seipp CA, Simpson C, Vetto JT, Rosenberg SA (1986) High-dose recombinant interleukin 2 in the treatment of patients with disseminated cancer. Responses, treatment-related morbidity, and histologic findings. *Jama* **256**(22): 3117-24
- Lozano E, Dominguez-Villar M, Kuchroo V, Hafler DA (2012) The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function. *Journal of immunology* **188**(8): 3869-75
- Lu Y, Hong S, Li H, Park J, Hong B, Wang L, Zheng Y, Liu Z, Xu J, He J, Yang J, Qian J, Yi Q (2012) Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *The Journal of clinical investigation* **122**(11): 4160-71
- Lv L, Pan K, Li XD, She KL, Zhao JJ, Wang W, Chen JG, Chen YB, Yun JP, Xia JC (2011) The accumulation and prognosis value of tumor infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma. *PloS one* **6**(3): e18219
- Ma Y, Adjemian S, Yang H, Catani JP, Hannani D, Martins I, Michaud M, Kepp O, Sukkurwala AQ, Vacchelli E, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G (2013) ATP-dependent recruitment, survival and differentiation of dendritic cell precursors in the tumor bed after anticancer chemotherapy. *Oncoimmunology* **2**(6): e24568
- Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E (2013) The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *European journal of immunology* **43**(11): 2797-809
- Maleckar JR, Sherman LA (1987) The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice. *Journal of immunology* **138**(11): 3873-6
- Maniati E, Hagemann T (2013) IL-17 mediates resistance to anti-VEGF therapy. *Nature medicine* **19**(9): 1092-4
- Markiewski MM, DeAngelis RA, Benencia F, Ricklin-Lichtsteiner SK, Koutoulaki A, Gerard C, Coukos G, Lambris JD (2008) Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nature immunology* **9**(11): 1225-35
- Martin F, Apetoh L, Ghiringhelli F (2012) Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF-beta-dependent immunosuppressive activity? *Trends in molecular medicine* **18**(12): 742-9
- Martins I, Wang Y, Michaud M, Ma Y, Sukkurwala AQ, Shen S, Kepp O, Metivier D, Galluzzi L, Perfettini JL, Zitvogel L, Kroemer G (2014) Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. *Cell death and differentiation* **21**(1): 79-91

- Matsuzaki J, Gnjatic S, Mhawech-Fauceglia P, Beck A, Miller A, Tsuji T, Eppolito C, Qian F, Lele S, Shrikant P, Old LJ, Odunsi K (2010) Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(17): 7875-80
- Matzinger P (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology* **12**: 991-1045
- Medrek C, Ponten F, Jirstrom K, Leandersson K (2012) The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC cancer* **12**: 306
- Mesquida M, Leszczynska A, Llorenc V, Adan A (2014) Interleukin-6 blockade in ocular inflammatory diseases. *Clinical and experimental immunology* **176**(3): 301-9
- Meyer C, Cagnon L, Costa-Nunes CM, Baumgaertner P, Montandon N, Leyvraz L, Michielin O, Romano E, Speiser DE (2014) Frequencies of circulating MDSC correlate with clinical outcome of melanoma patients treated with ipilimumab. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **63**(3): 247-57
- Michaud M, Sukkurwala AQ, Martins I, Shen S, Zitvogel L, Kroemer G (2012) Subversion of the chemotherapy-induced anticancer immune response by the ecto-ATPase CD39. *Oncoimmunology* **1**(3): 393-395
- Mlecnik B, Tosolini M, Charoentong P, Kirilovsky A, Bindea G, Berger A, Camus M, Gillard M, Bruneval P, Fridman WH, Pages F, Trajanoski Z, Galon J (2010) Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* **138**(4): 1429-40
- Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, De Palma A, Mauri P, Monegal A, Rescigno M, Savino B, Colombo P, Jonjic N, Pecanic S, Lazzarato L, Fruttero R, Gasco A, Bronte V, Viola A (2011) Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *The Journal of experimental medicine* **208**(10): 1949-62
- Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, Manning S, Greenfield EA, Coyle AJ, Sobel RA, Freeman GJ, Kuchroo VK (2002) Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* **415**(6871): 536-41
- Monteleone I, Rizzo A, Sarra M, Sica G, Sileri P, Biancone L, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G (2011) Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **141**(1): 237-48, 248 e1
- Moretta A (2002) Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nature reviews Immunology* **2**(12): 957-64
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology* **136**(7): 2348-57
- Motz GT, Coukos G (2011) The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales. *Nature reviews Immunology* **11**(10): 702-11
- Motz GT, Santoro SP, Wang LP, Garrabrant T, Lastra RR, Hagemann IS, Lal P, Feldman MD, Benencia F, Coukos G (2014) Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nature medicine* **20**(6): 607-15

- Mukasa R, Balasubramani A, Lee YK, Whitley SK, Weaver BT, Shibata Y, Crawford GE, Hatton RD, Weaver CT (2010) Epigenetic instability of cytokine and transcription factor gene loci underlies plasticity of the T helper 17 cell lineage. *Immunity* **32**(5): 616-27
- Muller-Hermelink N, Braumuller H, Pichler B, Wieder T, Mailhammer R, Schaak K, Ghoreschi K, Yazdi A, Haubner R, Sander CA, Mocikat R, Schwaiger M, Forster I, Huss R, Weber WA, Kneilling M, Rocken M (2008) TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer cell* **13**(6): 507-18
- Muranski P, Restifo NP (2013) Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* **121**(13): 2402-14
- Nagaraj S, Youn JI, Gabrilovich DI (2013) Reciprocal relationship between myeloid-derived suppressor cells and T cells. *Journal of immunology* **191**(1): 17-23
- Nakata B, Wang YQ, Yashiro M, Nishioka N, Tanaka H, Ohira M, Ishikawa T, Nishino H, Hirakawa K (2002) Prognostic value of microsatellite instability in resectable pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **8**(8): 2536-40
- Narita Y, Wakita D, Ohkur T, Chamoto K, Nishimura T (2009) Potential differentiation of tumor bearing mouse CD11b+Gr-1+ immature myeloid cells into both suppressor macrophages and immunostimulatory dendritic cells. *Biomedical research* **30**(1): 7-15
- Nefedova Y, Cheng P, Gilkes D, Blaskovich M, Beg AA, Sebt SM, Gabrilovich DI (2005) Activation of dendritic cells via inhibition of Jak2/STAT3 signaling. *Journal of immunology* **175**(7): 4338-46
- Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, Bhattacharya R, Cheng P, Salup R, Jove R, Gabrilovich D (2004) Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *Journal of immunology* **172**(1): 464-74
- Nie Y, Erion DM, Yuan Z, Dietrich M, Shulman GI, Horvath TL, Gao Q (2009) STAT3 inhibition of gluconeogenesis is downregulated by SirT1. *Nature cell biology* **11**(4): 492-500
- Nirschl CJ, Drake CG (2013) Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**(18): 4917-24
- Nishimura H, Minato N, Nakano T, Honjo T (1998) Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *International immunology* **10**(10): 1563-72
- Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, Bronte V, Chouaib S (2014) PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *The Journal of experimental medicine* **211**(5): 781-90
- Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Metivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G (2007) Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature medicine* **13**(1): 54-61
- Oberg HH, Peipp M, Kellner C, Sebens S, Krause S, Petrick D, Adam-Klages S, Rocken C, Becker T, Vogel I, Weisner D, Freitag-Wolf S, Gramatzki M, Kabelitz D, Wesch D (2014) Novel bispecific antibodies increase gammadelta T-cell cytotoxicity against pancreatic cancer cells. *Cancer research* **74**(5): 1349-60

Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC (2007) Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**(2 Pt 2): 721s-726s

Ogino S, Nosho K, Irahara N, Meyerhardt JA, Baba Y, Shima K, Glickman JN, Ferrone CR, Mino-Kenudson M, Tanaka N, Dranoff G, Giovannucci EL, Fuchs CS (2009) Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**(20): 6412-20

Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T (2013) A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nature immunology* **14**(12): 1212-8

Old LJ, Boyse EA (1964) Immunology of Experimental Tumors. *Annual review of medicine* **15**: 167-86

Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* **13**(5): 715-25

Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J (2005) Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *The New England journal of medicine* **353**(25): 2654-66

Pak AS, Wright MA, Matthews JP, Collins SL, Petruzzelli GJ, Young MR (1995) Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **1**(1): 95-103

Pamment J, Ramsay E, Kelleher M, Dornan D, Ball KL (2002) Regulation of the IRF-1 tumour modifier during the response to genotoxic stress involves an ATM-dependent signalling pathway. *Oncogene* **21**(51): 7776-85

Pan PY, Wang GX, Yin B, Ozao J, Ku T, Divino CM, Chen SH (2008) Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood* **111**(1): 219-28

Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund AC, Chapman DC, Durchschlag M, Joza N, Pierron G, van Endert P, Yuan J, Zitvogel L, Madeo F, Williams DB, Kroemer G (2009) Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *The EMBO journal* **28**(5): 578-90

Panni RZ, Sanford DE, Belt BA, Mitchem JB, Worley LA, Goetz BD, Mukherjee P, Wang-Gillam A, Link DC, Denardo DG, Goedegebuure SP, Linehan DC (2014) Tumor-induced STAT3 activation in monocytic myeloid-derived suppressor cells enhances stemness and mesenchymal properties in human pancreatic cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **63**(5): 513-28

Pantelouris EM (1968) Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* **217**(5126): 370-1

Pardoll D (2003) Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annual review of immunology* **21**: 807-39

Park JM, Terabe M, Sakai Y, Munasinghe J, Forni G, Morris JC, Berzofsky JA (2005) Early role of CD4+ Th1 cells and antibodies in HER-2 adenovirus vaccine protection against autochthonous mammary carcinomas. *Journal of immunology* **174**(7): 4228-36

Parsa AT, Waldron JS, Panner A, Crane CA, Parney IF, Barry JJ, Cachola KE, Murray JC, Tihan T, Jensen MC, Mischel PS, Stokoe D, Pieper RO (2007) Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nature medicine* **13**(1): 84-8

Perez SA, Karamouzis MV, Skarlos DV, Ardavanis A, Sotiriadou NN, Iliopoulou EG, Salagianni ML, Orphanos G, Baxevanis CN, Rigatos G, Papamichail M (2007) CD4+CD25+ regulatory T-cell frequency in HER-2/neu (HER)-positive and HER-negative advanced-stage breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**(9): 2714-21

Pestov NA, Gerasimova NS, Kulaeva OI, Studitsky VM (2015) Structure of transcribed chromatin is a sensor of DNA damage. *Science advances* **1**(6): e1500021

Pfannenstiel LW, Lam SS, Emens LA, Jaffee EM, Armstrong TD (2010) Paclitaxel enhances early dendritic cell maturation and function through TLR4 signaling in mice. *Cellular immunology* **263**(1): 79-87

Pfirschke C, Engblom C, Rickelt S, Cortez-Retamozo V, Garris C, Pucci F, Yamazaki T, Poirier-Colame V, Newton A, Redouane Y, Lin YJ, Wojtkiewicz G, Iwamoto Y, Mino-Kenudson M, Huynh TG, Hynes RO, Freeman GJ, Kroemer G, Zitvogel L, Weissleder R, Pittet MJ (2016) Immunogenic Chemotherapy Sensitizes Tumors to Checkpoint Blockade Therapy. *Immunity* **44**(2): 343-54

Pollard JW (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews Cancer* **4**(1): 71-8

Poschke I, Mougiakakos D, Hansson J, Masucci GV, Kiessling R (2010) Immature immunosuppressive CD14+HLA-DR-/low cells in melanoma patients are Stat3hi and overexpress CD80, CD83, and DC-sign. *Cancer research* **70**(11): 4335-45

Purwar R, Schlapbach C, Xiao S, Kang HS, Elyaman W, Jiang X, Jetten AM, Khoury SJ, Fuhlbrigge RC, Kuchroo VK, Clark RA, Kupper TS (2012) Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nature medicine* **18**(8): 1248-53

Pylayeva-Gupta Y, Lee KE, Hajdu CH, Miller G, Bar-Sagi D (2012) Oncogenic Kras-induced GM-CSF production promotes the development of pancreatic neoplasia. *Cancer cell* **21**(6): 836-47

Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Baker J, Jeffery LE, Kaur S, Briggs Z, Hou TZ, Futter CE, Anderson G, Walker LS, Sansom DM (2011) Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* **332**(6029): 600-3

Raber PL, Thevenot P, Sierra R, Wyczechowska D, Halle D, Ramirez ME, Ochoa AC, Fletcher M, Velasco C, Wilk A, Reiss K, Rodriguez PC (2014) Subpopulations of myeloid-derived suppressor cells impair T cell responses through independent nitric oxide-related pathways. *International journal of cancer Journal international du cancer* **134**(12): 2853-64

Raffaghello L, Lee C, Safdie FM, Wei M, Madia F, Bianchi G, Longo VD (2008) Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(24): 8215-20

Raffaghello L, Safdie F, Bianchi G, Dorff T, Fontana L, Longo VD (2010) Fasting and differential chemotherapy protection in patients. *Cell cycle* **9**(22): 4474-6

- Rincon-Orozco B, Kunzmann V, Wrobel P, Kabelitz D, Steinle A, Herrmann T (2005) Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *Journal of immunology* **175**(4): 2144-51
- Ritprajak P, Azuma M (2015) Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral oncology* **51**(3): 221-8
- Rizvi NA, Hellmann MD, Brahmer JR, Juergens RA, Borghaei H, Gettinger S, Chow LQ, Gerber DE, Laurie SA, Goldman JW, Shepherd FA, Chen AC, Shen Y, Nathan FE, Harbison CT, Antonia S (2016) Nivolumab in Combination With Platinum-Based Doublet Chemotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **34**(25): 2969-79
- Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, Miller ML, Rekhtman N, Moreira AL, Ibrahim F, Bruggeman C, Gasmi B, Zappasodi R, Maeda Y, Sander C, Garon EB, Merghoub T, Wolchok JD, Schumacher TN, Chan TA (2015) Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* **348**(6230): 124-8
- Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, Lebbe C, Baurain JF, Testori A, Grob JJ, Davidson N, Richards J, Maio M, Hauschild A, Miller WH, Jr., Gascon P, Lotem M, Harmankaya K, Ibrahim R, Francis S, Chen TT, Humphrey R, Hoos A, Wolchok JD (2011) Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* **364**(26): 2517-26
- Robert L, Tsoi J, Wang X, Emerson R, Homet B, Chodon T, Mok S, Huang RR, Cochran AJ, Comin-Anduix B, Koya RC, Graeber TG, Robins H, Ribas A (2014) CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**(9): 2424-32
- Robertson FC, Berzofsky JA, Terabe M (2014) NKT cell networks in the regulation of tumor immunity. *Frontiers in immunology* **5**: 543
- Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC (2007a) L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* **109**(4): 1568-73
- Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, Zabaleta J, Ochoa JB, Ochoa AC (2002) Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *The Journal of biological chemistry* **277**(24): 21123-9
- Rodriguez T, Mendez R, Del Campo A, Jimenez P, Aptsiauri N, Garrido F, Ruiz-Cabello F (2007b) Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. *BMC cancer* **7**: 34
- Rody A, Holtrich U, Pusztai L, Liedtke C, Gaetje R, Ruckhaeberle E, Solbach C, Hankaer L, Ahr A, Metzler D, Engels K, Karn T, Kaufmann M (2009) T-cell metagene predicts a favorable prognosis in estrogen receptor-negative and HER2-positive breast cancers. *Breast cancer research : BCR* **11**(2): R15
- Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacohen N (2015) Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell* **160**(1-2): 48-61
- Roselli M, Cereda V, di Bari MG, Formica V, Spila A, Jochems C, Farsaci B, Donahue R, Gulley JL, Schlom J, Guadagni F (2013) Effects of conventional therapeutic interventions on the number and function of regulatory T cells. *Oncoimmunology* **2**(10): e27025
- Roselli M, Formica V, Cereda V, Jochems C, Richards J, Grenga I, Orlandi A, Ferroni P, Guadagni F, Schlom J (2016) The association of clinical outcome and peripheral T-cell subsets

in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line FOLFIRI plus bevacizumab therapy. *Oncoimmunology* **5**(7): e1188243

Roth S, Droge W (1991) Regulation of interleukin 2 production, interleukin 2 mRNA expression and intracellular glutathione levels in ex vivo derived T lymphocytes by lactate. *European journal of immunology* **21**(8): 1933-7

Roth S, Gmunder H, Droge W (1991) Regulation of intracellular glutathione levels and lymphocyte functions by lactate. *Cellular immunology* **136**(1): 95-104

Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer OL, Rabinovich GA (2004) Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer cell* **5**(3): 241-51

Rudd CE, Taylor A, Schneider H (2009) CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological reviews* **229**(1): 12-26

Rygaard J, Povlsen CO (1974) The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica Section B: Microbiology and immunology* **82**(1): 99-106

Sad S, Marcotte R, Mosmann TR (1995) Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* **2**(3): 271-9

Safdie FM, Dorff T, Quinn D, Fontana L, Wei M, Lee C, Cohen P, Longo VD (2009) Fasting and cancer treatment in humans: A case series report. *Aging* **1**(12): 988-1007

Saggini A, Chimenti S, Chiricozzi A (2014) IL-6 as a druggable target in psoriasis: focus on pustular variants. *Journal of immunology research* **2014**: 964069

Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC (2010) Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *The Journal of experimental medicine* **207**(10): 2187-94

Sakuishi K, Jayaraman P, Behar SM, Anderson AC, Kuchroo VK (2011) Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity. *Trends in immunology* **32**(8): 345-9

Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzen F, Cassidy J (2008) Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**(12): 2013-9

Sanchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, Domenig C, Zheng XX, Sabatos CA, Manlongat N, Bender O, Kamradt T, Kuchroo VK, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ, Strom TB (2003) Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nature immunology* **4**(11): 1093-101

Sarhan D, Cichocki F, Zhang B, Yingst A, Spellman SR, Cooley S, Verneris MR, Blazar BR, Miller JS (2016) Adaptive NK Cells with Low TIGIT Expression Are Inherently Resistant to Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer research* **76**(19): 5696-5706

Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**(6894): 191-5

Schaerli P, Willmann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B (2000) CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *The Journal of experimental medicine* **192**(11): 1553-62

- Schafer PH, Chen P, Fang L, Wang A, Chopra R (2015) The pharmacodynamic impact of apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, on circulating levels of inflammatory biomarkers in patients with psoriatic arthritis: substudy results from a phase III, randomized, placebo-controlled trial (PALACE 1). *Journal of immunology research* **2015**: 906349
- Schenk S, McCurdy CE, Philp A, Chen MZ, Holliday MJ, Bandyopadhyay GK, Osborn O, Baar K, Olefsky JM (2011) Sirt1 enhances skeletal muscle insulin sensitivity in mice during caloric restriction. *The Journal of clinical investigation* **121**(11): 4281-8
- Schilling B, Sucker A, Griewank K, Zhao F, Weide B, Gorgens A, Giebel B, Schadendorf D, Paschen A (2013) Vemurafenib reverses immunosuppression by myeloid derived suppressor cells. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* **133**(7): 1653-63
- Schiraldi M, Raucci A, Munoz LM, Livoti E, Celona B, Venereau E, Apuzzo T, De Marchis F, Pedotti M, Bachi A, Thelen M, Varani L, Mellado M, Proudfoot A, Bianchi ME, Uguccioni M (2012) HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *The Journal of experimental medicine* **209**(3): 551-63
- Schreck S, Friebel D, Buettner M, Distel L, Grabenbauer G, Young LS, Niedobitek G (2009) Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematological oncology* **27**(1): 31-9
- Sega EI, Leveson-Gower DB, Florek M, Schneidawind D, Luong RH, Negrin RS (2014) Role of lymphocyte activation gene-3 (Lag-3) in conventional and regulatory T cell function in allogeneic transplantation. *PLoS one* **9**(1): e86551
- Senovilla L, Aranda F, Galluzzi L, Kroemer G (2014) Impact of myeloid cells on the efficacy of anticancer chemotherapy. *Current opinion in immunology* **30**: 24-31
- Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, Xu L, Thoburn CJ, DeMarzo AM, Meeker AK, Isaacs WB, Drake CG (2008) Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**(11): 3254-61
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD (2001) IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**(6832): 1107-11
- Sheng J, Fang W, Yu J, Chen N, Zhan J, Ma Y, Yang Y, Yanhuang, Zhao H, Zhang L (2016) Expression of programmed death ligand-1 on tumor cells varies pre and post chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Scientific reports* **6**: 20090
- Shi LZ, Wang R, Huang G, Vogel P, Neale G, Green DR, Chi H (2011) HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *The Journal of experimental medicine* **208**(7): 1367-76
- Shimizu K, Hidaka M, Kadowaki N, Makita N, Konishi N, Fujimoto K, Uchiyama T, Kawano F, Taniguchi M, Fujii S (2006) Evaluation of the function of human invariant NKT cells from cancer patients using alpha-galactosylceramide-loaded murine dendritic cells. *Journal of immunology* **177**(5): 3484-92
- Shojaei F, Wu X, Zhong C, Yu L, Liang XH, Yao J, Blanchard D, Bais C, Peale FV, van Bruggen N, Ho C, Ross J, Tan M, Carano RA, Meng YG, Ferrara N (2007) Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis. *Nature* **450**(7171): 825-31
- Shu S, Rosenberg SA (1985) Adoptive immunotherapy of a newly induced sarcoma: immunologic characteristics of effector cells. *Journal of immunology* **135**(4): 2895-903

Shurin MR (2013) Dual role of immunomodulation by anticancer chemotherapy. *Nature medicine* **19**(1): 20-2

Sica A, Bronte V (2007) Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *The Journal of clinical investigation* **117**(5): 1155-66

Siddle HV, Kreiss A, Tovar C, Yuen CK, Cheng Y, Belov K, Swift K, Pearse AM, Hamede R, Jones ME, Skjodt K, Woods GM, Kaufman J (2013) Reversible epigenetic down-regulation of MHC molecules by devil facial tumour disease illustrates immune escape by a contagious cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**(13): 5103-8

Simeone E, Gentilcore G, Giannarelli D, Grimaldi AM, Caraco C, Curvietto M, Esposito A, Paone M, Palla M, Cavalcanti E, Sandomenico F, Petrillo A, Botti G, Fulciniti F, Palmieri G, Queirolo P, Marchetti P, Ferraresi V, Rinaldi G, Pistillo MP, Ciliberto G, Mozzillo N, Ascierto PA (2014) Immunological and biological changes during ipilimumab treatment and their potential correlation with clinical response and survival in patients with advanced melanoma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **63**(7): 675-83

Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G (2008) Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology* **181**(7): 4666-75

Sisirak V, Faget J, Gobert M, Goutagny N, Vey N, Treilleux I, Renaudineau S, Poyet G, Labidi-Galy SI, Goddard-Leon S, Durand I, Le Mercier I, Bajard A, Bachelot T, Puisieux A, Puisieux I, Blay JY, Menetrier-Caux C, Caux C, Bendriss-Vermare N (2012) Impaired IFN- α production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. *Cancer research* **72**(20): 5188-97

Sistigu A, Yamazaki T, Vacchelli E, Chaba K, Enot DP, Adam J, Vitale I, Goubar A, Baracco EE, Remedios C, Fend L, Hannani D, Aymeric L, Ma Y, Niso-Santano M, Kepp O, Schultze JL, Tuting T, Belardelli F, Bracci L, La Sorsa V, Ziccheddu G, Sestili P, Urbani F, Delorenzi M, Lacroix-Triki M, Quidville V, Conforti R, Spano JP, Pusztai L, Poirier-Colame V, Delaloge S, Penault-Llorca F, Ladoire S, Arnould L, Cyrta J, Dessoliers MC, Eggermont A, Bianchi ME, Pittet M, Engblom C, Pfirschke C, Preville X, Uze G, Schreiber RD, Chow MT, Smyth MJ, Proietti E, Andre F, Kroemer G, Zitvogel L (2014) Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nature medicine* **20**(11): 1301-9

Smyth MJ, Crowe NY, Pellicci DG, Kyparissoudis K, Kelly JM, Takeda K, Yagita H, Godfrey DI (2002) Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood* **99**(4): 1259-66

Smyth MJ, Wallace ME, Nutt SL, Yagita H, Godfrey DI, Hayakawa Y (2005) Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy of cancer. *The Journal of experimental medicine* **201**(12): 1973-85

Sparmann A, Bar-Sagi D (2004) Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer cell* **6**(5): 447-58

Spigel DR, Ervin TJ, Ramlau RA, Daniel DB, Goldschmidt JH, Jr., Blumenschein GR, Jr., Krzakowski MJ, Robinet G, Godbert B, Barlesi F, Govindan R, Patel T, Orlov SV, Wertheim MS, Yu W, Zha J, Yauch RL, Patel PH, Phan SC, Peterson AC (2013) Randomized phase II trial of Onartuzumab in combination with erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**(32): 4105-14

- Spranger S, Bao R, Gajewski TF (2015) Melanoma-intrinsic beta-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* **523**(7559): 231-5
- Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S (2010) Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer research* **70**(1): 68-77
- Stassen M, Schmitt E, Bopp T (2012) From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1247**: 56-68
- Stassi G, Todaro M, Zerilli M, Ricci-Vitiani L, Di Liberto D, Patti M, Florena A, Di Gaudio F, Di Gesu G, De Maria R (2003) Thyroid cancer resistance to chemotherapeutic drugs via autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10. *Cancer research* **63**(20): 6784-90
- Staudt V, Bothur E, Klein M, Lingnau K, Reuter S, Grebe N, Gerlitzki B, Hoffmann M, Ulges A, Taube C, Dehzad N, Becker M, Stassen M, Steinborn A, Lohoff M, Schild H, Schmitt E, Bopp T (2010) Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity* **33**(2): 192-202
- Stromnes IM, Greenberg PD, Hingorani SR (2014) Molecular pathways: myeloid complicity in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**(20): 5157-70
- Stutman O (1974) Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* **183**(4124): 534-6
- Stutman O (1975) Immunodepression and malignancy. *Advances in cancer research* **22**: 261-422
- Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM (2005) Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**(18): 6713-21
- Suzuki S, Ichikawa Y, Nakagawa K, Kumamoto T, Mori R, Matsuyama R, Takeda K, Ota M, Tanaka K, Tamura T, Endo I (2015) High infiltration of mast cells positive to tryptase predicts worse outcome following resection of colorectal liver metastases. *BMC cancer* **15**: 840
- Tada K, Kitano S, Shoji H, Nishimura T, Shimada Y, Nagashima K, Aoki K, Hiraoka N, Honma Y, Iwasa S, Okita N, Takashima A, Kato K, Yamada Y, Katayama N, Boku N, Heike Y, Hamaguchi T (2016) Pretreatment Immune Status Correlates with Progression-Free Survival in Chemotherapy-Treated Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Cancer immunology research* **4**(7): 592-9
- Takahashi H, Feuerhake F, Kutok JL, Monti S, Dal Cin P, Neuberg D, Aster JC, Shipp MA (2006) FAS death domain deletions and cellular FADD-like interleukin 1beta converting enzyme inhibitory protein (long) overexpression: alternative mechanisms for deregulating the extrinsic apoptotic pathway in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**(11 Pt 1): 3265-71
- Talmadge JE, Gabilovich DI (2013) History of myeloid-derived suppressor cells. *Nature reviews Cancer* **13**(10): 739-52
- Tang ML, Khan MK, Croxford JL, Tan KW, Angeli V, Gasser S (2014) The DNA damage response induces antigen presenting cell-like functions in fibroblasts. *European journal of immunology* **44**(4): 1108-18

- Tarhini AA, Edington H, Butterfield LH, Lin Y, Shuai Y, Tawbi H, Sander C, Yin Y, Holtzman M, Johnson J, Rao UN, Kirkwood JM (2014) Immune monitoring of the circulation and the tumor microenvironment in patients with regionally advanced melanoma receiving neoadjuvant ipilimumab. *PLoS one* **9**(2): e87705
- Teng MW, Vesely MD, Duret H, McLaughlin N, Towne JE, Schreiber RD, Smyth MJ (2012) Opposing roles for IL-23 and IL-12 in maintaining occult cancer in an equilibrium state. *Cancer research* **72**(16): 3987-96
- Teo WY, Elghetany MT, Shen J, Man TK, Li X, Chintagumpala M, Su JM, Dauser R, Whitehead W, Adesina AM, Lau CC (2014) Therapeutic implications of CD1d expression and tumor-infiltrating macrophages in pediatric medulloblastomas. *Journal of neuro-oncology* **120**(2): 293-301
- Terabe M, Berzofsky JA (2008) The role of NKT cells in tumor immunity. *Advances in cancer research* **101**: 277-348
- Terabe M, Matsui S, Park JM, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Chen W, Wahl SM, Ledbetter S, Pratt B, Letterio JJ, Paul WE, Berzofsky JA (2003) Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *The Journal of experimental medicine* **198**(11): 1741-52
- Teschendorff AE, Gomez S, Arenas A, El-Ashry D, Schmidt M, Gehrman M, Caldas C (2010) Improved prognostic classification of breast cancer defined by antagonistic activation patterns of immune response pathway modules. *BMC cancer* **10**: 604
- Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, Kepp O, Martins I, Ghiringhelli F, Aymeric L, Michaud M, Apetoh L, Barault L, Mendiboure J, Pignon JP, Jooste V, van Endert P, Ducreux M, Zitvogel L, Piard F, Kroemer G (2010) Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* **29**(4): 482-91
- Thibaudin M, Chaix M, Boidot R, Vegran F, Derangere V, Limagne E, Berger H, Ladoire S, Apetoh L, Ghiringhelli F (2016) Human ectonucleotidase-expressing CD25^{high} Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions. *Oncoimmunology* **5**(1): e1055444
- Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, Berger A, Bruneval P, Fridman WH, Pages F, Galon J (2011) Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer research* **71**(4): 1263-71
- Traverso I, Fenoglio D, Negrini S, Parodi A, Battaglia F, Kalli F, Conteduca G, Tardito S, Traverso P, Indiveri F, Filaci G (2012) Cyclophosphamide inhibits the generation and function of CD8(+) regulatory T cells. *Human immunology* **73**(3): 207-13
- Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, Bremond A, Goddard S, Pin JJ, Barthelemy-Dubois C, Lebecque S (2004) Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**(22): 7466-74
- Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, Hercend T (1990) LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *The Journal of experimental medicine* **171**(5): 1393-405
- Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA (2003) The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* **19**(5): 641-4

- Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, Kivork C, Seja E, Cherry G, Gutierrez AJ, Grogan TR, Mateus C, Tomasic G, Glaspy JA, Emerson RO, Robins H, Pierce RH, Elashoff DA, Robert C, Ribas A (2014) PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**(7528): 568-71
- Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ (2003) Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature medicine* **9**(10): 1269-74
- Vacchelli E, Galluzzi L, Rousseau V, Rigoni A, Tesniere A, Delahaye N, Schlemmer FD, Menger L, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Martins I, Michaud M, Dunant A, Kepp O, Brambilla E, Soria JC, Zitvogel L, Kroemer G (2012) Loss-of-function alleles of P2RX7 and TLR4 fail to affect the response to chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* **1**(3): 271-278
- van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**(5038): 1643-7
- van Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP (1999) Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *The Journal of experimental medicine* **190**(3): 355-66
- Vegran F, Berger H, Boidot R, Mignot G, Bruchard M, Dosset M, Chalmin F, Rebe C, Derangere V, Ryffel B, Kato M, Prevost-Blondel A, Ghiringhelli F, Apetoh L (2014) The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. *Nature immunology* **15**(8): 758-66
- Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C, Stockinger B (2008) Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature immunology* **9**(12): 1341-6
- Villablanca EJ, Raccosta L, Zhou D, Fontana R, Maggioni D, Negro A, Sanvito F, Ponzoni M, Valentinis B, Bregni M, Prinetti A, Steffensen KR, Sonnino S, Gustafsson JA, Doglioni C, Bordignon C, Traversari C, Russo V (2010) Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nature medicine* **16**(1): 98-105
- Villarino AV, Gallo E, Abbas AK (2010) STAT1-activating cytokines limit Th17 responses through both T-bet-dependent and -independent mechanisms. *Journal of immunology* **185**(11): 6461-71
- Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, Martin F, Apetoh L, Rebe C, Ghiringhelli F (2010) 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer research* **70**(8): 3052-61
- Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Pernot S, Nizard M, Pointet AL, Latreche S, Bergaya S, Benhamouda N, Tanchot C, Stockmann C, Combe P, Berger A, Zinzindohoue F, Yagita H, Tartour E, Taieb J, Terme M (2015) VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *The Journal of experimental medicine* **212**(2): 139-48

- Wan S, Pestka S, Jubin RG, Lyu YL, Tsai YC, Liu LF (2012) Chemotherapeutics and radiation stimulate MHC class I expression through elevated interferon-beta signaling in breast cancer cells. *PLoS one* **7**(3): e32542
- Wang L, Rubinstein R, Lines JL, Wasiuk A, Ahonen C, Guo Y, Lu LF, Gondek D, Wang Y, Fava RA, Fiser A, Almo S, Noelle RJ (2011) VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. *The Journal of experimental medicine* **208**(3): 577-92
- Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H (2009) IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *The Journal of experimental medicine* **206**(7): 1457-64
- Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, Yang J, Fallarino F, Loftin SK, Hurchla MA, Zimmerman N, Sim J, Zang X, Murphy TL, Russell JH, Allison JP, Murphy KM (2003) BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nature immunology* **4**(7): 670-9
- Weide B, Zelba H, Derhovanessian E, Pflugfelder A, Eigentler TK, Di Giacomo AM, Maio M, Aarntzen EH, de Vries IJ, Sucker A, Schadendorf D, Buttner P, Garbe C, Pawelec G (2012) Functional T cells targeting NY-ESO-1 or Melan-A are predictive for survival of patients with distant melanoma metastasis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**(15): 1835-41
- Wheelock EF (1965) Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin. *Science* **149**(3681): 310-1
- Woo SR, Li N, Bruno TC, Forbes K, Brown S, Workman C, Drake CG, Vignali DA (2010) Differential subcellular localization of the regulatory T-cell protein LAG-3 and the coreceptor CD4. *European journal of immunology* **40**(6): 1768-77
- Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ, Bettini ML, Gravano DM, Vogel P, Liu CL, Tansombatvisit S, Grosso JF, Netto G, Smeltzer MP, Chaux A, Utz PJ, Workman CJ, Pardoll DM, Korman AJ, Drake CG, Vignali DA (2012) Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer research* **72**(4): 917-27
- Workman CJ, Dugger KJ, Vignali DA (2002) Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3. *Journal of immunology* **169**(10): 5392-5
- Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA (2007) Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**(18 Pt 1): 5262-70
- Wu C, Yosef N, Thalhamer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, Regev A, Kuchroo VK (2013a) Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* **496**(7446): 513-7
- Wu X, Peng M, Huang B, Zhang H, Wang H, Huang B, Xue Z, Zhang L, Da Y, Yang D, Yao Z, Zhang R (2013b) Immune microenvironment profiles of tumor immune equilibrium and immune escape states of mouse sarcoma. *Cancer letters* **340**(1): 124-33
- Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, Fingleton B, Green-Jarvis B, Shyr Y, Matrisian LM, Carbone DP, Lin PC (2004) Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer cell* **6**(4): 409-21
- Yang L, Pang Y, Moses HL (2010) TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in immunology* **31**(6): 220-7
- Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C (2008) T helper 17 lineage

differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* **28**(1): 29-39

Yang XP, Ghoreschi K, Steward-Tharp SM, Rodriguez-Canales J, Zhu J, Grainger JR, Hirahara K, Sun HW, Wei L, Vahedi G, Kanno Y, O'Shea JJ, Laurence A (2011) Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nature immunology* **12**(3): 247-54

Yoon NK, Maresh EL, Shen D, Elshimali Y, Apple S, Horvath S, Mah V, Bose S, Chia D, Chang HR, Goodglick L (2010) Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. *Human pathology* **41**(12): 1794-801

Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI (2008) Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology* **181**(8): 5791-802

Young MR, Newby M, Wepsic HT (1987) Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer research* **47**(1): 100-5

Young MR, Wright MA (1992) Myelopoiesis-associated immune suppressor cells in mice bearing metastatic Lewis lung carcinoma tumors: gamma interferon plus tumor necrosis factor alpha synergistically reduces immune suppressor and tumor growth-promoting activities of bone marrow cells and diminishes tumor recurrence and metastasis. *Cancer research* **52**(22): 6335-40

Yu H, Kortylewski M, Pardoll D (2007) Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature reviews Immunology* **7**(1): 41-51

Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, Tom I, Ivelja S, Refino CJ, Clark H, Eaton D, Grogan JL (2009) The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature immunology* **10**(1): 48-57

Yuan J, Gnjatic S, Li H, Powel S, Gallardo HF, Ritter E, Ku GY, Jungbluth AA, Segal NH, Rasalan TS, Manukian G, Xu Y, Roman RA, Terzulli SL, Heywood M, Pogoriler E, Ritter G, Old LJ, Allison JP, Wolchok JD (2008) CTLA-4 blockade enhances polyfunctional NY-ESO-1 specific T cell responses in metastatic melanoma patients with clinical benefit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(51): 20410-5

Yuan ZL, Guan YJ, Chatterjee D, Chin YE (2005) Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* **307**(5707): 269-73

Zhang B, Wang Z, Wu L, Zhang M, Li W, Ding J, Zhu J, Wei H, Zhao K (2013) Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in patients with colorectal carcinoma. *PloS one* **8**(2): e57114

Zhang JP, Yan J, Xu J, Pang XH, Chen MS, Li L, Wu C, Li SP, Zheng L (2009) Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Journal of hepatology* **50**(5): 980-9

Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ (2010) Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* **464**(7285): 104-7

Zhang ZJ, Zheng ZJ, Kan H, Song Y, Cui W, Zhao G, Kip KE (2011) Reduced risk of colorectal cancer with metformin therapy in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes care* **34**(10): 2323-8

Zheng SG, Wang JH, Stohl W, Kim KS, Gray JD, Horwitz DA (2006) TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *Journal of immunology* **176**(6): 3321-9

Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, Wei S, Krzysiek R, Durand-Gasselín I, Gordon A, Pustilnik T, Curiel DT, Galanaud P, Capron F, Emilie D, Curiel TJ (2001) Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nature medicine* **7**(12): 1339-46

Résumé

L'état de la réponse immunitaire détermine en partie l'issue thérapeutique des patients atteints de cancer. L'objectif de notre équipe est de caractériser cette réponse et d'étudier l'impact des chimiothérapies sur celle-ci, afin d'identifier les mécanismes d'échappement. Nous avons montré que l'association 5-FU/oxaliplatine/anti-VEGF provoque chez certains patients atteints de cancer colorectal une chute des gMDSC périphériques exprimant fortement PD-L1 et les enzymes CD39/CD73. Cette diminution est associée à une meilleure réponse thérapeutique. Néanmoins, cette chimiothérapie peut aussi induire une élévation des Th17, une population pro-angiogénique, qui limite l'efficacité thérapeutique. Dans ce contexte, nous avons ensuite eu pour objectif d'analyser l'effet d'une activation de la désacétylase SIRT1 sur la polarisation des Th17. Nous avons montré que SIRT1 limite l'acétylation de STAT3, ce qui perturbe le programme de différenciation de ces cellules. *In vivo*, SIRT1 limite l'expansion des Th17 et conduit à un ralentissement de la croissance tumorale. Ce concept a été validé chez l'homme et ouvre la perspective d'associer des agonistes de SIRT1 avec la chimiothérapie. Nous avons ensuite comparé le profil immunologique de donneurs sains à celui d'une cohorte prospective de cancers bronchiques traités par anti-PD-1. Nous avons constaté qu'il existe des altérations immunologiques dans le compartiment myéloïde et que certaines d'entre elles influent sur la réponse à l'anti-PD1. Un modèle prédictif a pu être généré et il révèle que les gMDSC jouent là encore un rôle défavorable, alors que les cellules dendritiques et monocytaires exprimant PD-L1 jouent un rôle positif.

Mots Clés

Cancer, MDSC, Th17, SIRT1, Chimiothérapie, Immunothérapie

Abstract

The state of the immune response partly determines the therapeutic outcome of cancer patients. The objective of our team is to characterize this response and study the impact of chemotherapy on it, in order to identify escape mechanisms. We have shown that the 5-FU / oxaliplatin / anti-VEGF combination causes a fall in PD-L1-expressing peripheral gMDSCs and CD39 / CD73 enzymes in some patients with colorectal cancer. This decrease is associated with a better therapeutic response. Nevertheless, this chemotherapy can also induce an elevation of Th17, a pro-angiogenic population, which limits the therapeutic efficacy. In this context, we then aimed to analyze the effect of activation of SIRT1 deacetylase on the polarization of Th17. We have shown that SIRT1 limits the acetylation of STAT3, which disrupts the differentiation program of these cells. *In vivo*, SIRT1 limits the expansion of Th17 and leads to a slowing of tumor growth. This concept has been validated in humans and opens the prospect of associating SIRT1 agonists with chemotherapy. We then compared the immunological profile of healthy donors with that of a prospective cohort of anti-PD-1 treated bronchial cancers. We found that there are immunological alterations in the myeloid compartment and that some of them affect the response to anti-PD1. A predictive model could be generated and it reveals that gMDSCs play again an unfavorable role, whereas dendritic and monocytic cells expressing PD-L1 play a positive role.

Keywords

Cancer, MDSC, Th17, SIRT1, Chemotherapy, Immunotherapy